

# Schlussbericht

zum Vorhaben

## Ganzheitliche Bewertung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Butanol aus agrarischen Rest- oder Rohstoffen - Phase 2

**Zuwendungsempfänger:** Johann Heinrich von Thünen-Institut Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei - Institut für Agrartechnologie

**Förderkennzeichen:** 08NR283B bzw. 22028308B

**Laufzeit:** 01.06.2010 bis 31.12.2013

**Datum der Veröffentlichung:** 25.07.2014

**Autoren:** Nico Anders, Stefan Ellsiepen, Julia Hellert, Christian Kaufmann, Ulf Prüße, Milada Schubert, Heinz Stichnothe, Henning Storz, Thomas Willke, Klaus-Dieter Vorlop

**Projektleitung:** Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop  
Thünen-Institut für Agrartechnologie,  
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig  
Tel.: 0531/596-4101  
Fax.: 0531/596-4199  
Email: [klaus.vorlop@ti.bund.de](mailto:klaus.vorlop@ti.bund.de)

Gefördert durch:



Bundesministerium für  
Ernährung, Landwirtschaft  
und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

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

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZIELE</b> .....	<b>4</b>
1.1	AUFGABENSTELLUNG .....	4
1.2	STAND DER TECHNIK.....	4
1.2.1	<i>Rohstoffe</i> .....	4
1.2.2	<i>Gentechnik</i> .....	4
1.2.3	<i>Fermentation, Aufarbeitung</i> .....	5
1.2.4	<i>Ökonomie und Ökologie</i> .....	5
1.2.5	<i>Patentsituation</i> .....	5
1.3	ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN.....	5
<b>2</b>	<b>WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE ERGEBNISSE</b> .....	<b>6</b>
2.1	BEGLEITENDE ANALYTIK (AP 1): .....	6
2.1.1	<i>Zuckercharakterisierung</i> .....	6
2.1.2	<i>Anpassung der Analytik an das Produktspektrum des Prozesses</i> .....	7
2.2	ROHSTOFFE-BEREITSTELLUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFARBEITUNG (AP 2) .....	7
2.2.1	<i>Charakterisierung und Auswahl (AP 2.1)</i> .....	7
2.2.2	<i>Entwicklung und Optimierung von Aufschlussverfahren (AP 2.2)</i> .....	9
2.2.3	<i>Zusammenfassung</i> .....	16
2.2.4	<i>Ausblick</i> .....	17
2.3	GENTECHNISCHEN ARBEITEN (AP 3) .....	17
2.3.1	<i>Methodenentwicklung und Aufbau der Infrastruktur</i> .....	17
2.3.2	<i>Ergebnisse der gentechnischen Arbeiten</i> .....	23
2.3.3	<i>Schlussfolgerung und Ausblick</i> .....	43
2.4	ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG DER FERMENTATION (AP 4) .....	44
2.4.1	<i>Methodik</i> .....	44
2.4.2	<i>Ergebnisse</i> .....	47
2.5	PRODUKTGEWINNUNG: ABTRENNUNG UND AUFREINIGUNG DES N-BUTANOLS AUS DER FERMENTATIONSBRÜHE (AP5) .....	64
2.5.1	<i>Einleitung</i> .....	64
2.5.2	<i>Flüssig-Flüssig-Extraktion</i> .....	65
2.5.3	<i>Reaktivextraktion</i> .....	67
2.5.4	<i>Adsorption</i> .....	73
2.5.5	<i>Zusammenfassung</i> .....	75
2.6	BEWERTUNG UND AUSWAHL VON SOFTWARETOOLS (AP 6.1) UND DATENBANKEN (AP 6.2) .....	76
2.6.1	<i>Ökobilanz der Butanolproduktion (AP 6.3)</i> .....	79
2.6.2	<i>Vergleichende Ökobilanzierung (AP 6.4)</i> .....	85
2.7	ÖKONOMISCHE BEWERTUNG (AP 7) .....	88
2.7.1	<i>Kaffbergung (zu AP 7.3)</i> .....	88
2.7.2	<i>Ökonomie der Konversionsanlagen (AP7.1)</i> .....	92
2.7.3	<i>Preise und Substitutionsbeziehungen auf der Produktseite (AP 7.2)</i> .....	94
2.7.4	<i>Preise und Substitutionsbeziehungen auf der Rohstoffseite (AP 7.3)</i> .....	95
2.7.5	<i>Interregionale und internationale Wettbewerbssituation (AP 7.4)</i> .....	96
2.7.6	<i>Rechtliche und politische Rahmenbedingungen (AP7.5)</i> .....	100

2.8	VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE .....	100
2.9	RELEVANTE ERKENNTNISSE VON DRITTEN .....	101
2.10	ERFOLGTE/GEPLANTE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	101
2.11	LITERATURVERZEICHNIS .....	102
2.11.1	<i>Zu AP 2 - Rohstoffe</i> .....	102
2.11.2	<i>Zu AP 3 - Gentechnik</i> .....	102
2.11.3	<i>Zu AP 4 - Fermentation</i> .....	103
2.11.4	<i>Zu AP 5 – Aufarbeitung</i> .....	104
2.11.5	<i>Zu AP 6 - Ökologie</i> .....	104
2.11.6	<i>Zu AP 7 - Ökonomie</i> .....	105

# 1 Ziele

## 1.1 Aufgabenstellung

Butanol ist ein wichtiges Lösemittel und ein bedeutender Chemie-Rohstoff. Er findet vor allem Verwendung in Lacken, Harzen und Beschichtungen, kann aber auch in Form von Estern oder Ethern in Weichmachern, Polymeren und Flotationsmitteln eingesetzt werden. Butanol wird zurzeit mit einer jährlichen Produktion von ca. 1,2 Mio. Tonnen überwiegend synthetisch aus Erdöl produziert.

Thema des beantragten Projektes war die Entwicklung und Bewertung eines effizienten und wirtschaftlichen Verfahrens zur biotechnischen Herstellung von Butanol aus Roh-/Reststoffen der Landwirtschaft. Um die komplette Wertschöpfungskette vom Ausgangssubstrat bis zum marktfähigen Produkt untersuchen und bewerten zu können, verteilten sich die Forschungsarbeiten auf vier Schwerpunkte: Rohstoffbereitstellung, Konversion, Produktisolierung und Aufarbeitung sowie ökologische und ökonomische Untersuchungen. Das Vorhaben gliederte sich entsprechend dieser Vorgaben in 4 Aufgabenbereiche:

- Roh- und Reststoffaufschluss, sowie Produktaufarbeitung
- Biotechnische Konversion inkl. gentechnischer Arbeiten (Screening, Stammentwicklung, Stoffwechsoptimierung, Fermentation)
- Nachhaltigkeitsbewertung und Ökobilanzierung
- Ökonomie

Die ökonomischen Analysen waren bereichsübergreifend entlang der kompletten Wertschöpfungskette positioniert. Entsprechendes gilt für die Analytik.

Hauptziel war es, einen generellen ökonomischen Beurteilungsrahmen für die stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe in Deutschland zu schaffen und diesen Rahmen exemplarisch auch für die Analyse der Wertschöpfungskette Butanol einzusetzen.

## 1.2 Stand der Technik

### 1.2.1 Rohstoffe

Die früher etablierten Prozesse arbeiteten fast ausnahmslos mit Melassen. Da der Zuckergehalt von Melassen aufgrund besserer Technologie immer weiter sank und die Preise gleichzeitig stiegen, konnte das biotechnische Verfahren nach dem 2. Weltkrieg nicht mehr mit der chemisch-synthetischen Route konkurrieren. Die letzten noch laufenden Anlagen (Südafrika, Russland) wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts aus ökonomischen Gründen abgeschaltet.

### 1.2.2 Gentechnik

Gentechnische Arbeiten haben das Ziel, Produktausbeute, -Selektivität, -Konzentration und Produktivität zu erhöhen. Viele der in der Vergangenheit bearbeiteten Mutanten weisen zwar eine höhere Butanol-Toleranz

auf als der Wildtyp, sie erreichen jedoch nicht die bis dahin in industriellen Prozessen üblichen ABE-Konzentrationen von max. 18 bis 22 g/L (Jones & Woods 1986). Daran zeigt sich, dass für die niedrigen Produktkonzentrationen auch noch andere Faktoren verantwortlich sind als nur die Butanol-Toxizität per se, und das Aufspüren dieser Faktoren und die Untersuchung ihrer Wirkung stellen ein wichtiges Optimierungspotential der ABE-Fermentation dar. Dass man mit Butanol-toleranten Mutanten auch Erfolge erzielen kann, zeigt die Mutante *C. beijerinckii* BA101, die unter speziellen Fermentationsbedingungen eine Gesamt-Lösungsmittelkonzentrationen von bis zu 33 g/L ABE (21 g/L Butanol) erzielt haben soll (Qureshi & Blaschek 2001).

### **1.2.3 Fermentation, Aufarbeitung**

Ein großes Problem ist die hohe Toxizität des Butanols. Es hemmt bereits in geringen Konzentrationen die Bakterien, so dass klassische Verfahren nicht über 13 g/L erreichen. Die höchsten publizierten Werte liegen bei etwa 21 g/L Butanol und einer Gesamtlösemittel-Konzentration von 33 g/L (Qureshi & Blaschek 2001). Eine wirtschaftliche Produktion setzt aber noch höhere Produktkonzentrationen voraus. Entweder werden produkttolerantere Bakterien eingesetzt (Screening, Gentechnik) oder das Produkt muss kontinuierlich aus der Fermenterbrühe abgezogen werden (z. B. durch Membrantechnologien). Hierzu werden verschiedene Wege beschritten. Neben der klassischen Batchfermentation werden Fedbatch- und kontinuierliche Verfahren untersucht. Die Trennung der Acidogenese von der Solventogenese setzt mehrstufige Verfahren voraus (Bahl et al. 1982). Gekoppelt mit online-Produktaufarbeitung, Zellrückführung oder Immobilisierung wurde und wird versucht, die Produktivitäten und erreichbaren Endkonzentrationen zu erhöhen (Lienhardt et al. 2002; Ezeji et al. 2003; Qureshi et al. 2004a; Qureshi et al. 2004b).

### **1.2.4 Ökonomie und Ökologie**

Der Renaissance der biotechnischen ABE-Produktion der letzten 10 Jahre ist zum großen Teil auf den ökonomischen und ökologischen Druck durch sich vertuernde fossile Rohstoffe und den Klimawandel zurückzuführen. Es existieren einige relativ detaillierte Berechnungen zur Wirtschaftlichkeit aufgrund neuerer Prozesstechnologien (Prozessführung, Produktaufarbeitung, Nebenproduktnutzung). Diese Arbeiten berücksichtigen aber überwiegend rein prozessrelevante Kosten und nicht die Rohstoff- und Produktkonkurrenz sowie logistische Aspekte und Marktsituationen.

### **1.2.5 Patentsituation**

Es existieren zahlreiche Patente zur Butanol-Produktion, in denen überwiegend Ansprüche zur Aufarbeitung und neuerdings verstärkt zur gentechnischen Manipulation der Stämme beschrieben sind (Gassner et al. 1991, Formanek, J 1998; Ramey 1998, Socaillee 2008, DSM 2008, Yang 2008).

Die beantragten Arbeiten wurden hierdurch nicht berührt.

## **1.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

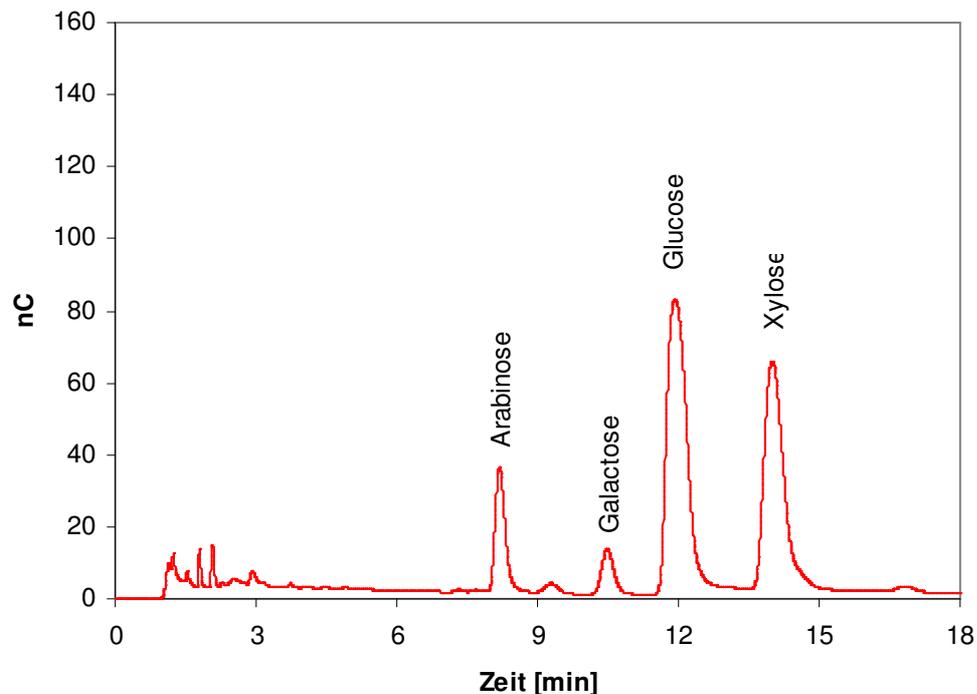
entfällt

## 2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

### 2.1 Begleitende Analytik (AP 1):

#### 2.1.1 Zuckercharakterisierung

Die für die Isolierung der Zucker wichtigen Polymere sind Cellulose, Hemicellulose und Stärke aus denen die Zucker Arabinose, Galactose, Glucose, Mannose und Xylose erhalten werden (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Wie unter Zielsetzung beschrieben, ist es notwendig die Biomasse bezüglich der aufgeschlossenen Monomere zu quantifizieren. Für die Zuckeranalytik der Rohstoff-Aufschlüsse wurde die HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection) Methode benutzt. Diese ICS-5000 (Thermo Scientific, ehem. Dionex) wurde für die Charakterisierung saurer Hydrolysate eingesetzt. Ein Beispiel-Chromatogramm, das die Auftrennung der Monosaccharide an einer CarboPac PA20-Säule zeigt, ist in **Abbildung 2.1-1** dargestellt.



**Abbildung 2.1-1:** Chromatogramm eines sauren Hydrolysates. Die Auftrennung von Arabinose (8,2 min), Galactose (10,5 min), Glucose (11,9 min) und Xylose (14,0 min) erfolgte mit einer CarboPac PA20-Säule (3x150 mm).

Bei der enzymatischen Hydrolyse werden im Gegensatz zur sauren Hydrolyse selektiv die Monosaccharide Glucose, Cellobiose und Xylose freigesetzt. Die Auftrennung dieser Monosaccharide, wird weiterhin mit der HPLC-UV-RI (High Performance Liquid Chromatography gekoppelt mit UV und RI-Detektor) durchgeführt. Die Charakterisierung von Hydrolysaten, die Oligosaccharide enthalten, erfolgte mit der GPC-RI (Gelpermeations-Chromatographie).

## **2.1.2 Anpassung der Analytik an das Produktspektrum des Prozesses**

### ***Flüssigchromatographie***

Zu Beginn der Arbeit wurde ein HPLC-System, entsprechend dem Produktspektrum des Fermentationsprozesses, angepasst. Dabei war es wichtig, eine möglichst schnelle Methode zu entwickeln, die alle relevanten Zwischen- und Endprodukte identifizieren und quantifizieren kann. Die Zwischenprodukte (Lactat, Acetat, Butyrat) und Endprodukte (Aceton, Butanol, Ethanol) sowie das Substrat (z. B. Glucose) mussten mittels HPLC eindeutig getrennt und detektiert werden. Mit einer Aminex HPX 87H Trennsäule von BioRad und BioRad-Vorsäule, 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Eluent, einer Temperatur von 80°C und einer Flussrate von 0,9 mL min<sup>-1</sup> wurde eine Laufzeit von 25 min pro Messung erreicht. Zur Detektion der Substanzen dienten ein RI- (Knauer, Deutschland) sowie ein UV-Detektor (Shimadzu, Japan) mit 2 Kanälen für verschiedene Wellenlängen (210 nm und 265 nm). Aceton (265 nm) und Butyrat (210 nm) konnten im UV-Signal aufgetrennt und quantifiziert werden. Die Ethanol-Konzentration wurde mit Hilfe der unterschiedlichen Aceton-Konzentrationen aus RI- und UV-Signalen berechnet, da Ethanol und Aceton im RI-Signal nicht vollständig getrennt wurden. Die Konzentration von Butyrat wurde ebenfalls einbezogen, sofern sie die Peakfläche im RI-Signal beeinflusste.

### ***Gaschromatographie***

Für die Analyse der Gasphase oder Extraktionsmittel wurden zwei GC-Systeme eingerichtet und optimiert. Die Analyse der Gasphase erfolgte mittels GC (GC 14B, Shimadzu, Japan) mit WLD- und FID-Detektion.

Zur Analyse der organischen Proben wurde eine polare Kapillarsäule (HP-Innowax, 60 m x 0,25 mm) mit Wasserstoff als Trägergas genutzt. Die Bestimmung der Substanzen erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektors. Ebenfalls mittels GC (GC 14A, Shimadzu, Japan) konnten Lösemittel im Extraktionsmittel Isofol<sup>®</sup> 12 nachgewiesen werden.

Die zur Trennung notwendigen Temperaturprofile und Flussraten mussten entsprechend der vorliegenden Einsatzstoffe angepasst werden.

### ***Spektroskopie***

Das Zellwachstum wurde mit einem UV/VIS Spektrometer (PG Instruments Ltd., UK) durch Messung der optischen Dichte bei 535 nm (OD<sub>535</sub>) verfolgt.

## **2.2 Rohstoffe-Bereitstellung, Charakterisierung und Aufarbeitung (AP 2)**

### **2.2.1 Charakterisierung und Auswahl (AP 2.1)**

Kaff ist als sogenannte „non Food Biomasse (jährlich ca. 10 Mio. t in Deutschland) nicht mehr primärer Bestandteil der Nahrungsmittelindustrie. Es verbleibt nach dem Erntevorgang mit dem Stroh auf dem Feld Die damit verbundene größere Oberfläche begünstigt den Abbau wertvoller

Inhaltsstoffe. Speziell für Pilze der Gattung Fusarium, die sowohl Mensch, als auch Tier durch die Bildung von Mykotoxinen schädigen können, ist Getreide ein idealer Nährboden [Oldenburg, E. et al., 2001]. Die damit verbundene vorteilhafte Entfernung des Kaffs vom Acker, sowie die aufgrund der geringen Größe billigere mechanische Vorbehandlung im Vergleich zum Stroh macht Kaff zu einem potentiellen Ausgangsstoff für den Biomasseaufschluss. Des Weiteren ist der Lignin-Gehalt des Kaffs im Vergleich zum Stroh geringer [Duguid, K. B. et al., 2007]. In diesem Zusammenhang ist Kaff für die enzymatische Hydrolyse besser geeignet als Stroh, da der Aktivitätsverlust durch Adsorption minimiert ist [Benkum Qi et al. 2011].

Dieser Reststoff Weizenkaff wurde zu Vergleichszwecken um die in **Tabelle 2.2-1** aufgeführten Rest- und Rohstoffe erweitert.

**Tabelle 2.2-1:** Rest- und Rohstoffcharakterisierung. Nach der Methode von Sluiter et al. (2008) erhaltene Zusammensetzungen der Biomassen in g/g Biomasse.

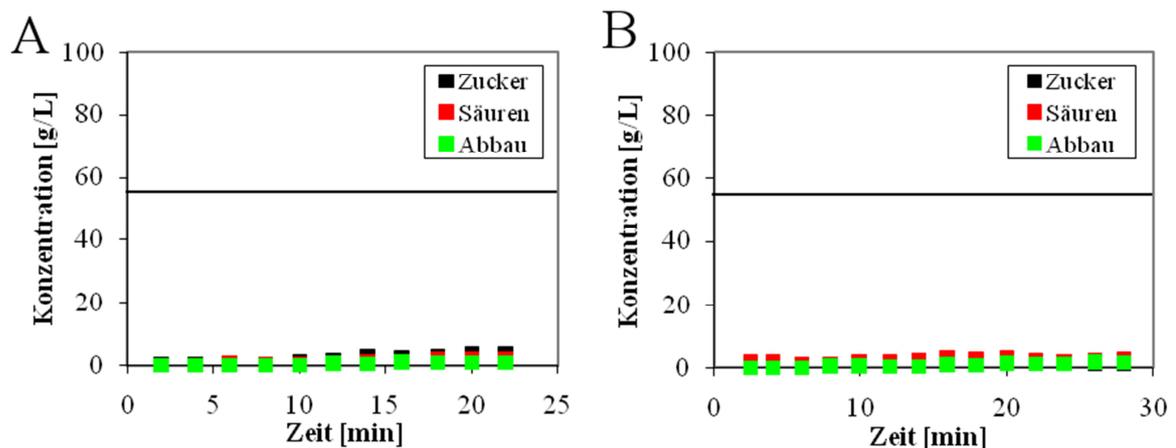
	<b>Rhamnose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Glucose</b>	<b>Xylose</b>	<b>Mannose</b>
<b>Weizen-Stroh</b>	0,00	0,10	0,02	0,22	0,23	0,00
<b>Weizen-Korn</b>	0,00	0,07	0,00	0,27	0,12	0,06
<b>Weizen-Kaff</b>	0,01	0,12	0,03	0,23	0,18	0,00
<b>Gerste-Stroh</b>	0,00	0,10	0,02	0,24	0,25	0,00
<b>Gerste-Korn</b>	0,00	0,08	0,00	0,27	0,13	0,04
<b>Gerste-Grannen</b>	0,00	0,13	0,02	0,18	0,29	0,00
	<b>Lignin</b>	<b>Asche</b>	<b>Stickstoff</b>	<b>Trockenmasse</b>	<b>Σ Zucker</b>	
<b>Weizen-Stroh</b>	0,24	0,08	0,005	0,89	0,57	
<b>Weizen-Korn</b>	0,32	0,00	0,017	0,90	0,52	
<b>Weizen-Kaff</b>	0,24	0,08	0,040	0,89	0,56	
<b>Gerste-Stroh</b>	0,25	0,07	0,006	0,88	0,60	
<b>Gerste-Korn</b>	0,22	0,11	0,016	0,93	0,51	
<b>Gerste-Grannen</b>	0,27	0,06	0,004	0,91	0,62	

Die Charakterisierung dieser Rest- und Rohstoffe erfolgte durch die Methode nach Sluiter et al. (2008). Anhand dieser zweistufigen Säurehydrolyse konnte gezeigt werden, dass die Zuckerzusammensetzungen je nach Rohstoff variieren. Zudem zeigt sich, dass die Methode nach Sluiter et al. (2008) nicht für jeden Rohstoff geeignet ist. Die Zuckerausbeuten der stärkehaltigen Rohstoffe (Weizen- bzw. Gerstenkorn) sind im Vergleich zur Literatur zu niedrig. So besteht nach Serena und Bach Knudsen (2007) der Weizen zu 67 % aus Stärke. Dies spiegelt sich jedoch nicht in den nach Sluiter et al. (2008) erhaltenen Ergebnissen wider.

## 2.2.2 Entwicklung und Optimierung von Aufschlussverfahren (AP 2.2)

### Physikalischer Aufschluss

Der LHW-Aufschluss (Liquid Hot Water) wird aufgrund des Druckeinflusses zu den physikalischen Aufschlüssen gezählt. Aufgrund der hohen Temperaturen und des hohen Drucks werden die Acetylgruppen aus der Hemicellulose freigesetzt. Diese katalysieren die Spaltung der Polysaccharide in Oligo- und Monosaccharide. Jedoch konnten für Weizenkaff unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine relevanten Zuckerkonzentrationen erzielt werden. In **Abbildung 2.2-1** sind die Reaktionsverläufe für eine 200 °C (A) und eine 230 °C (B) Reaktion aufgezeigt.



**Abbildung 2.2-1:** LHW-Reaktionen mit Weizenkaff bei 200 °C (A) und 230 °C (B). Die Reaktionen wurden in einem 1L-Parr Reaktor mit Heißdampfheizung durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 30 g Weizenkaff und 300 mL wurde dabei zunächst auf 110 °C erhitzt und anschließend durch die Heißdampfheizung auf die jeweilige Temperatur gebracht. Die horizontale Linie bei 56 g/L entspricht der theoretisch erzielbaren Konzentration.

Die physikalische Behandlung der Biomasse unter Druck wird in Kap. 0: Enzymatischer Aufschluss noch einmal aufgegriffen. Nach Alvira et al. (2010) ermöglicht es der LHW-Aufschluss, durch die Entfernung der Hemicellulosen, den Cellulasen die Cellulose leichter zugänglich zu machen.

### Enzymatischer Aufschluss

#### Enzymcharakterisierung und Auswahl

Die im Rahmen dieses Projektes eingesetzten Enzyme sind in **Tabelle 2.2-2** mit ihren Temperatur- und pH-Wert-Optima, sowie ihren Aktivitäten dargestellt.

**Tabelle 2.2-2:** Temperatur und pH-Wert Optimum der Enzyme, sowie deren Aktivitäten. Die Aktivitäten wurden nach Ghose (1987) und der Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt. (CA - Cellulase; EG - Endoglucanase; CB -  $\beta$ -Glucanase; XY - Xylanase)

T/pH-Optima	Biogazyme 2x		Novalin		Celluclast 1.5L		Dr. Luca		Novo 188	
	T [°C]	pH	T [°C]	pH	T [°C]	pH	T [°C]	pH	T [°C]	pH
A	55	5,0	50	4,6	55	5,0	-	-	-	-
EG	50	4,5	50	4,0	51	4,6	55	3,5	-	-
CB	35	6,2	60	4,5	52	6,0	-	-	52	4,7
XY	49	4,1	55	4,4	55	5,4	-	-	-	-
Enzym-Aktivitäten	Biogazyme 2x [U/mg Prot.]		Novalin [U/mg Prot.]		Celluclast 1.5 L [U/mg Prot.]		Dr. Luca [U/mg Prot.]		Novo 188 [U/mg Prot.]	
CA	2,1		0,1		3,2		-		-	
EG	16,0		1,0		1,8		1,7		-	
CB	30,1		3,5		6,3		-		16,2	
XY	1302		7,5		7,9		-		-	
Proteingehalt	81 mg/g		9,8 mg/mL		23,6 mg/mL		7,41 mg/g		37,7 mg/mL	

Im Vergleich zur vielfältig in der Literatur beschriebenen Enzymmischung von Novozymes (Bagsværd, DK) [Berlin et al. 2007, Linde et al. 2008, Saha et al. 2005 und Zhang et al. 2009] besitzt die Enzymmischung von ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, DE) eine geringere Cellulase-Aktivität (CA-Aktivität). Aufgrund der höheren Endo-Glucanase- (EG) und  $\beta$ -Glucosidase-Aktivitäten (CB) und den damit vermuteten besseren Hydrolyse-Eigenschaften, wurde standardmäßig die Enzymmischung Biogazyme 2x eingesetzt. Die Enzymmischungen Novalin (NovoBioTec Dr. Fechter GmbH; Berlin, DE) und die von Dr. Luca & Partner (Berlin, DE), sowie Novo 188 (Novozymes, Bagsværd, DK) kamen, aufgrund ihrer nicht vorhandenen CA-Aktivitäten bzw. aufgrund von geringen katalytischen Aktivitäten, lediglich bei Vergleichsversuchen zum Einsatz.

### Hydrolyse

Die enzymatischen Hydrolysen wurden in einem HT Infors Inkubator in 50 mL Schottflaschen durchgeführt. Nach einer entsprechenden Temperierung des Inkubators wurden die Schottflaschen im Schüttler festgeklemmt und bei 100 upm für den Hydrolyse-Zeitraum geschüttelt.

Die Hydrolyse-Versuche von Biogazyme 2x an Idealsubstraten und vorbehandelten Weizenkaff **Tabelle 2.2-3** zeigen, dass die maximale Zuckerkonzentration nicht nur vom pH-Wert und der Temperatur, sondern auch vom Substrat abhängt.

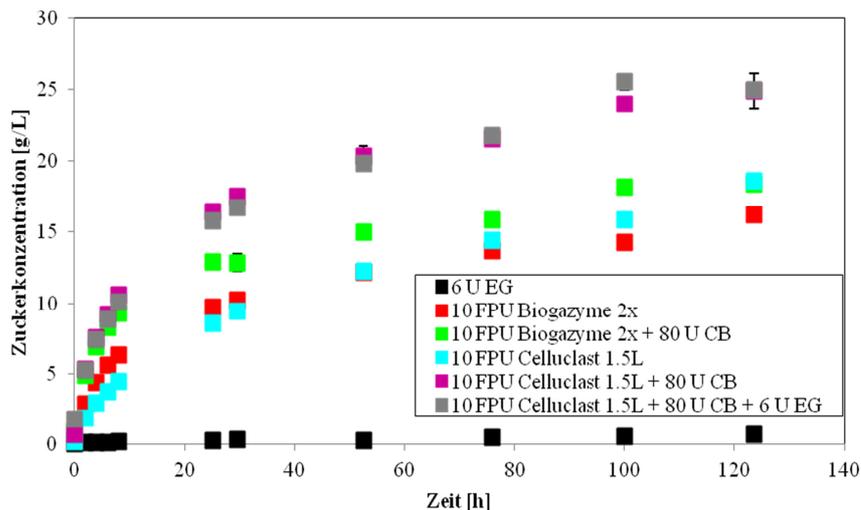
**Tabelle 2.2-3:** Zuckerkonzentrationen [g/L] für verschiedene Substrate unter den jeweiligen Bedingungen. Alle Hydrolysate (20 % Substratgehalt) wurden nach einer Hydrolysedauer von 5 Tagen mit einer Enzymaktivität von 10 FPU je Gramm Substrat auf Zucker untersucht. 1 U CA entsprechen 1 FPU:

Temperatur	45 °C			50 °C			55 °C		
<b>pH-Wert</b>	4,5	5,0	5,5	4,5	5,0	5,5	4,5	5,0	5,5
<b>Cellulose</b>	76	75	67	63	65	62	72	75	69
<b>Xylan</b>	99	98	100	122	122	125	97	101	100
<b>Organosolv-Weizenkaff</b>	58	59	66	79	74	73	57	64	67

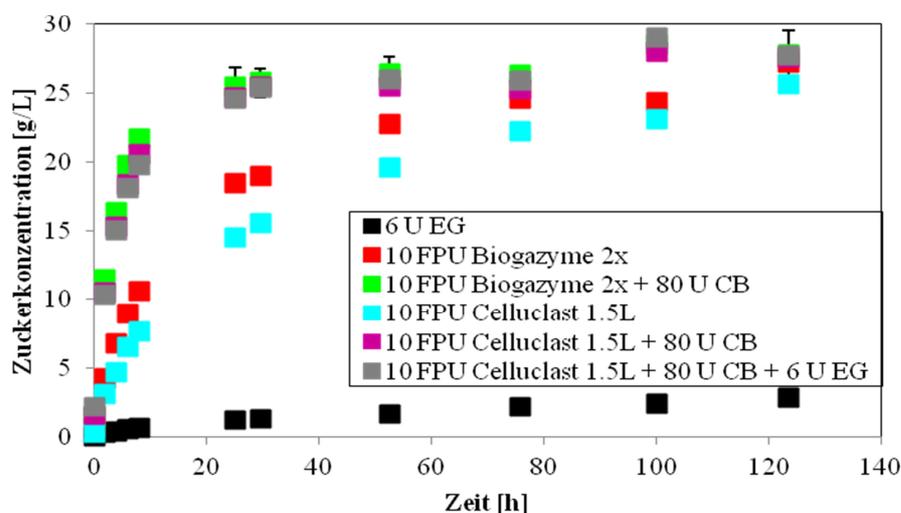
Es stellte sich heraus, dass das Optimum für nach dem Organosolv-Verfahren vorbehandeltes Weizenkaff nicht mit einem der Optima von Cellulose übereinstimmt. Zudem wurde die höchste Zuckerkonzentration unter den optimalen Bedingungen der EG Aktivität erreicht und nicht wie bei der Cellulose unter den optimalen Bedingungen der CA-Aktivität. Demzufolge wurde versucht, mit Idealsubstraten aufzuklären, welche Aktivitäten für die Hydrolyse welcher Bereiche zuständig sind.

Die entsprechenden amorphen Cellulosen, die als Idealsubstrate eingesetzt wurden, sind nach Bertran & Dale (1985) und Den Haan et al. (2007) hergestellt worden. Dabei wurde zum einen versucht die Kristallinität von Cellulose (Fluka) durch Mahlen zu verändern und zum anderen durch eine Phosphorsäurebehandlung. Die Veränderung der Kristallinität nach Bertran & Dale (1985) wurde durch einen 15 stündigen Mahlvorgang erreicht.

Die Modifikation der Fluka Cellulose nach Den Haan et al. (2007) wurde durch die Zugabe von 50 mL Phosphorsäure zu 2 g Fluka Cellulose in 6 mL Wasser erreicht. Die transparente Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden 400 mL Wasser zugegeben und die Cellulose abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Im Anschluss wurden 10 mL Natriumcarbonat und 450 mL destilliertes Wasser hinzugegeben und die Cellulose erneut abzentrifugiert. Zum Abschluss wurde die erhaltene Cellulose noch so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Überstandes zwischen 5 und 7 lag. Die so erhaltene Cellulose wird als PASC (Phosphoric Acid Swollen Cellulose) bezeichnet.



**Abbildung 2.2-2:** Hydrolyse von Fluka Cellulose (2 % Substratgehalt) mit verschiedenen Enzymaktivitäten. Bei der Cellulose von Fluka (**Abbildung 2.2-2**) ist ersichtlich, dass Celluclast 1.5L höhere Zuckerkonzentrationen als der Enzym-Mix von Biogazyme 2x generierte. Außerdem stieg die Zuckerkonzentration durch die Zugabe von CB-Aktivität bei Celluclast 1.5L um ein dreifaches im Vergleich zu der Zugabe bei Biogazyme 2x. Die Zugabe von EG-Aktivität hatte kaum einen Einfluss. Dies war aufgrund der Kristallinität der Cellulose von Fluka auch zu erwarten, da EG Cellulose nur in amorphen Bereichen hydrolysieren.

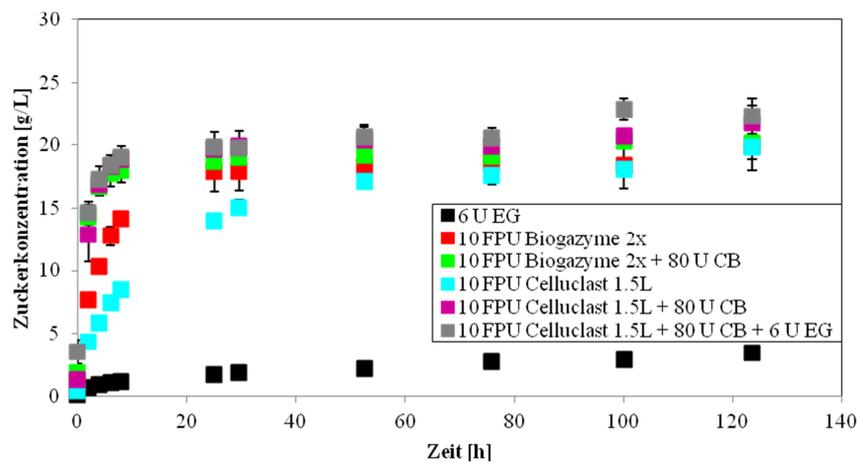


**Abbildung 2.2-3:** Hydrolyse von in der Kugelmühle (15 h) behandelte Fluka Cellulose (2 % Substratgehalt) mit verschiedenen Enzymaktivitäten

Die Behandlung der Cellulose in der Kugelmühle hat nach Bertran & Dale (1985) eine Veränderung der Kristallinität zur Folge. Dies kann man auch anhand von **Abbildung 2.2-3** nachvollziehen. Im Vergleich zur Hydrolyse der mikrokristallinen Fluka Cellulose (**Abbildung 2.2-2**) wird bei dieser Hydrolyse mit der reinen EG Aktivität eine höhere Zuckerkonzentration erzielt. Dies entspricht sowohl der Annahme, dass die Kristallinität verändert wurde, als auch der, dass EG in amorphen Bereichen aktiv sind [Bertran & Dale 1985, Hermans und Weidinger 1946 und Lynd et al. 2002]. In **Abbildung 2.2-3** ist weiterhin zu erkennen, dass Celluclast 1.5L im Vergleich zu der Enzymmi-

schung Biogazyme 2x eine geringere Zuckerkonzentration erzielt. Dies kann auf die höhere EG Aktivität des Biogazyme 2x zurückgeführt werden. Die amorphen Bereiche der mit der Kugelmühle behandelten Fluka Cellulose werden durch diese Aktivität hydrolysiert. Die dadurch höhere Anzahl an Kettenenden ermöglicht den Exo-Glucanasen einen schnelleren Abbau der Cellulose. Durch die Zugabe von CB Aktivität wird das Zuckermaximum für die Enzymmischungen Celluclast 1.5L und Biogazyme 2x bereits nach 24 h erreicht.

Nach Den Haan et al. (2007) handelt es sich bei PASC (Phosphoric Acid Swollen Cellulose) ebenfalls um eine Methode, die die Kristallinität der Cellulose verändert. Die Reaktionsverläufe von PASC sind in **Abbildung 2.2-4** abgebildet. Die Ergebnisse sind mit denen in **Abbildung 2.2-3** abgebildeten vergleichbar. Die Hydrolyse ist jedoch bereits nach 8 h beendet. Demnach scheint die Veränderung der Kristallinität der Cellulose hin zu leichter hydrolysierbaren Bereichen den Enzymmischungen Celluclast 1.5L und Biogazyme 2x einen leichteren Abbau zu ermöglichen. Demzufolge stellt sich der bei der Ursprungs-Cellulose festgestellte Sachverhalt für die amorphen Cellulose (PASC) genau umgekehrt dar. Dies spiegelt sich auch in den Aktivitäten der beiden Enzyme wieder. Biogazyme 2x besitzt im Vergleich zu Celluclast 1.5L eine höhere EG-Aktivität, aber eine niedrigere CA-Aktivität. Aufgrund der höheren CB-Aktivität von Biogazyme 2x im Vergleich zu Celluclast 1.5L war der Einfluss der zugegebenen CB-Aktivität auch geringer.

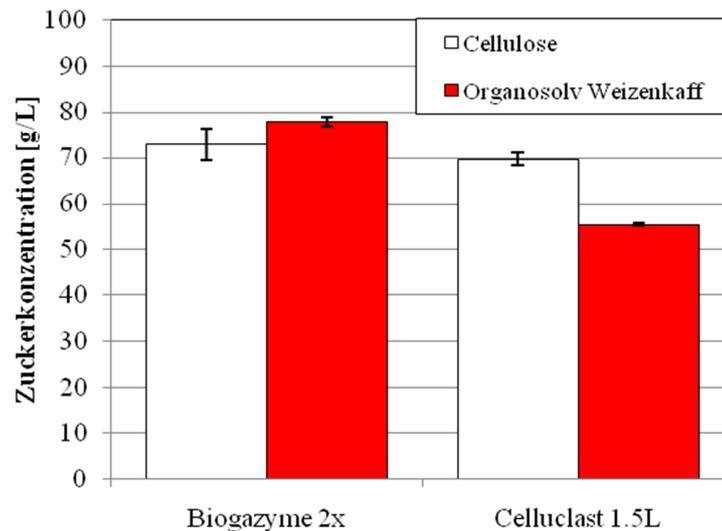


**Abbildung 2.2-4:** Hydrolyse von PASC Fluka Cellulose (2 % Substratgehalt) mit verschiedenen Enzymaktivitäten.

Anhand der Reaktionen mit Idealsubstraten konnte also gezeigt werden, dass die Enzymmischung Biogazyme 2x für Substrate mit amorphen Bereichen besser geeignet ist, als für kristalline Ausgangsstoffe. Für diese kristallinen Ausgangsstoffe ist Celluclast 1.5L aufgrund der höheren CA-Aktivität, die auf eine höhere Exo-Glucanase zurückzuführen ist, besser geeignet.

Ein Vergleich der beiden Enzyme anhand von Cellulose ergibt nach 5 Tagen Hydrolyse-Zeit vergleichbare Zuckerkonzentrationen.

Bei Weizenkaff, das mit dem Organosolv-Verfahren vorbehandelt wurde, ist die erzielte Zuckerkonzentration mit Biogazyme 2x jedoch um 30 % höher, als bei der Hydrolyse mit Celluclast 1.5 L (**Abbildung 2.2-5**).

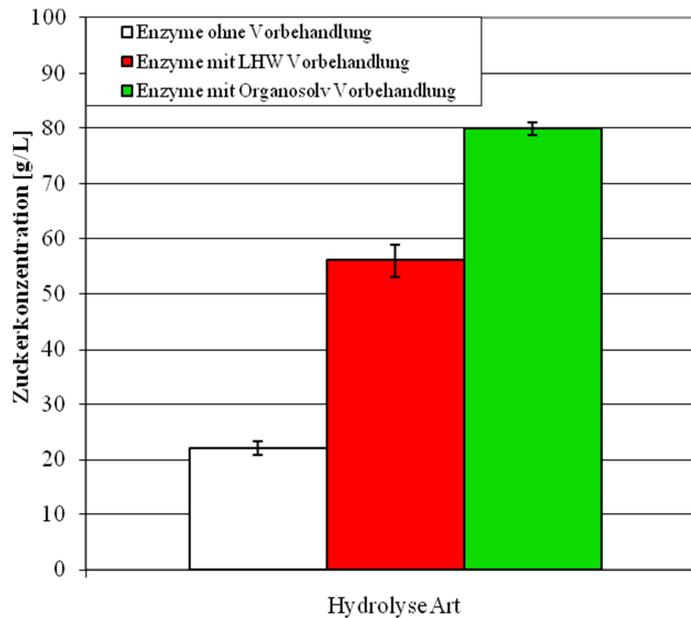


**Abbildung 2.2-5:** Zuckerkonzentrationen nach einer 5-tägigen enzymatischen Hydrolyse mit 10 FPU der jeweiligen Enzyme und einem Substratgehalt von 20 %.

Entsprechend der Erkenntnisse aus den Versuchen mit den unterschiedlichen Kristallinitäten der Cellulose kann die höhere Zuckerkonzentration bei der Hydrolyse von Weizenkaff mit Biogazyme 2x mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Existenz amorpher Bereiche in der Cellulose des Weizenkaffs zurückgeführt werden.

Die weiteren enzymatischen Hydrolyse-Versuche wurden aufgrund dieser Tatsache mit Biogazyme 2x durchgeführt. **Abbildung 2.2-6** zeigt, dass enzymatische Reaktionen ohne eine Vorbehandlung der Biomasse nicht zu hohen Zuckerkonzentrationen führen. Erst durch die Entfernung der Hemicellulosen und/oder des Lignins und durch eine Aktivierung der Cellulose werden Zuckerkonzentrationen über 50 g/L erreicht.

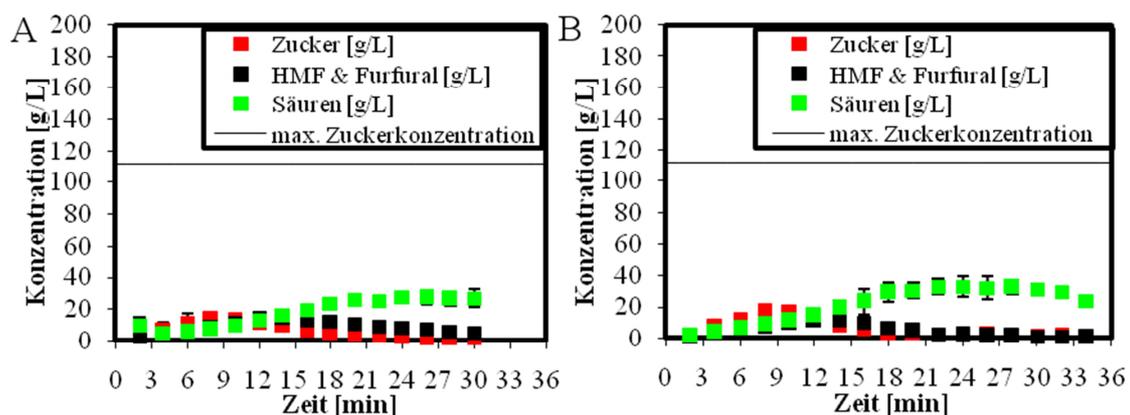
Es stellte sich heraus, dass die Organosolv Vorbehandlung für eine sich anschließende enzymatische Hydrolyse mit der Enzymmischung Biogazyme 2x besser geeignet ist, als eine LHW-Vorbehandlung. Da beide Vorbehandlungen bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, scheint diese Beobachtung auf die zusätzliche Abtrennung des Lignins bei der Organosolv-Vorbehandlung zurückzuführen zu sein. Durch die Abtrennung der Hemicellulose und des Lignins ist die Cellulose reiche Fraktion für die Cellulasen leichter zugänglich.



**Abbildung 2.2-6:** Vergleich von enzymatischen Hydrolysen mit unterschiedlich vorbehandelte Weizenkaff. Die enzymatischen Hydrolysen wurden mit 10 FPU Biogazyme 2x und einem Substratgehalt von 20 % bei 50 °C und einem pH-Wert von 4,5 durchgeführt.

### Chemischer Aufschluss

Die Erkenntnisse aus Versuchen mit dem Berghof-Aufschlusssystem wurden im Parr-Reaktor umgesetzt. Rekombinationsreaktionen an der Oberfläche des Kaffs aufgrund des nicht vorhandenen Rührvorgangs konnten mit Hilfe des 1-L-Parr-Reaktors mit integriertem Propeller-Rührer minimiert werden. Die ersten Reaktionen mit Weizenkaff (20 %) ergaben lediglich Zuckerkonzentrationen von 18 g/L. Eine weitere Erhöhung des Substratgehaltes, dieser korreliert mit einem Anstieg der Zuckerkonzentration, scheint daher sinnvoll. In **Abbildung 2.2-7** sind die Versuche für Weizenkaff bei 200 °C dargestellt.



**Abbildung 2.2-7:** Säurehydrolysen in L-Parr-Reaktor mit Heißdampfheizung mit 0,5 M Salzsäure (A) und 1 M Salzsäure (B) bei 200 °C. Die maximale Zuckerkonzentration wurde für Weizenkaff aus Tabelle 1 bezogen auf die eingesetzte Menge an Kaff berechnet.

### 2.2.3 Zusammenfassung

Die in folgender Tabelle aufgeführten Ergebnisse der einstufigen Hydrolyse-Verfahren zeigen, dass bis auf die einstufige Säurehydrolyse kein Verfahren zu höheren Zuckerkonzentrationen führt.

**Tabelle 2.2-4:** Zuckerkonzentrationen in g/L für die jeweiligen Hydrolysate aus Weizenkaff

Zucker-Konzentration in g/L	enzymatischer Aufschluss	Heißwasser-Aufschluss	Saurer Aufschluss	Basischer Aufschluss	Organosolv-Aufschluss
Ohne Vorbehandlung	22	1,4	54	0,5	0,5

Aufgrund der milden Bedingungen und der Tatsache, dass bei der enzymatischen Hydrolyse keine Abbauprodukte (HMF, Furfural usw.) gebildet werden, wurde versucht die Zuckerkonzentrationen durch eine Kopplung der in **Tabelle 2.2-4** angeführten Verfahren mit der enzymatischen Hydrolyse zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass höhere Zuckerkonzentrationen durch die Kombination einer Vorbehandlung mit der enzymatischen Hydrolyse möglich sind (vgl. **Tabelle 2.2-5**). Dies liegt wahrscheinlich an der besseren Zugänglichkeit der Cellulose für die Enzyme. Verfahren, die Lignin und/oder Hemicellulosen aus der Zellwand herauslösen und somit den Celluloseanteil in den Zellwänden anreichern, sind dabei besonders für die enzymatische Hydrolyse geeignet. Die LHW Vorbehandlung führt dabei zu einer Entfernung der Hemicellulosen. Im Gegensatz dazu wird bei der basischen Vorbehandlung das Lignin entfernt. Bei der sauren Vorbehandlung des Weizenkaffs wird die Oberfläche durch Rekombinations- bzw. Abbaureaktionen wahrscheinlich so verändert, dass die Cellulose schwerer zugänglich ist. Die Zuckerkonzentration nach saurer Vorbehandlung ist demnach niedriger, als die Zuckerkonzentration nach einstufiger enzymatischer Hydrolyse (**Tabelle 2.2-4** und **Tabelle 2.2-5**)

**Tabelle 2.2-5:** Zuckerkonzentrationen in g/L für die enzymatische Hydrolyse von Weizenkaff nach der jeweiligen Vorbehandlung

Zucker-Konzentration in g/L	Heißwasser-Aufschluss (LHW)	Saurer Aufschluss	Basischer Aufschluss	Organosolv-Aufschluss
Enzymatische Hydrolyse	56	9	41	80

Das Organosolv-Verfahren scheint aufgrund der Entfernung der Hemicellulosen und des Lignins besonders als Vorbehandlung des Weizenkaffs geeignet zu sein. Dies zeigt sich auch in der höchsten erhaltenen Zuckerkonzentration in **Tabelle 2.2-5**. Der LHW Aufschluss, als kostengünstigste Vorbehandlung führt in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse ebenso wie die basische Vorbehandlung zu niedrigeren Zuckerkonzentrationen. Dies könnte daran liegen, dass die beiden letzteren Verfahren jeweils nur einen der angesprochenen Zellwandbestandteile (Hemicellulose

oder Lignin) entfernen. Demgegenüber scheint die Cellulose aus dem Organosolv vorbehandelten Weizenkaff für die Enzymmischung Biogazyme 2x leichter zugänglich zu sein. Dies spiegelt sich auch in der Literatur wider, so wurden hohe Zuckerkonzentrationen mit Organosolv vorbehandelter Biomassen erzielt [Zhang et al. 2009].

#### 2.2.4 Ausblick

In Kap. 2.2.2 konnte gezeigt werden, dass nach Organosolv-Vorbehandlung gekoppelt mit einer enzymatischen Hydrolyse Zuckerkonzentrationen von 80 g/L erreichbar sind.

Diese unter stationären Bedingungen (Inkubator) erzielten Ergebnisse lassen sich jedoch durch eine Hydrolyse in einem Reaktor mit Rührsystem noch verbessern. Einer Veröffentlichung von Zhang et al. (2009) entsprechend sollten enzymatische Reaktionen in einem Rührsystem einer besseren Verflüssigung unterliegen. Dies führt zu einem besseren Substrat-Enzym-Wasser Kontakt und zu einem besseren Abtransport der Produkte.

Außerdem scheint eine Optimierung des totalen Aufschlusses nach Sluiter et al. (2008) sinnvoll, da dieser nicht für die Charakterisierung aller Bestandteile der Pflanze gleichgut geeignet ist.

### 2.3 Gentechnischen Arbeiten (AP 3)

#### 2.3.1 Methodenentwicklung und Aufbau der Infrastruktur

##### *Entwicklung von Primern (adc-Locus) und ihre Verwendung*

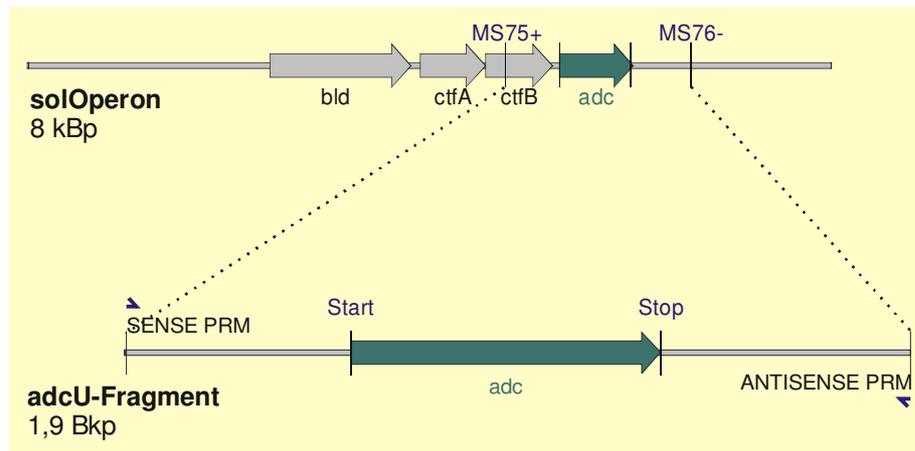
Für die Isolierung genomischer Fragmente am *adc*-Locus aus *C. saccharoperbutylacetonicum* wurden spezifische Primer entwickelt, und die Parameter für eine erfolgreiche Amplifizierung wurden ermittelt. Hier werden nur die Primer-Paare beschrieben, die für die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Experimente und die erreichten Ergebnisse essentiell sind. Andere Primer, wie z.B. für die Sequenzierung der isolierten Fragmente bzw. Klone, sind bedarfskonform frei wählbar.

##### *Primer zur Amplifizierung des adc-Gens und seiner Umgebung*

MS75+      5' . . . TCCAGATATAATAAATGCTGGTGGGG...3'      Tm=58,3

MS76-      5' . . . AATCAAATTATCCAAACTAAGGAGG...3'      Tm=51,5

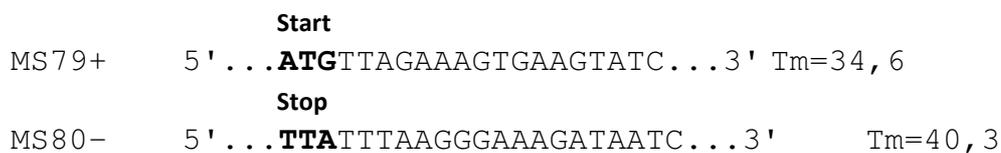
Mit diesem spezifischen Primer-Paar wurde das *adc*-Gen samt seiner Umgebung aus dem Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum* als ein ca. 1,9 kBp großes DNA-Fragment amplifiziert, kloniert und per Nukleotidsequenz vollständig charakterisiert. Nukleotidsequenz des *adcU*-Fragments aus *C. saccharoperbutylacetonicum* sowie die Ergebnisse der Analysen und Charakteristika des *adc*-Gens und seiner Umgebung wurden im Bericht von Mai 2011 detailliert dokumentiert. Die Lage der Primer-Bindungsstellen ist in der folgenden Abbildung skizziert.



**Abbildung 2.3-1: Amplifizierung des adcU-Fragments.** Oben: Ausschnitt aus dem Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 im Bereich des sol-Operons (Datenbank Entrez nucleotides database/NCBI). Mit dem spezifischen Primer-Paar MS75+/MS76- wurde das *adc*-Gen (grüner Pfeilbalken) samt seiner Umgebung als ein ca. 1,9 kbp großes DNA-Fragment amplifiziert. Das Amplifikat ist unten als *adcU*-Fragment dargestellt.

#### Primer zur Amplifizierung des *adc*-ORF

Für die Isolierung des *adc*-ORF aus *C. saccharoperbutylacetonicum* wurden spezifische Primer (MS79+ und MS80-) entwickelt und verwendet. Die Primer-Bindungsstellen sind in der oben stehenden Abbildung mit **Start** bzw. **Stop** gekennzeichnet.



#### Primer zur Herstellung einer künstlichen *EcoRI*-Schnittstelle

Für die Herstellung einer künstlichen *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des *adc*-ORF aus *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde das spezifische Primer-Paar MS77+/MS78- entwickelt und verwendet. Die konstruierte *EcoRI*-Schnittstelle diente der Insertion der Km-Kassette (= Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase-Gen isoliert aus dem handelsüblichen Plasmid pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech; Prod. Nr. 27-4958).



#### Schutz der eingesetzten Plasmide

Um die eingeführte Fremd-DNA (hier das Plasmid pMSadcUKm) vor Degradation in der Wirtszelle zu schützen, wurde die Plasmid-DNA in bestimmten Mustern methyliert. Diese Methylierung soll die wahre Identität der Fremd-DNA abschirmen und der Wirtszelle eigene DNA vortäuschen. Da das Methylierungsmuster von *C. saccharoperbutylacetonicum* unbekannt ist, werden vorerst vier

Methylierungsmuster eingesetzt und in wiederholten Transformationen auf Erfolg getestet. Die Charakteristika der getesteten Methyltransferasen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2.3-1:** Getestete Methyltransferasen und ihre Charakteristika

Methyltransferase	Modifikationsart	Erkennungssequenz	Abkürzung
<b>HaeIII</b>	Interne Cytosinreste (C5) der Sequenz: 5' ...GGCC...3'	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  5' \dots \text{GG} \text{C} \text{C} \dots 3' \\  3' \dots \text{C} \text{C} \text{G} \text{G} \dots 5' \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	H
<b>HhaI</b>	Interne Cytosinreste (C5) der Sequenz: 5' ...GCGC...3'	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  5' \dots \text{G} \text{C} \text{G} \text{C} \dots 3' \\  3' \dots \text{C} \text{G} \text{C} \text{G} \dots 5' \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	Ha
<b>MspI</b>	Externe Cytosinreste (C5) der Sequenz: 5' ...CCGG...3'	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  5' \dots \text{C} \text{C} \text{G} \text{G} \dots 3' \\  3' \dots \text{G} \text{G} \text{C} \text{C} \dots 5' \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	M
<b>GpC</b>	Alle Cytosinreste (C5) der Sequenz: 5' ...GC...3'	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  5' \dots \text{G} \text{C} \dots 3' \\  3' \dots \text{C} \text{G} \dots 5' \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	G

### **Entwicklung von Kontrolltests für die Mutanten-Selektion**

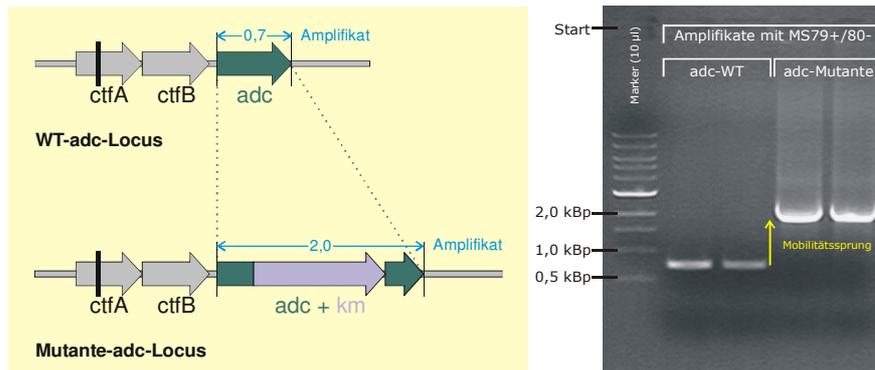
Um den Erfolg der insertionalen Mutagenese in vivo prüfen zu können, wurden zwei molekulargenetische Kontrolltests entwickelt, mit denen sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die *adc*-Mutanten eindeutig zu identifizieren sind.

Beide Tests basieren auf einem Mobilitätssprung spezifischer DNA-Fragmente, die im Agarosegel nach Größe getrennt wurden. Die Ursache für diesen Mobilitätssprung liegt in der inserierten Km-Kassette innerhalb des *adc*-Gens im Genom der Mutante.

Die beiden Tests unterscheiden sich sowohl in dem erforderlichen Zeit- und Arbeitsaufwand als auch in ihrer Aussagekraft, deshalb werden sie nach Bedarf einzeln oder in Kombination eingesetzt. Der Amplifikat-Test ist deutlich schneller durchgeführt als der Hybridisierungstest, weshalb er als Routine erster Wahl eingesetzt wird. Der Hybridisierungstest dient als Ergänzung bzw. der Verifizierung der Ergebnisse.

### **Mobilitätssprung spezifischer Amplifikate**

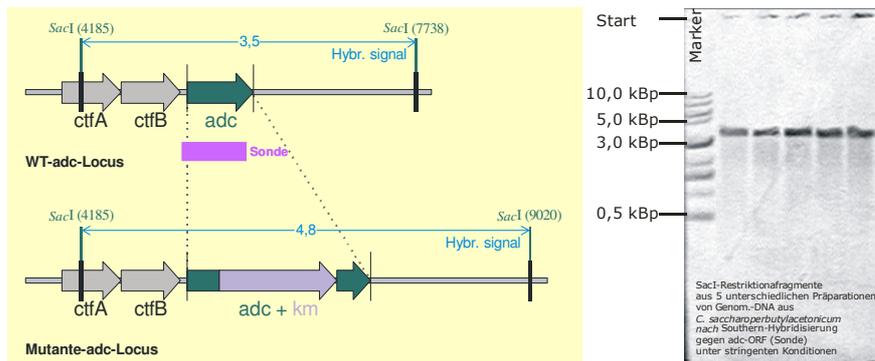
Die Kontrolle basiert auf einem Mobilitätssprung von Amplifikaten, die mit spezifischen Primern an der *adc*-Mutanten-DNA bzw. der Wildtyp-DNA erzeugt und anschließend nach Größe elektrophoretisch getrennt wurden. Die Primer (MS79+ und MS80-) für die Kontroll-PCR sind spezifisch für genomische DNA aus *C. saccharoperbutylacetonicum* und sie umrahmen links und rechts das ORF des *adc*-Gens. Amplifikate von der Wildtyp-DNA wandern während einer elektrophoretischen Trennung im Agarosegel bei ca. 0,7 kbp (länge des *adc*-ORF), Amplifikate von *adc*-Mutanten-DNA wandern bei ca. 2,0 kbp. Dieser Mobilitätssprung von 1,3 kbp entspricht der Größe der inserierten Km-Kassette.



**Abbildung 2.3-2: Analyse der *adc*-Mutanten-Kandidaten via Mobilitätssprung.** Die spezifischen Amplifikate aus der Wildtyp-DNA (WT) unterscheiden sich von denen aus der *adc*-Mutante in ihrer Größe. Dieser Unterschied wird Mobilitätssprung genannt. Während die Amplifikate aus der Wildtyp-DNA nach der Trennung in einem Agarosegel eine diskrete Bande der Größe 0,7 kbp ergeben, wandern die Amplifikate aus der *adc*-Mutante bei 2,0 kbp. Die Ursache für den Mobilitätssprung ist die inserierte Km-Kassette von ca. 1,3 kbp.

### Mobilitätssprung spezifischer Hybridisierungssignale

Die Kontrolle basiert auf einem Mobilitätssprung von Hybridisierungssignalen an Restriktionsfragmenten aus genomischer *adc*-Mutanten- bzw. Wildtyp-DNA mit einer spezifischen Sonde am *adc*-Locus. Die Ergebnisse sind spezifisch und eindeutig reproduzierbar.



**Abbildung 2.3-3: Analyse der *adc*-Mutanten-Kandidaten via Mobilitätssprung.** Die Größe der *SacI*-Restriktionsfragmente aus der Wildtyp-DNA (WT) am *adc*-Locus unterscheiden sich von denen aus der *adc*-Mutante. Dieser Unterschied kann mit Hilfe einer homologen Hybridisierung gegen die *adc*-Sonde (Balken in pink) sichtbar gemacht werden. Während die *SacI*-Restriktionsfragmente am *adc*-Locus aus der Wildtyp-DNA ein Signal der Größe 3,5 kbp ( $7,7 - 4,2 = 3,5$ ) ergeben (Foto rechts), wird das Signal bei der *adc*-Mutante auf der Größe 4,8 kbp ( $9,0 - 4,2 = 4,8$ ) erscheinen. Die Ursache für den Mobilitätssprung der Signale ist die inserierte Km-Kassette von ca. 1,3 kbp.

### Entwicklung von Transformationsprotokollen

Nakayama et al. haben 2007 als erste eine Transformationsmethode für *C. saccharoperbutylacetonicum* vorgestellt (Nakayama, et al. 2007; Nakayama, et al. 2008). Es ging dabei um die Einbringung und Amplifikation eines Plasmid-lokalisierten Amylase-Gens zur Verwertung von Stärke bzw. um die Beeinflussung der Wasserstoff-Produktion. Da wir die Änderung der chromosomalen DNA

zum Ziel hatten und direkt in den Metabolismus eingreifen wollten, wurde ein eigenes Protokoll entwickelt.

Mit Hilfe eines Elektroporators wird die bakterielle Zellwand für kleinere DNA-Moleküle durchlässig gemacht, in der Hoffnung, dass die angebotene Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen und über homologe Rekombination ins Genom integriert wird.

Im Rahmen dieses Projektes wurden mehrere Transformationsprotokolle entwickelt und ausführlich getestet. In diesem Abschnitt werden die grundlegende methodische Prozedur sowie die modifizierten Parameter dokumentiert.

### **Medien und Puffer**

<b>TPGY-Medium</b>	50 g Trypticase; 5 g Pepton; 20 g Hefeextrakt; 4 g Glucose; 1 g Natrium-Thioglykolat; H <sub>2</sub> O: ad Vol = 1 L; pH 7 mit NaOH einstellen; autoklavieren
<b>TYA-Medium</b>	6 g Trypton; 2 g Hefeextrakt; 3 g Ammoniumacetat; 0,3 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; H <sub>2</sub> O ad Vol = 1 L; pH 6,5-7 mit NaOH oder HCl einstellen; autoklavieren; direkt vor dem Gebrauch: + als C-Quelle: 10 -100 g Glucose oder Saccharose
<b>SMP-Puffer</b>	272 mM Saccharose; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4;
<b>RCM</b>	10 g Fleischextrakt; 5 g Pepton; 3 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 5 g Glucose; 1 g Stärke; 3 g Natrium-Acetat; 0,5 g L-Cystein-HCl; 0,5 g Agar; H <sub>2</sub> O: ad Vol = 1 L; add 0.02 g Polymyxin B/L; pH: 6.8 einstellen; autoklavieren

### *Grundlegender Ablauf der Transformation*

Die Transformation von *C. saccharoperbutylacetonicum* beinhaltet vier Schritte, die nacheinander durchgeführt wurden: Zellenpräparation, Elektroporation, Adaptation und Selektion. Während der Erstellung der Transformationsprotokolle wurden etliche Parameter in diversen Kombinationen modifiziert, der grundlegende Ablauf sowie die Reihenfolge dieser vier Schritte wurden stets konstant gehalten, weil sie der biologischen Folge der natürlichen Transformation entsprechen.

### *Zellenpräparation*

- Anzucht in 30 mL TPGY- bzw. TYA-Medium (anaerob) bis zu einer OD ca. 0,8...1,2
- Zellernte durch Zentrifugation (aerob)
- Waschen und resuspendieren in 2...3 mL 10 %-PEG, (aerob)

### *Elektroporation (aerob/anaerob)*

Die Elektroporation wurde alternativ bei Kühlung auf Eis bzw. bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) durchgeführt. Ebenso alterniert wurde der Sauerstoffeinfluss.

### *Adaptation (anaerob) und selektive Inkubation*

Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 mL TPGY-Medium (+ 25 mM MgCl<sub>2</sub>) bei 30 °C 5 h akklimatisiert (anaerober Topf), anschließend wurde die Zellen auf ein Volumen von 1-2 mL aufkonzentriert und je 200 µl Zellen plattiert. Die selektive Inkubation erfolgte anaerob auf Kanamycin-haltigen Platten bei 30 °C etwa 2-7 Tage.

### Modifizierte Parameter der Transformationsprotokolle

Die modifizierten Parameter der einzelnen Transformationsprotokolle sind folgend in zwei Gruppen tabellarisch dargestellt.

**Tabelle 2.3-2:** Transformationsprotokoll: Modifikationsgruppe 1

Modifizierte Parameter	Werte
<b>Kulturmedium</b>	TPGY bzw. TYA
<b>DNA-Methylierung</b>	<i>dam</i> und alternativ H bzw. G bzw. Ha bzw. M
<b>Reaktionspuffer</b>	10 % PEG <sub>800</sub>
<b>Sauerstoffeinfluss*)</b>	ca. 0,5...1 h bzw. 0 h bzw. N <sub>2</sub> -Spülung
<b>Elektroporation:</b>	
<b>Feldstärke</b>	6,25 kV/cm
<b>Küvettenlänge</b>	4 mm
<b>Temperatur</b>	0 °C
<b>DNA-Menge</b>	10 µg
<b>Prozedur-Temperatur*)</b>	0 °C; kontinuierlich gekühlt
<b>Adaptationsmedium</b>	TPGY + 25 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Selektionsmedium</b>	TPGY <sup>Km</sup> bzw. RCM <sup>Km</sup> bzw. TYA <sup>Km</sup>

Km Kanamycin (0,1 g/L)  
 \*) ab der Zellernte bis zur Adaptation

**Tabelle 2.3-3:** Transformationsprotokoll: Modifikationsgruppe 2

Modifizierte Parameter	Werte
<b>Kulturmedium</b>	TYA
<b>DNA-Methylierung</b>	<i>dam</i> und H
<b>Reaktionspuffer</b>	10 % PEG <sub>800</sub> bzw. SMP-Puffer
<b>Sauerstoffeinfluss*)</b>	ca. 0,5...1 h
<b>Elektroporation:</b>	
<b>Feldstärke</b>	9 kV/cm
<b>Küvettenlänge</b>	2 mm
<b>Temperatur</b>	0 °C bzw. 20 °C
<b>DNA-Menge</b>	10 µg
<b>Prozedur-Temperatur*)</b>	20 °C
<b>Adaptationsmedium</b>	TYA + 25 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Selektionsmedium</b>	RCM <sup>Km</sup> bzw. TYA <sup>Km</sup>

Km Kanamycin (0,1 g/L bzw. 0,05 g/L)  
 \*) ab der Zellernte bis zur Adaptation

### 2.3.2 Ergebnisse der gentechnischen Arbeiten

Der erste Teil der Ergebnisse, Typisierung via genetischen Fingerabdruck, beinhaltet die Entwicklung und Validierung eines molekulargenetischen Tests zur Identifizierung bakterieller Stämme und Isolate.

Der zweite Teil der Ergebnisse behandelt die gentechnischen Entwicklungs- und Konstruktionsarbeiten, die zur Verbesserung des Produktspektrums der Solventogenese im Stoffwechsel clostridialer Butanolbildner zu einer höheren Butanol-Endkonzentration während der fermentativen Butanol-Herstellung dienen sollen. Dieses Ziel soll durch das Umleiten der clostridialen Stoffwechselwege, die zur Produktion unerwünschter Nebenprodukte führen, in Richtung effizienter Butanol-Bildung erreicht werden. Die Verbesserung des Produktspektrums erfolgt durch ein gezieltes Pathway-Design, an dessen Ende die *adc*-Mutante steht. Dem Pathway-Design wurde die Auswahl der zu manipulierenden Objekte (Stamm und Enzym) vorgeschaltet.

Gleichlaufend zu diesen beiden Hauptaufgaben wurden im Rahmen dieses Projektes ergänzende bzw. unterstützende Methoden entwickelt, die per se keinen direkten Anteil an der Realisierung der Hauptaufgaben haben, dienen jedoch zur Analyse des Basiszustandes bzw. der Verifizierung der gentechnisch konstruierten Zwischenstufen (s. Abschnitt Methodenentwicklung und Infrastrukturaufbau).

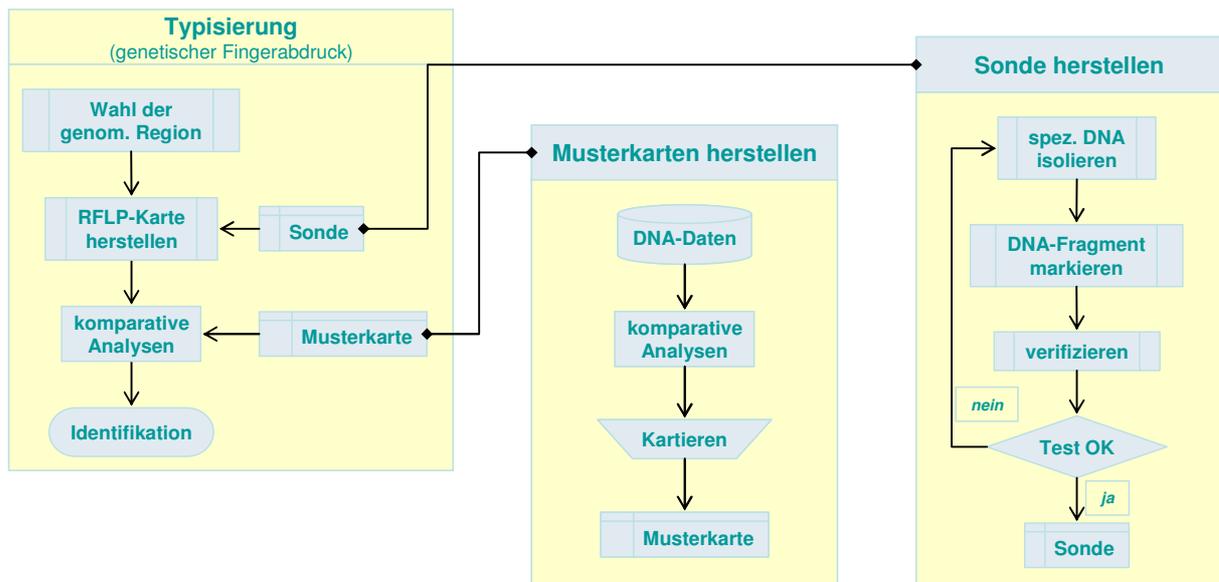
#### ***Typisierung***

Sowohl die Optimierung etablierter Arbeitsstämme wie auch die Isolierung unbekannter bakterieller Stämme sind verbunden mit zahlreichen Problemen wie z. B.:

- Überprüfung der Reinheit der Kultur bzw. Aufspüren von Kontaminationen
- Identifizierung der Isolate
- Phylogenetische Zuordnung unbekannter Isolate
- Toxizität unbekannter Isolate

Um dieser Problematik adäquate Lösungen bieten zu können, wurde im Rahmen dieses Projektes ein molekulargenetischer Test entwickelt, mit dem es möglich ist, jeden untersuchten Clostridienstamm eindeutig und auf schnellem Wege molekulargenetisch zu identifizieren (Typisierung via genetischen Fingerabdruck). Dieser Schritt ist besonders wichtig, um unerwünschte Kontaminationen rechtzeitig zu entdecken.

Die Erstellung der genetischen Fingerabdrücke lief über mehrere Stufen und Teilprozesse, die in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt sind.

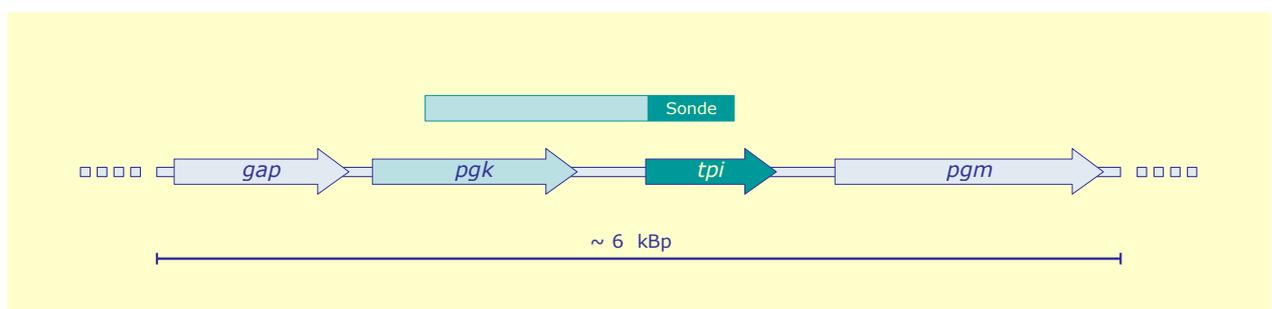


**Abbildung 2.3-4: Strukturierung der gentechnischen Arbeiten** bei der Erstellung genetischer Fingerabdrücke bei bakterieller Stämme bzw. Isolate (Typisierung).

### **Wahl der genomischen Region und Sondenherstellung**

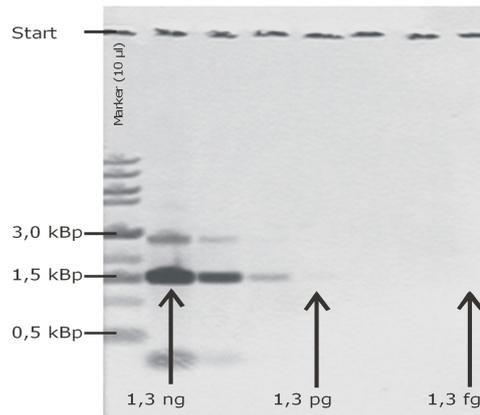
Für die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks wurde die Region des glykolytischen Operons und seiner Umgebung gewählt, weil sie dank ihrer ubiquitären Funktion (Glykolyse) bei nahezu allen Organismen vorzufinden und dementsprechend zu einer Identifizierung geeignet ist. Diese Region enthält sowohl hoch konservierte ORFs als auch variable DNA-Sequenzen (degenerierter genetischer Code und regulatorische Bereiche), was sie für die Erfassung spezifischer DNA-Differenzen zwischen einzelnen Spezies besonders tauglich macht.

Die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks erfolgt via Hybridisierung im Bereich des *tpi*-Gens (kodiert die ubiquitäre Triosephosphat-Isomerase; EC 5.3.1.1; TIM-Enzym) mit einer TIM-Sonde.



**Abbildung 2.3-5: Ausgewählte Region zur Typisierung von Arbeitsstämmen.** Der Ausschnitt aus dem glykolytischen Operon von *C. butyricum* ist hier schematisch dargestellt, die einzelnen ORFs sind durch hellgraue Blockpfeile symbolisiert. Die Herstellung eines genetischen Fingerabdrucks erfolgt via Hybridisierung im Bereich des ubiquitären *tpi*-Gens (Triosephosphat-Isomerase; TIM-Enzym) mit einer TIM-Sonde (grüner Balken).

Für die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks via Hybridisierung wurde die TIM-Sonde (partielles *tpi*-Gen aus *C. butyricum*) via PCR hergestellt, mit DIG-dUTP markiert und qualitativ sowie quantitativ getestet.



**Abbildung 2.3-6: Quantitativer Hybridisierungstest.** Rekombinante Southern-Hybridisierung unter stringen Bedingungen gegen TIM-Sonde. Die TIM-Sonde ergibt gute Signale ab einer Menge von etwa 13 pg transferierter DNA.

Spur 1: Marker,

Spuren 2...8: Transferierte homologe TIM-DNA-Probe in 0,1-Verdünnungsschritten von 1,3 ng bis 1,3 fg pro Spur.

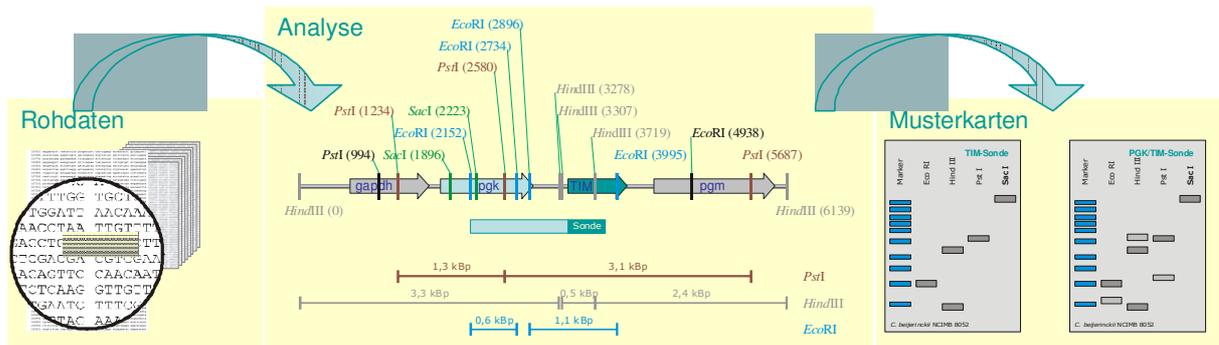
Die TIM-Sonde hat eine gute Spezifität und ergibt unter stringen Bedingungen deutlich sichtbare Signale ab einer Menge von etwa 13 pg transferierter DNA (**Abbildung 2.3-6**).

### **Herstellung von Musterkarten**

Die Herstellung der Musterkarten beinhaltet folgende Schritte:

- Screening von Datenbanken
  - DNA/Protein-Sequenzdaten
  - Import relevanter Sequenzen
  - Phylogenetische Untersuchung
- Daten-Analyse
  - Manuelle Analyse von DNA-Sequenzen (computergestützt)
  - Ergebniseintrag als Restriktionsfragmente (EcoRI, HindIII, PstI, SacI)
- Manuelle Auswertung in Form einer grafischen Musterkarte

Der Ablauf der Herstellung von Musterkarten ist am Beispiel einer Analyse von DNA aus *C. beijerinckii* NCIMB 8052 in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

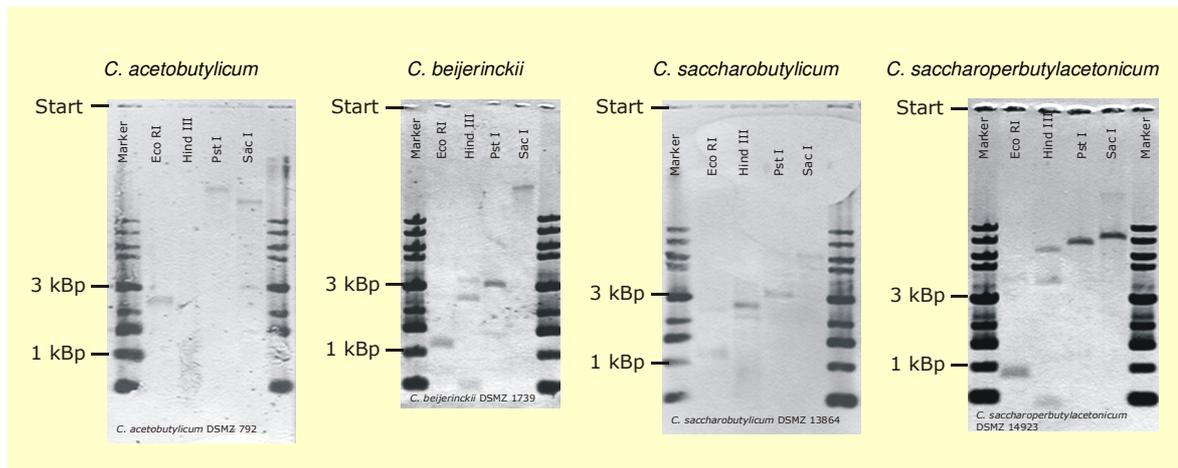


**Abbildung 2.3-7: Herstellung von Musterkarten.** Als Beispieldaten wurde die relevante DNA-Sequenz aus *C. beijerinckii* NCIMB 8052 gewählt. Die Datenbanken wurden nach DNA/Protein-Sequenzdaten filtriert, relevante Sequenzen werden als Rohdaten importiert, phylogenetisch untersucht und nach Restriktionsstellen analysiert. Das Restriktionsmuster am Locus der TIM-Sonde entspricht den Fragmentgrößen: EcoRI ca. 1kbp, HindIII ca. 0,5 kbp und ca. 2,4 kbp, PstI ca. 3,1 kbp und SacI > 10 kbp. Mit der kombinierten Sonde TIM/PGK erhalten wir das Restriktionsmuster: EcoRI ca. 0,5 kbp und ca. 1kbp, HindIII ca. 0,5 kbp, ca. 2,4 kbp und ca. 3,2 kbp, PstI ca. 1,3 kbp und ca. 3,1 kbp und SacI > 10 kbp. Die Ergebnisse der Analysen werden als Genkarte und Musterkarte graphisch dargestellt.

Die resultierende RFLP-Karte ist für jeden Organismus spezifisch (RFLP = restriction fragment length polymorphism), so dass sie wie ein Fingerabdruck zur Identifizierung bekannter Stämme verwendet werden kann. Darüber hinaus kann diese Methode auch zum Aufspüren von Kontaminationen oder Überprüfung der Kulturreinheit modifiziert sowie zur Identifizierung unbekannter Stämme erweitert werden.

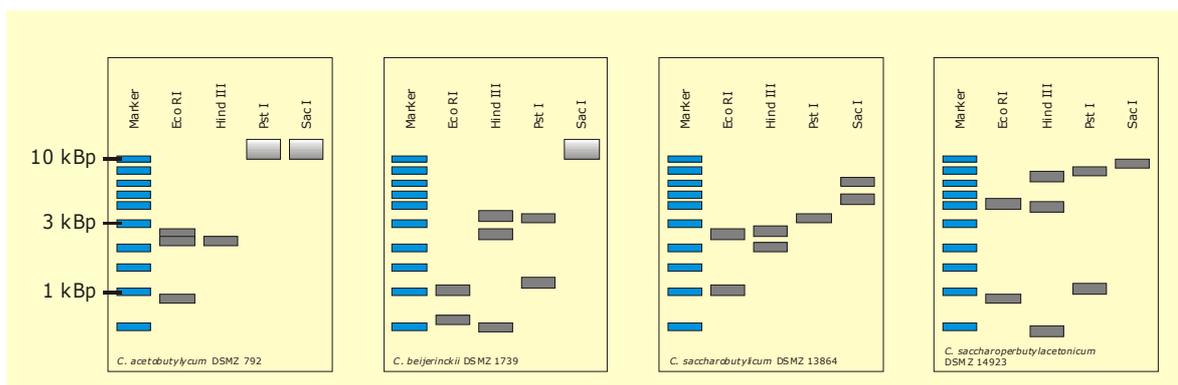
### Herstellung clostridialer RFLP-karten

Aus den untersuchten clostridialen Stämmen *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* wurde die genomische DNA isoliert und gereinigt, und die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII, PstI und SacI vollständig verdaut (je 2 µg DNA pro Enzym und Organismus). Nach elektrophoretischer Trennung der Restriktionsfragmente wurden diese per Southern-Transfer auf eine Membran übertragen und gegen die TIM/PGK-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung unter heterologen Konditionen und die Detektion wurden nach der Vorschrift des Kit-Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



**Abbildung 2.3-8: Hybridisierung genomischer DNA isoliert aus den vier etablierten clostridialen Butanol-Bildnern.** Hybridisierungssignale gegen TIM/PGK-Sonde aus *C. butyricum* unter heterologen Konditionen. Proben von links nach rechts: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum*.

Die Hybridisierungsmuster wurden analysiert und aus den Ergebnissen wurden die RFLP-Karten als genetische Fingerabdrücke abgeleitet. Anhand dieser genetischen Fingerabdrücke ist jede der vier Spezies eindeutig zu identifizieren.



**Abbildung 2.3-9: Abgeleitete RFLP-Karten als genetischer Fingerabdruck von vier etablierten clostridialen Butanol-Bildnern.** Von links nach rechts: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum*. Jede Spezies zeigt ein individuelles Bandenmuster, an dem sie eindeutig zu identifizieren ist.

### Ergebnis der Typisierung

Zur Identifizierung von Arbeitsstämmen und unbekanntem Isolat wurde eine effiziente Methode entwickelt, mit der es möglich ist, Arbeitsstämme eindeutig zu identifizieren sowie die Kulturreinheit zu überprüfen und Kontaminationen aufzuspüren. Diese Methode basiert auf Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, sie ist universell anwendbar und ihre Sensitivität reicht bis in den Zehner-Pikogramm-Bereich (DNA).

## Stammauswahl

Um die Erfolgsaussichten des geplanten Vorhabens zu steigern, müssen bei der Wahl des Butanol bildenden Stammes, dessen Butanol-Produktion gentechnisch verbessert werden sollte, essentielle biochemische, molekulargenetische und wirtschaftliche Basiskriterien erfüllt werden. Daher wurden mit vier etablierten Butanol bildenden Kandidaten Sondierungstests durchgeführt; anhand der Ergebnisdaten wurden komparative Eigenschaftsprofile der Kandidaten erstellt und ausgewertet.

## Untersuchte Butanol bildende Kandidaten

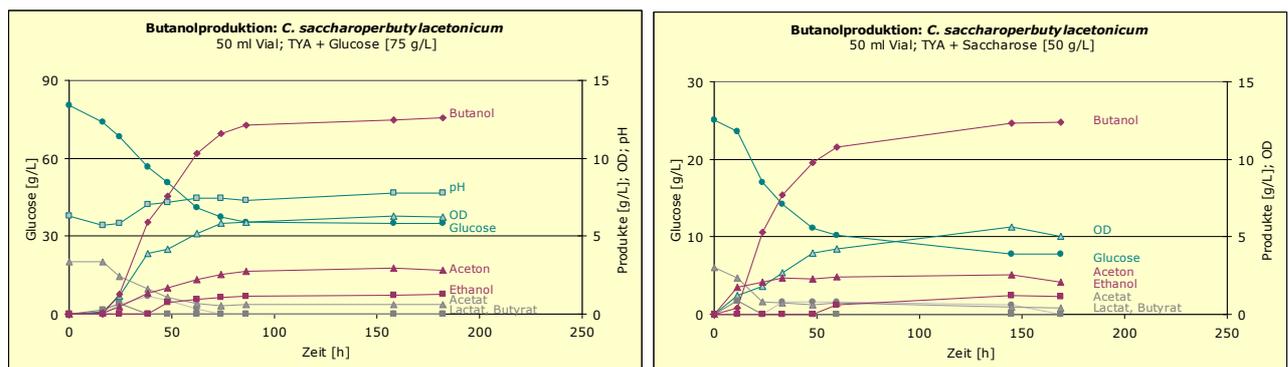
- *C. acetobutylicum* DSMZ 792
- *C. beijerinckii* DSMZ 1739
- *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864
- *C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 14923

## Ergebnisse der komparativen Analyse

Schon während der Kultivierung im 50-mL-Maßstab zeigten die Kandidaten deutliche Unterschiede im Wachstum, die sich auch auf die Butanol-Produktion auswirkten. Während *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* Zelldichten (erfasst als End-OD<sub>600</sub>) um die Werte 5...7 zuverlässig erreichen, schwanken diese Werte bei *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* zwischen 2...4.

Insbesondere die Butanol-Produktion, die als wichtigstes Auswahlkriterium angesehen wird, konnte mit *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* sehr schlecht reproduziert werden.

In den Sondierungstests zur Butanol-Produktion wurden mit dem Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* die besten Ergebnisse erzielt.



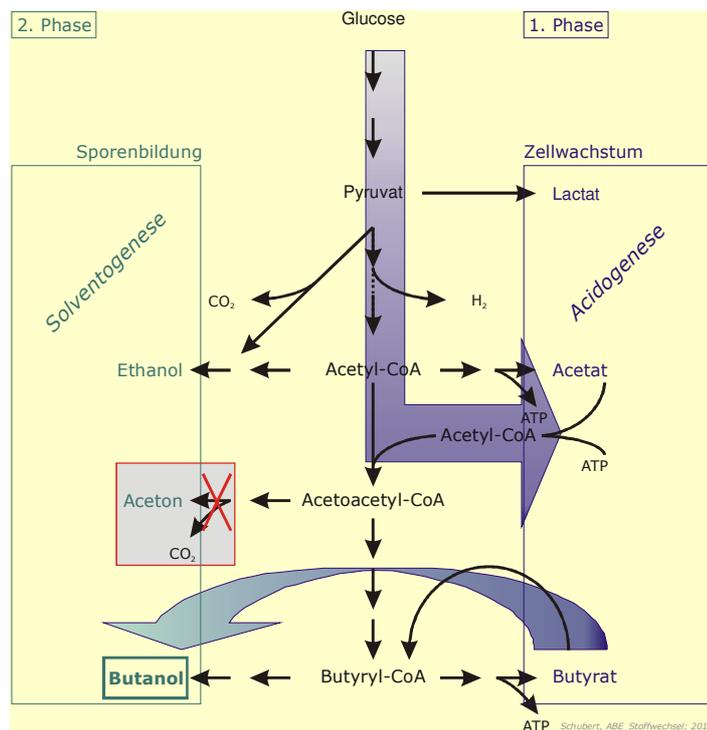
**Abbildung 2.3-10: *C. saccharoperbutylacetonicum*: Butanol-Produktion im 50-mL-Maßstab mit unterschiedlichen C-Quellen: Links: Glucose und rechts: Saccharose.**

Neben dem ubiquitären Substrat Glucose wurde als C-Quelle auch Saccharose getestet. Beide Substrate zeigten sich gleich gut geeignet, um interessante Kandidaten auf Butanol-Produktion schnell zu testen. Die mit *C. saccharoperbutylacetonicum* erreichten Butanol-Endkonzentrationen sind zuverlässig reproduzierbar und liegen im Bereich der höchsten veröffentlichten Literaturwerte [Tashiro et al. 2004]. Neben der hohen Butanol-Endkonzentration von über 12 g/L, die mit dem

Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* im 50-mL-Maßstab erreicht und zuverlässig reproduziert wurde, sprechen für diesen Kandidaten auch weitere Aspekte: Das günstige Verhältnis von Butanol<sub>gebildet</sub> zu C-Quelle<sub>verbraucht</sub> (0,34), das günstige Verhältnis von A:B:C (2:10:1) - insbesondere die niedrige Ethanol-Konzentration, die übereinstimmende Butanol-Produktion bei Verwendung von Saccharose (statt Glucose) als C-Quelle sowie die allgemeine Robustheit des Stammes.

### Enzym- und Methodenauswahl

Die Ergebnisse der Recherchen zur Butanol-Metabolismus und Analyse der metabolischen und molekulargenetischen Aspekte zur Auswahl des zu inaktivierenden Enzyms und der angewandten Methoden wurden im Bericht vom Mai 2010 detailliert erläutert.



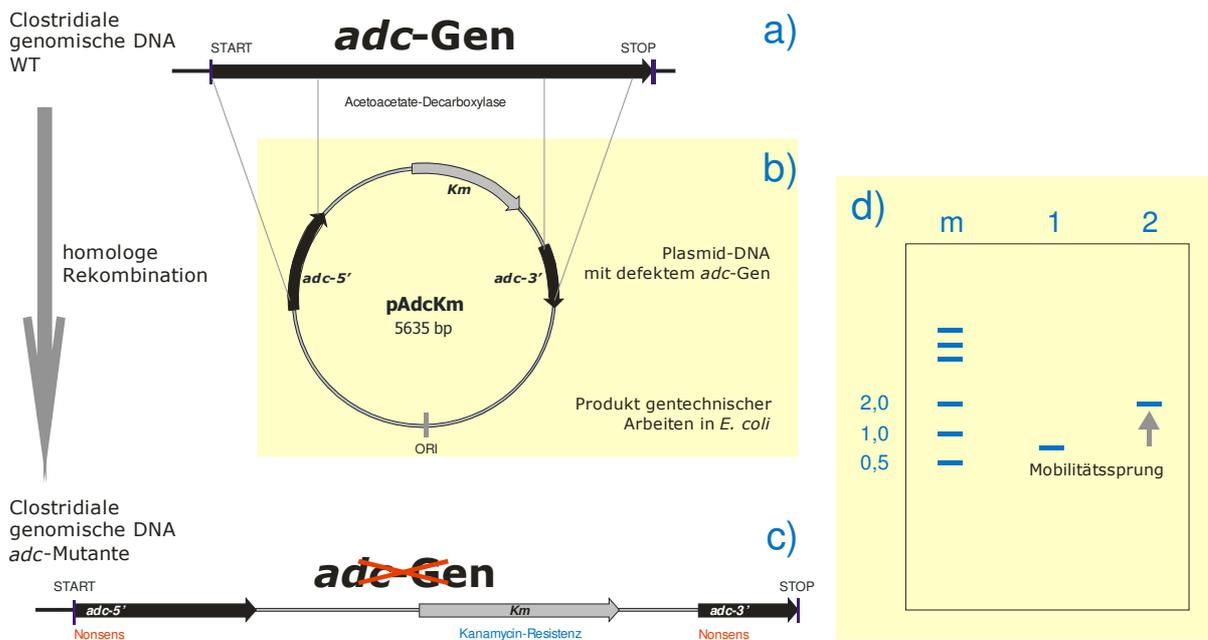
**Abbildung 2.3-11: Auswahl des zu inaktivierenden Enzyms im clostridialen ABE-Metabolismus.** Das Ausschalten des ausgewählten Enzyms Acetoacetat-Decarboxylase ist als rotes Kreuz symbolisiert. Durch diesen Schritt soll die Aceton-Bildung zugunsten von Butanol unterbunden werden.

Aus den Ergebnisdaten der biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurde für die gentechnische Manipulation zur Verbesserung des Produktspektrums das Schlüsselenzym der Solventogenese Acetoacetat-Decarboxylase (ADC-Enzym) ausgewählt, weil durch sein Ausschalten die folgende Reaktion stillgelegt werden kann (durch totale Zerstörung der Enzymfunktion).



## Insertionale Mutagenese (Übersicht)

Anhand der Ergebnisdaten der biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurde für die gentechnische Manipulation das ADC-Enzym (Acetoacetat-Decarboxylase) ausgewählt. Es handelt sich um das Schlüsselenzym der Solventogenese. Das zentrale Werkzeug für gentechnische Manipulationen von Stoffwechselwegen stellt die insertionale Mutagenese dar. Die insertionale Mutagenese erfolgt in mehreren Schritten, die in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt und erläutert sind.



**Abbildung 2.3-13: Insertionale Mutagenese.** Integration fremder DNA ins clostridiale Genom und ihre Verifizierung (schematisch, s. Text).

Die heterologen Bereiche des Plasmids (grau gefärbt) werden über homologe Bereiche (schwarze Balken) in das clostridiale Genom aufgenommen. (a) Ausschnitt chromosomaler WT-DNA am Locus des *adc*-Gens. (b) Durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette (*Km*) innerhalb des *adc*-Gens (schwarzer Balken mit Pfeil) wird dieses in einer Abfolge von gentechnischen Manipulationen *in vitro* inaktiviert. Diese Arbeiten werden in einem *E. coli*-Hilfesystem durchgeführt. Mit dem resultierenden Konstrukt, hier als *pAdcKm* symbolisiert, werden die clostridialen WT-Zellen transformiert. Die Integration fremder DNA in das clostridiale Genom erfolgt über homologe Rekombination, wobei das WT-*adc*-Gen durch das defekte ersetzt wird. Die übrige Plasmid-DNA (samt ORI) wird degradiert. (c) Das mutierte clostridiale Genom ist nun Kanamycin-resistent und *adc*- (funktionslose Acetoacetat-Decarboxylase). Die *adc*--Mutanten können auf Kanamycin-haltigem Medium leicht erfasst werden. (d) Segregation von clostridialen *adc*-Mutanten. Nach der Transformation mit defektem *adc*-Gen und Integration ins Genom werden die *adc*-Mutanten auf Kanamycin-haltigem Medium durch Steigerung der Kanamycin-Konzentration segregiert. Der Erfolg der Segregation kann durch genomische Southern-Hybridisierung kontrolliert werden. Das Restriktionsfragment des WT-*adc*-Gens (hier angenommen etwa 700 Bp; Spur Nr. 1) weist bei der vollständig segregierten Mutante einen Mobilitätssprung auf (hier bei etwa 2 kbp; Spur Nr. 2). Die Ursache für

diesen Mobilitätssprung liegt in der inserierten Kanamycin-Kassette (1,3 kbp) innerhalb des *adc*-Gens.

Die experimentelle Durchführung der insertionalen Mutagenese wurde in zwei Abschnitte geteilt:

1. Insertionale Mutagenese **in vitro**, die mit Hilfe von gentechnischen Manipulationen in einem *E. coli*-Hilfssystem abläuft, und
2. Insertionale Mutagenese **in vivo**, die mit den clostridialen Zellen zu realisieren ist, und nach einer erfolgreichen Transformation auch die Segregation der *adc*-Mutanten sowie eine Reihe von molekulargenetischen und physiologischen Tests beinhaltet.

### ***Insertionale Mutagenese in vitro***

#### *Experimenteller Ablauf der Mutagenese in vitro in der Übersicht*

- Werkzeugauswahl
- Isolierung und Klonierung des *adc*-Gens aus *C. saccharoperbutylacetonicum*
- Verifizierung der Ergebnisse
  - Authentizität des *adc*-Gens
  - Singularität des *adc*-Gens
- Inaktivierung des *adc*-Gens
  - Schnittstellenanalyse
  - Fragment-Präparation
  - Konstruktion
- Verifizierung der Ergebnisse
- Schutz des Endkonstruktes gegen Degradation

#### *Isolierung des *adc*-Gens und Klonierungsarbeiten*

Um das Ziel-Gen (*adc*-Gen aus *C. saccharoperbutylacetonicum*) inaktivieren zu können, war es erforderlich, es zuerst aus dem Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum* zu isolieren und anschließend in einem Hilfssystem zu klonieren. Zu diesem Zweck wurde ein Klonierung-Hilfssystem auf Basis von *E. coli* K12 ausgewählt. Den Wirtstamm JM105 (Amersham Pharmacia Biotech) kann man gut in LB-Medium kultivieren und er besitzt die Fähigkeiten, Plasmide der pUC-Reihe in einer hohen Kopienzahl zu replizieren. Am Lac-Promotor des pUC-Plasmids können in diesem Stamm fremde DNA-Insertionen detektiert werden (blau/weiß-Selektion). Der Stamm JM105 ist Streptomycin-resistent (25 µg/mL), Kanamycin- und Ampicillin-sensitiv; auf einem Minimalmedium benötigt er 1 g/mL Thiamin.

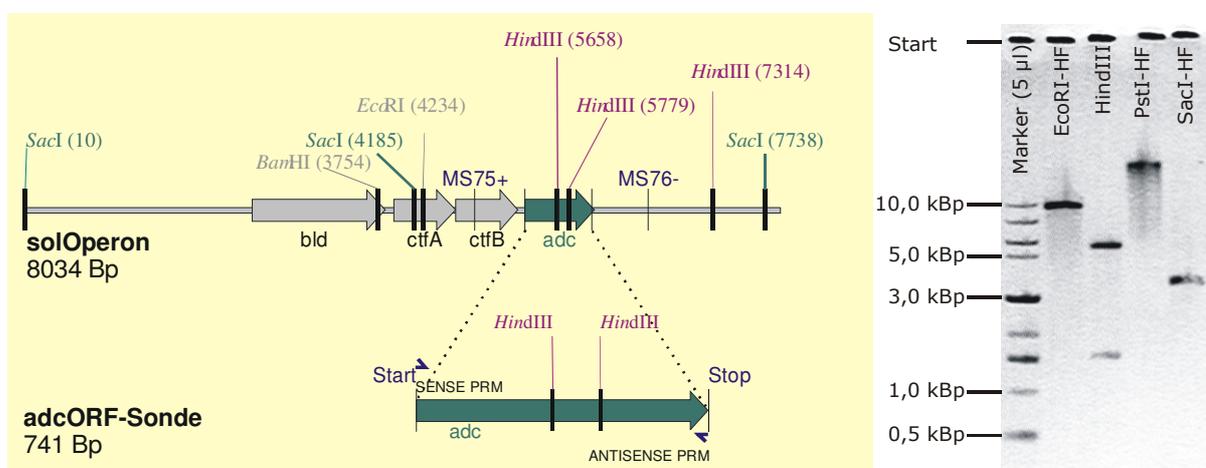
Als Basisvektor für die Klonierungsarbeiten wurde das Plasmid pUC19 genutzt (NEB Catalog# N3041S; GenBank Accession Number: L09137). Das doppelsträngige Plasmid enthält das ORI ColE1 und erreicht in einer *E. coli*-Zelle mehrere Hundert Kopien (high copy number-Plasmid). Für eine heterologe Expression kann der Lac-Promotor genutzt werden, dem zum komfortablen Klonieren eine MCS (multiple cloning site) mit singulären Schnittstellen für 13 verschiedene Restriktionsendonukleasen stromabwärts folgt.

Um ein wirksames Screening der clostridialen *adc*-Mutanten gewährleisten zu können, wurde in das Ziel-Gen ein Selektionsmarker integriert. Da *C. saccharoperbutylacetonicum* Kanamycin-sensitiv ist, wurde als Selektionsmarker ein Kanamycin-Resistenzgen ausgewählt. Das Kanamycin-Resistenzgen wurde als Km-Kassette aus dem Plasmid pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech; Prod. Nr. 27-4958) über die Restriktionsstellen *Eco* RI herausgeschnitten und in das offene Leseraster des *adc*-Gens inseriert. Der Empfänger dieser Kassette wird Kanamycin-resistent und kann auf Kanamycin-haltigem Medium wachsen.

### Verifizierung der Ergebnisse

Für eine erfolgreiche Inaktivierung der Acetoacetat-Decarboxylase (ADC) ist es essentiell, die Authentizität des ADC-kodierenden *adc*-Gens zu beweisen, um sicherzustellen, dass dieses Gen im Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum* gezielt zerstört werden kann. Wichtige Anforderungen an das Gen sind: Das isolierte *adc*-Gen stammt eindeutig aus dem Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum* (notwendige Bedingung für homologe Rekombination) und es ist ein „single-copy-gene (notwendige Bedingung für die insertionale Mutagenese). Der eindeutige Beweis der Authentizität des isolierten *adc*-Gens wurde per Nukleotidsequenz des *adcU*-Fragments erbracht.

Die Singularität des *adc*-Gens wurde mit Hilfe von Hybridisierungsverfahren ebenfalls eindeutig bewiesen. Die Hybridisierung unter stringenten Konditionen und die Detektion wurden nach der Vorschrift des Kit-Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



**Abbildung 2.3-14: Hybridisierung genomischer DNA aus *C. saccharoperbutylacetonicum*.**

Links: Genkarte des *sol*-Operons aus *C. saccharoperbutylacetonicum* und darunter der Bereich der Hybridisierung-Sonde (grüner Blockpfeil).

Rechts: Hybridisierungsfiler mit elektrophoretisch getrennten Restriktionsfragmenten hybridisiert gegen die *adc*-ORF-Sonde unter stringenten Bedingungen.

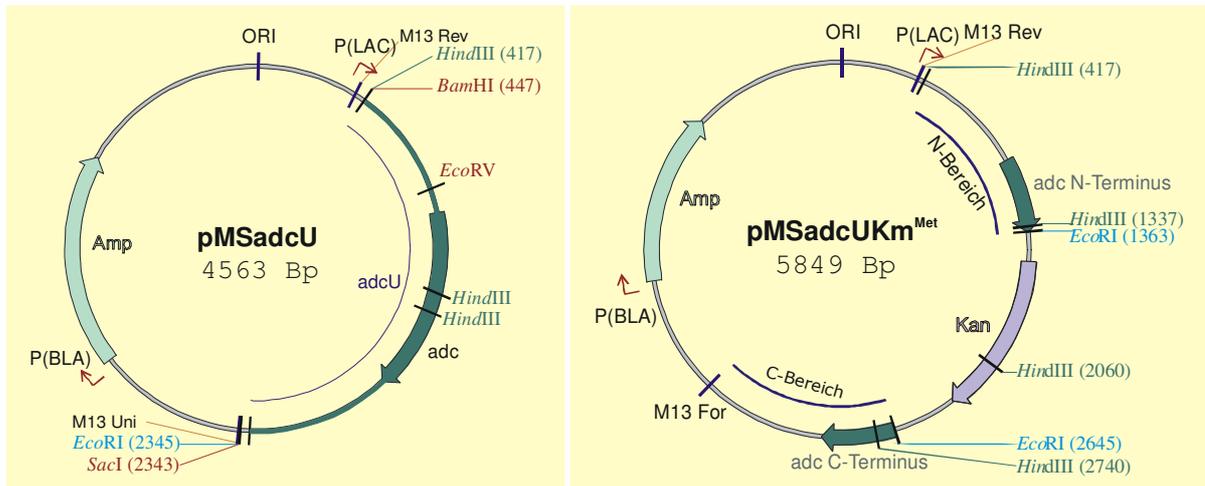
Die Hybridisierungssignale beweisen eindeutig die Singularität des *adc*-Gens im Genom von *C. saccharoperbutylacetonicum*.

### Inaktivierung des *adc*-Gens

Die Inaktivierung des *adc*-Gens erfolgte durch die Insertion einer Km-Kassette (s. oben) in das *adc*-ORF. Die Km-Kassette unterbricht den ADC-codierenden Bereich, so dass die Synthese des ADC-

Enzyms wirksam verhindert wird; gleichzeitig dient sie als Selektionsmarker für das nachgeschaltete Mutanten-Screening.

Das im Zuge der Klonierung hergestellte Plasmid pMSadcu wurde für die Inaktivierung des *adc*-Gens verwendet und ist in Form einer Restriktionskarte zusammen mit dem Endkonstrukt pMSadcuK<sup>Met</sup> in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 2.3-15: Restriktionskarte der Plasmide pMSadcu und pMSadcuK<sup>Met</sup>.** Das *adcU*-Fragment aus *C. saccharoperbutylacetonicum* (enthält das aktive *adc*-Gen und seine flankierende Umgebung) wurde in der Restriktionsstelle *Sma*I in pUC19 kloniert. Das resultierende Plasmid pMSadcu wurde anhand von Restriktionsfragment-Analyse kartiert. Das ORF der Acetoacetat-Decarboxylase (*adc*) ist durch einen dunkel grünen Blockpfeil symbolisiert. Durch die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens in das *adc*-ORF wurde das *adc*-Gen aus *C. saccharoperbutylacetonicum* inaktiviert.

Das Endkonstrukt wurde anschließend methyliert (pMSadcuK<sup>Met</sup>) und kann in dieser Form für die Transformation von *C. saccharoperbutylacetonicum* verwendet werden.

Alle geplanten und erforderlichen Schritte der insertionalen Mutagenese *in vitro* wurden erfolgreich durchgeführt und die Richtigkeit der Ergebnisse wurde mit international anerkannten Beweismitteln verifiziert. Mit der Beendigung der insertionalen Mutagenese *in vitro* wurde ein essentieller Meilenstein dieses Teilprojektes erreicht; das resultierende Plasmid pMSadcuK<sup>Met</sup> enthält alle genetischen Informationen für die insertionale Mutagenese über homologe Rekombination, und stellt somit die Ausgangsbasis für die insertionale Mutagenese *in vivo* dar.

#### **Ergebnis der insertionalen Mutagenese *in vitro*:**

Das *adc*-Gen wurde aus *C. saccharoperbutylacetonicum* isoliert, samt seiner Umgebung kloniert und per Nukleotidsequenz vollständig charakterisiert. Die Authentizität des *adc*-Gens (notwendige Bedingung für homologe Rekombination) sowie seine Singularität (notwendige Bedingung für insertionale Mutagenese) wurden eindeutig bewiesen. Darauf folgend wurde das *adc*-Gen inaktiviert. Das Endkonstrukt pMSadcuK<sup>Met</sup> enthält das inaktivierte *adc*-Gen aus *C. saccharoperbutylacetonicum* und über die inserierte Km-Kassette verleiht es seinem Träger eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Gleichzeitig ist es gegen Restriktasen (voll bzw. partiell) geschützt.

## ***Insertionale Mutagenese in vivo***

### *Experimenteller Ablauf der Mutagenese in vivo in der Übersicht*

- Analytik zum Screening der *adc*-Mutanten (genomische DNA)
  - Mobilitätssprung von spezifischen Amplifikaten
  - Mobilitätssprung von spezifischen Hybridisierungssignalen
- Transformation von *C. saccharoperbutylacetonicum* via Elektroporation
  - Testphase und Feststellung der minimalen Überlebensrate
  - Modifikationen der Transformationsbedingungen
  - Erarbeitung eines geeigneten Protokolls
- Inaktivierung des *adc*-Gens in *Clostridium* durch homologe Rekombination
- Mutanten-Screening
- Segregation der *adc*-Mutanten
- Verifizierung der Ergebnisse
- Physiologische Untersuchung der *adc*-Mutanten

Die Entwicklung der Analytik zum Screening der *adc*-Mutanten sowie ihre Funktion und eindeutige Reproduzierbarkeit sind in dem Abschnitt Methodenentwicklung und Infrastrukturaufbau ausführlich beschrieben.

### *Überlebensrate von C. saccharoperbutylacetonicum*

Bei einer Transformation ist es ohne großen Aufwand nicht zu vermeiden, die Zellen kurzfristig (bis zu einer Stunde) dem Luftsauerstoff auszusetzen. Auf ein anaerobes Bakterium kann der Sauerstoffeinfluss wie auch die Prozedur der Elektroporation schädlich oder sogar letal wirken. Deshalb wurde in einer Gruppe von Sondierungstests die Überlebensrate von *C. saccharoperbutylacetonicum* nach einer Transformation via Elektroporation getestet und bei jeder Transformations-Versuchsreihe als separate Probe kontrolliert.

Mit einer Transformationsrate von  $6,25 \times 10^{-6} / \mu\text{g DNA}$ , die nach unserer Erfahrung mit Clostridien maximal erwartet werden kann, werden bei einem Einsatz von  $9 \times 10^7$  Zellen mindestens 160.000 überlebende Zellen benötigt, um ein erfolgreiches Transformationsereignis erwarten zu können. Das entspricht einer Überlebensrate von mindestens 1,8 ‰. Die nach unseren Transformationsprotokollen getestete Überlebensrate von *C. saccharoperbutylacetonicum* liegt in allen getesteten Kulturmedien deutlich über 3 ‰.

### ***Ergebnis der insertionalen Mutagenese in vivo:***

Die Überlebensrate bei *C. saccharoperbutylacetonicum* nach einer Transformation via Elektroporation erreicht in allen getesteten Kulturmedien mindestens 3 ‰ und bewegt sich in der erforderlichen Größenordnung. Mit dem Einsatz von 10  $\mu\text{g DNA}$  pro Transformation sind etwa 20 erfolgreiche Ereignisse (Transformanden-Kandidaten) zu erwarten.

### *Ergebnisse der Transformationstests mit C. saccharoperbutylaceticum*

Während der Erforschung geeigneter Transformationsprotokolle wurden über 60 Transformationen durchgeführt, mehrere Parameter in diversen Kombinationen wurden modifiziert, und die Auswirkung auf die Transformations- bzw. Überlebensrate wurde untersucht. Die Parameterkombinationen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt (vgl. Methodenentwicklung und Infrastrukturaufbau) und sind in der folgenden **Tabelle 2.3-4** als Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 differenziert: Anhand der Überlebensrate, die aus einer Kontrollprobe, die ohne Selektionsdruck inkubiert wurde, in jeder Versuchsreihe ermittelt wurde, konnte abgeschätzt werden, ob die getesteten Parameter die Lebensfähigkeit der Zellen grundsätzlich beeinträchtigen (s. Spalte **Überlebende**). Die Anzahl der Mutanten-Kandidaten-Kolonien auf Selektionsplatten diente zur Beurteilung der generellen Eignung der Parameterwerte (s. Spalte **Kandidaten**). Die Ergebnisse der Transformationstests sind in den **Versuchsreihen I ... XVI.** zusammengefasst.

**Tabelle 2.3-4:** Zusammenfassende Ergebnisse der Transformationstests

	Reihe <sup>*)</sup>	Medien	Schutz	Überlebende	Kandidaten	Wachstum <sup>***)</sup>	Butanol
Gruppe 1	I.	TPGY TYA	d+G/H	Zellrasen	ca. 4.000 <sup>**)</sup>	2	ja
	II.	TPGY TYA	d+G/H	--- <sup>†)</sup>	0	0	-
	III.	TPGY TYA	d+G/H	Zellrasen	25	4	ja
	IV.	TPGY TYA	d+G/H	Zellrasen	7	7	ja
	V.	RCM TYA	d+G/H	Zellrasen	150	3	ja
	VI.	RCM TYA	d+G/H	Zellrasen	17	1	ja
	VII.	RCM TYA	d+G/H	Null <sup>††)</sup>	0	-	-
	VIII.	RCM TYA	d+M/Ha	Zellrasen	0	-	-
	IX.	RCM TYA	d+M/Ha	Zellrasen	0	-	-
	X.	RCM TYA	d+M/Ha	Zellrasen	0	-	-
	XI.	RCM TYA	d+M/Ha	Zellrasen	0	-	-
	XII.	RCM TYA	d+M/Ha	Zellrasen	0	-	-
Gruppe 2	XIII.	RCM TYA	d+H	Null <sup>†††)</sup>	0	-	-
	XIV.	RCM TYA	d+H	Zellrasen	0	-	-
	XV.	RCM TYA	d+H	Zellrasen	0	-	-
	XVI.	RCM TYA	d+H	Zellrasen	0	-	-

**Fettdruck:** Modifikation, die weiterkultivierbare Mutanten-Kandidaten-Kolonien ergaben

Zellrasen: >3 x 10<sup>5</sup> Kolonien pro Transformation

Null: keine einzige Kolonie auf Kontrollplatten

\*) jede Versuchsreihe beinhaltet 3...4 Transformationen

\*\*\*) Artefakt durch fehlerhafte Selektionsplatten

\*\*\*\*) Wachstum in flüssigem Selektionsmedium nach Überimpfung einer Kandidaten-Einzelkolonie

†) Versuchsreihe misslungen

††) N2-Spülung vor der Adaptation und selektiver Inkubation

†††) SMP-Puffer

### Kulturmedium

Getestet wurden drei Kulturmedien: TPGY, TYA und RCM. Obwohl die Überlebensrate auf allen drei Kulturmedien ausreichend war (Zellrasen), wurde das TPGYKm-Medium für die Selektion als ungeeignet eingestuft, weil in keiner Versuchsreihe Mutanten-Kandidaten beobachtet wurden. Demgegenüber wuchsen auf dem RCMKm-Medium zahlreiche Kolonien (Mutanten-Kandidaten), die sich jedoch sehr schwer weiterkultivieren ließen; weniger als 5 % der Kandidaten-Kolonien von den RCMKm-Platten wuchsen nach der Überimpfung an. In der Versuchsreihe V. wurden zwar auf den RCMKm-Platten über 140 Mutanten-Kandidaten erzielt, es ließ sich jedoch keine einzige weiterkultivieren.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem TYA-Medium erreicht; etwa 25...100 % der Kandidaten-Kolonien von den TYAKm-Platten wuchsen nach der ersten Überimpfung zu einer ausreichenden End-OD an.

#### *Sauerstoffeinfluss*

Obwohl der temporäre Sauerstoffeinfluss die Anzahl der Überlebenden durchaus reduzieren kann, stellt er für die Transformation kein grundlegendes Problem dar, denn die Anzahl der Überlebenden aus einer Transformation unter temporärem Sauerstoffeinfluss ist vergleichbar (Zellrasen) mit der aus einer Transformation, die vollständig unter anaeroben Bedingungen (A-Bank) durchgeführt wurde.

Demgegenüber wirkte sich eine N<sub>2</sub>-Spülung vor der Adaptation und vor der selektiven Inkubation auf die Zellen letal aus; es gab keine einzige überlebende Kolonie, während die parallele Versuchsreihe ohne eine N<sub>2</sub>-Spülung auf der Kontrollplatte einen Zellrasen von Überlebenden ergab.

#### *Reaktionspuffer*

Getestet wurden zwei Reaktionspuffer: 10 % PEG800 und der SMP-Puffer. Hier hat sich 10 % PEG800 eindeutig als der geeignete Reaktionspuffer erwiesen, während der SMP-Puffer keine Überlebenden ergab.

#### *Erfolgreichstes Transformationsprotokoll*

Anhand der über 60 Transformationstests, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt und ausgewertet wurden, wurde ein Transformationsprotokoll erstellt, mit dem adc-Mutanten reproduzierbar erzeugt wurden, und das anhand der Anzahl der erzeugten weiter kultivierbaren adc-Mutanten-Kandidaten als die bisher beste Kombination der modifizierten Parameter betrachtet werden darf.

**Tabelle 2.3-5:** Erfolgreichstes Transformationsprotokoll

Modifizierte Parameter	Werte
Kulturmedium	TYA
DNA-Methylierung	<i>dam</i> und zusätzlich H bzw. G
Reaktionspuffer	10 % PEG <sub>800</sub>
Sauerstoffeinfluss*)	ca. 0,5...1 h
<b>Elektroporation:</b>	
Feldstärke	6,25 kV/cm
Küvettenlänge	4 mm
Temperatur	0 °C
DNA-Menge	10 µg
Prozedur-Temperatur*)	0 °C; kontinuierlich gekühlt
Adaptationsmedium	TYA + 25 mM MgCl <sub>2</sub>
Selektionsmedium	TYA <sup>Km</sup> bzw. RCM <sup>Km</sup>

Km Kanamycin (0,05...0,1 g/L)

\*) ab der Zellernte bis zur Adaptation

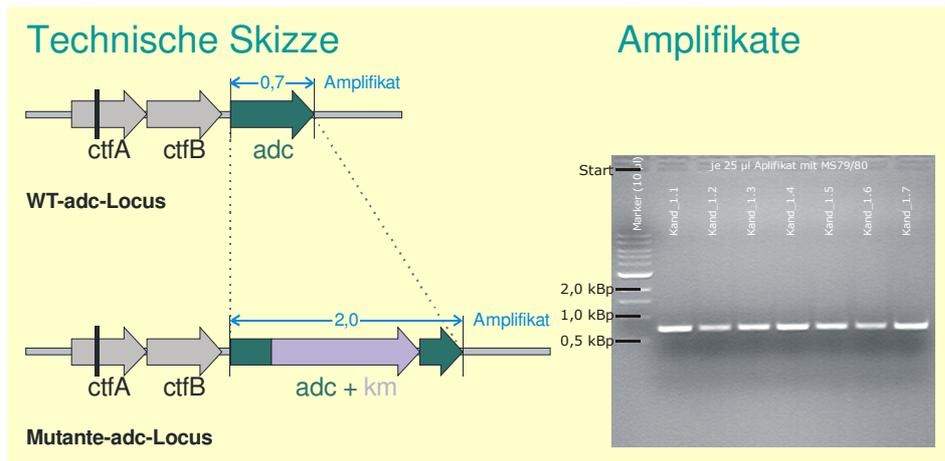
Obwohl dieses Transformationsprotokoll gut reproduzierbar ist, bedarf es noch einige Optimierungen zur Erhöhung der Transformationsrate und der Lebenserwartung der noch extrem fragilen *adc*-Mutanten.

### **Screening der *adc*-Mutanten-Kandidaten**

Alle *adc*-Mutanten-Kandidaten (etwa 200...220 Kolonien), die aus den über 60 Transformations-tests nach der ersten selektiven Inkubation hervorgingen, wurden in Kanamycin-haltigem Selektionsmedium weiter kultiviert, angewachsen sind insgesamt 17, und mit ihnen wurde eine umfassende Untersuchung auf molekularem und physiologischem Niveau durchgeführt. Der Übersichtlichkeit wegen werden hier die Ergebnisse der 7 *adc*-Mutanten-Kandidaten aus der Versuchsreihe IV. ausführlich und bebildert dargestellt, sie entsprechen in allen Punkten den übrigen 10 *adc*-Mutanten-Kandidaten.

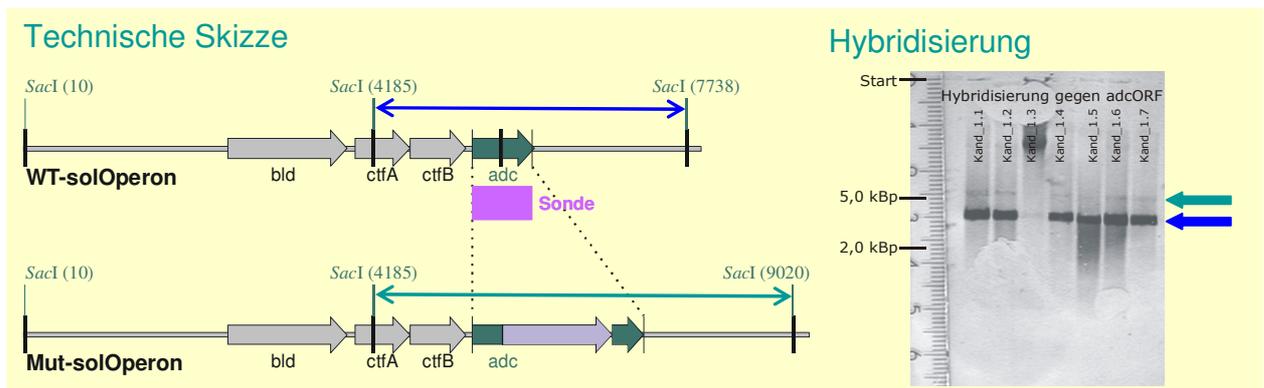
### **Mobilitätssprung spezifischer Amplifivate bzw. Hybridisierungssignale**

Um den Erfolg der insertionalen Mutagenese *in vivo* zu prüfen, wurden zwei molekulargenetische Kontrolltests durchgeführt, mit denen sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die *adc*-Mutanten eindeutig zu identifizieren sind. Die beiden Tests unterscheiden sich in ihrer Aussagekraft. Der Amplifikat-Test ist deutlich schneller durchgeführt als der Hybridisierungstest, weshalb er als Routine erster Wahl eingesetzt wurde. Seine Schwäche liegt in seiner begrenzten Aussagekraft beim Untersuchen von heterogenen DNA-Populationen z.B. aus dualen Kulturen, wie es der vorliegende Fall zeigt.



**Abbildung 2.3-16: Analyse der *adc*-Mutanten-Kandidaten aus der Versuchsreihe IV. via Mobilitätsprung spezifischer Amplifikate.** Alle Amplifikate wurden mit denselben Primer-Paaren MS79+/MS80- erzeugt, als Matrice diente genomische DNA der *adc*-Mutanten-Kandidaten aus der Versuchsreihe IV. Die Größe der sichtbaren Amplifikate aus den *adc*-Mutante-Kandidaten entspricht dem Wildtyp (0,7 kBp).

In der Amplifikat-Analyse aller untersuchten *adc*-Mutanten-Kandidaten wird nur die DNA aus den Wildtyp-Zellen sichtbar, erst in dem Hybridisierungstest, der deutlich sensitiv ist, konnte auch die *adc*-Mutanten-DNA visualisiert werden (s. folgende Abbildung).



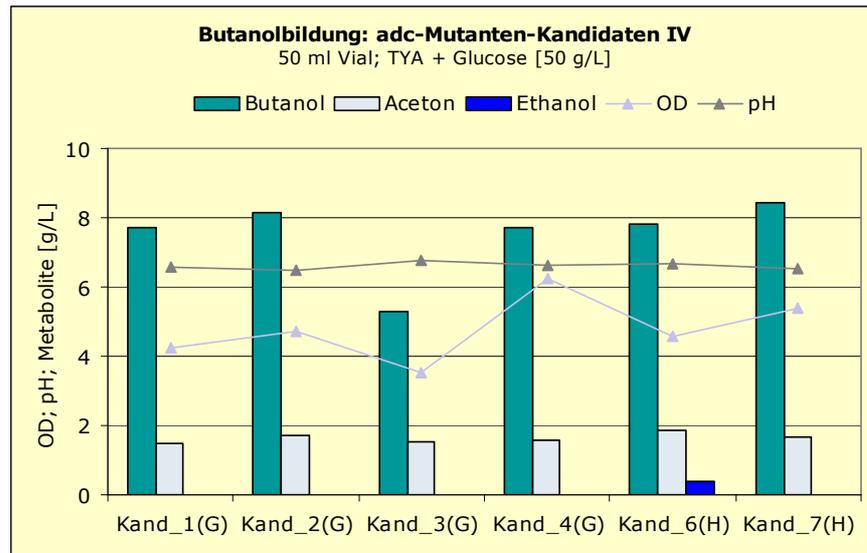
**Abbildung 2.3-17: Analyse der *adc*-Mutanten-Kandidaten aus der Versuchsreihe IV. via Mobilitätsprung spezifischer Hybridisierungssignale.** Die DNA aus den getesteten Kandidaten ergab nach einer Hybridisierung gegen die *adc*-Sonde unter stringenten Konditionen beide Signale: Wildtyp (3,5 kBp) und Mutantentyp (4,8 kBp). Das bedeutet, dass es sich bei den Kandidaten um duale Kulturen handelte. Sie enthielten sowohl die Wildtyp- als auch die *adc*-Mutanten-Zellen. Nach einer semiquantitativen Schätzung der sichtbaren Signale enthielten die Proben ca. 10 % *adc*-Mutanten und ca. 90 % Wildtyp-Zellen.

Als Ursache dieses Phänomens werden duale Kulturen (*adc*-Mutante und Wildtyp-Zelle in einer Kolonie) angenommen. Die Wildtyp-Zelle kann auf Kanamycin-haltigem Medium nicht wachsen. Befindet sie sich jedoch in unmittelbarer Nachbarschaft der *adc*-Mutante, die ja Kanamycin-resistent ist, wächst die Wildtyp-Zelle, weil das Agar-Areal (in mikroskopischem Maßstab) durch die *adc*-Mutante stetig entgiftet wird. Eine solche Einzelkolonie enthält dann zwei heterogene Zellpopulationen: Die ursprüngliche Wildtyp-Zelle und die *adc*-Mutante. Eine vollständige Segrega-

tion der *adc*-Mutante wäre nur dann möglich, wenn die *adc*-Mutante über mehrere Generationen autonom wachsen würde, was in keiner der Versuchsreihen der Fall war.

#### *Butanol-Bildung der adc-Mutanten-Kandidaten*

Im Rahmen der physiologischen Untersuchung wurde die Butanol-Bildung aller *adc*-Mutanten-Kandidaten unter Standardbedingungen (anaerob) in mehreren Versuchsreihen analysiert. Die graphische Zusammenfassung der Auswertung, stellvertretend die Versuchsreihe IV, ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 2.3-18: Butanol-Bildung der *adc*-Mutanten-Kandidaten aus der Versuchsreihe IV.** Nach einer Kultivierungszeit von etwa 170...240 h erreichten die Butanol-Konzentrationen den Wert von  $8,0 \pm 0,4$  g/L bei einem Glucose-Verbrauch von ca. 40 g/L.

Kultiviert wurde ca. 170...240 h in 50-mL-Fläschchen mit TYAKm-Medium bei 30 °C; die Glucose-Startkonzentration betrug 50 g/L. Nach der Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert, das klare Medium wurde per HPLC analysiert und die Ergebnisse wurden komparativ ausgewertet.

Unter Berücksichtigung des sehr langsamen Wachstums der *adc*-Mutanten-Kandidaten ist die Butanol-Bildung durchaus vergleichbar mit dem Referenzstamm (*C. saccharoperbutylacetonicum* Wildtyp). Die Butanol-Konzentrationen erreichen  $8,0 \pm 0,4$  g/L bei einem Glucose-Verbrauch von ca. 40 g/L. Da bei diesen Butanol-Konzentrationen Ethanol in noch nicht messbaren Konzentrationen gebildet wird, wurde in dieser Versuchsreihe das AB-Verhältnis (Aceton:Butanol) komparativ ausgewertet. Der Mittelwert des AB-Verhältnis liegt bei 1:4,8 und entspricht annähernd dem AB-Verhältnis des Referenzstammes (1:4,4).

Dieses Ergebnis entspricht dem dualen Charakter der *adc*-Mutanten-Kandidaten-Kulturen. Die Wildtyp-Zelle kann auf Kanamycin-haltigem Medium nicht wachsen. In einer unmittelbaren Nachbarschaft (mikroskopisch betrachtet) zu der *adc*-Mutante, die Kanamycin-resistent ist, wächst auch die Wildtyp-Zelle. Die duale Kultur enthält zwei heterogene Zellpopulationen: Die ursprüngliche Wildtyp-Zelle und die *adc*-Mutante.

Solange die *adc*-Mutanten nicht vollständig segregiert wurden, kann aus dem AB-Verhältnis keine Aussage über die Auswirkung der Mutation getroffen werden, weil die Konzentration der Lösungsmittel durch die Leistung der Wildtyp-Zelle beeinflusst wird. In unserem Falle wurde die Konzentration der Lösungsmittel durch die Leistung der Wildtyp-Zelle sogar bestimmt, weil ihr Anteil in der dualen Kultur auf ca. 90 % geschätzt wird (vgl. Mobilitätssprung spezifischer Hybridisierungssignale im vorherigen Abschnitt).

### **Diskussion der Ergebnisse im Screening der *adc*-Mutanten Kandidaten**

Das Screening der *adc*-Mutanten-Kandidaten dient der Bewertung des Erfolges der insertionalen Mutagenese *in vivo*, wobei zwei grundlegende Fragen beantwortet werden müssen:

- Ist es gelungen, die gewünschten *adc*-Mutanten zu erzeugen?
- Sind die *adc*-Mutanten autonom lebensfähig und über mehrere Generationen stabil, um sie vollständig segregieren zu können?

Aus den Ergebnissen des Mutanten-Screenings ist deutlich geworden, dass die *adc*-Mutanten-Kandidaten duale Kulturen bilden, weshalb keine eindeutige zusammenfassende Interpretation der betrachteten Merkmale möglich ist. Bei der Beantwortung der ersten Frage ist es wichtig, die Merkmale differenziert zu gewichten, weil die phänotypische Ausprägung vieler Merkmale, wie z. B. die Butanol-Bildung oder das AB-Verhältnis, durch den dualen Charakter der Kultur verzerrt wird. Dieser Sachverhalt ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.3-6:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Mutanten-Screenings

<b>Merkmal</b>	<b>Ausprägung/Wert</b>	<b>Typ</b>	<b>Methode</b>
<b>Mobilitätssprung spezifischer Amplifikate</b>	Amplifikatgröße: 0,7 kBp	Wildtyp	Molekular
<b>Mobilitätssprung spezifischer Hybridisierungssignale</b>	Signalgröße: 3,5 kBp und <b>4,8 kBp</b>	Wildtyp <i>und</i> <i>adc</i> - Mutante	Molekular
<b>Kanamycin-Resistenz</b>	<b>Vorhanden:</b> <b>50 bis 100 µg/mL</b>	<i>adc</i> -Mutante	Physiologisch
<b>Wachstum</b>	Sehr langsam <sup>*)</sup>	<i>adc</i> -Mutante	Physiologisch
<b>Robustheit</b>	Extrem fragil <sup>**)</sup>	<i>adc</i> -Mutante	Physiologisch
<b>Butanol-Bildung</b>	8,0 ± 0,4 g/L	Wildtyp	Physiologisch
<b>AB-Verhältnis</b>	1:4,8	Wildtyp	Physiologisch

**Fettdruck** dargestellte Merkmale sind *adc*-Mutanten-spezifisch und sind bei dem Wildtyp nie beobachtet worden  
<sup>\*)</sup> Wachstumsgeschwindigkeit beträgt etwa 20...30 % der des Wildtyps  
<sup>\*\*)</sup> Die Zellen lassen sich schwer kultivieren, nur wenige wachsen in der zweiten Generation an, spätestens nach 4 Wochen starben sie ab

Hieraus geht deutlich hervor, dass die beiden Merkmale Mobilitätssprung spezifischer Hybridisierungssignale und Kanamycin-Resistenz eindeutig als *adc*-Mutanten-spezifisch zu bewerten sind, weil der ermittelte Wert den genauen Voraussagen folgt. Der Mobilitätssprung spezifischer Hybridisierungssignale erfolgte nicht um irgendeinen Wert, sondern exakt um den vorausgesagten Wert 1,3 kBp von 3,5 kBp auf 4,8 kBp. Demgegenüber kann das AB-Verhältnis in diesem Zusammenhang

überhaupt nicht gewichtet werden, weil dieses Verhältnis durch die Wildtyp-Zellen, die etwa 90 % der dualen Kultur ausmachen dürften, bestimmt wird, und keine Aussage über die Verhältnisse in der *adc*-Mutante erlauben. Somit kann die erste Frage mit ja beantwortet werden: Es ist uns gelungen, die gewünschten *adc*-Mutanten zu erzeugen.

Um die Frage der autonomen Lebensfähigkeit und Stabilität der *adc*-Mutanten beantworten zu können, reichte die sehr knapp bemessene Projektzeit nicht aus. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transformation erfolgreich war und *adc*-Mutanten erzeugt wurden, jedoch stehen die niedrige Transformationsrate und die extreme Fragilität der Mutanten dem gewünschten physiologischen Erfolg im Wege. Insbesondere das zweite Problem hat zur Folge, dass eine Segregation der *adc*-Mutanten zum jetzigen Zeitpunkt unmöglich ist.

#### ***Ergebnis der insertionalen Mutagenese in vivo***

Es wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem *adc*-Mutanten reproduzierbar erzeugt werden können. Der Erfolg der insertionalen Mutagenese *in vivo* wurde molekulargenetisch eindeutig bewiesen. Das inaktivierte *adc*-Gen wurde nach einer Transformation in das Genom der Wildtyp-Zellen von *C. saccharoperbutylacetonicum* integriert, und *adc*-Mutanten wurden erzeugt. Die *adc*-Mutanten erwarben die bezweckte Kanamycin-Resistenz, waren jedoch physiologisch extrem fragil, so dass ihre vollständige Segregation und detaillierte biochemische Untersuchung in der knapp bemessenen Projektzeit unmöglich waren.

### **2.3.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die gentechnischen Arbeiten in diesem Projektteil sind breit gefächert und wurden in zwei Teilgebiete gegliedert:

- Typisierung bakterieller Stämme via genetischen Fingerabdruck
- Verbesserung des Produktspektrums durch Pathway-Design

Zusammenfassend betrachtet wurden die ambitionierten Ziele beider Teilgebiete der gentechnischen Entwicklungs- und Konstruktionsarbeiten erreicht und die Funktionalität der einzelnen Konstruktionsergebnisse wurde erfolgreich verifiziert.

Zur Identifizierung von Arbeitsstämmen und unbekanntem Isolat wurde eine effiziente Methode entwickelt, mit der es möglich ist, Arbeitsstämme eindeutig zu identifizieren sowie die Kulturreinheit zu überprüfen und Kontaminationen aufzuspüren. Diese Methode basiert auf Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, sie ist universell anwendbar und ihre Sensitivität reicht in Zehner Pikogramm DNA. Die Funktionalität dieser Methode wurde mit mehreren clostridialen Stämmen experimentell erfolgreich verifiziert.

Für die gentechnischen Manipulationen (Pathway-Design) zur Verbesserung des Produktspektrums in der fermentativen Butanol-Herstellung wurde der Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* (DSMZ 14923) ausgewählt. Das Pathway-Design erfolgte durch das Ausschalten von Acetoacetat-Decarboxylase, dem Schlüsselenzym der Solventogenese, mit Hilfe von insertionaler Mutagenese.

Das Endkonstrukt der insertionalen Mutagenese in vitro, das Plasmid pMSadcUKmMet, enthält das inaktivierte *adc*-Gen aus *C. saccharoperbutylacetonicum* und über die inserierte Km-Kassette, deren Funktionalität auch in vivo erfolgreich verifiziert wurde, verleiht es seinem Träger eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin.

Es wurde ein Transformationsprotokoll erarbeitet, mit dem *adc*-Mutanten reproduzierbar erzeugt wurden, und auch der Erfolg der insertionalen Mutagenese in vivo wurde molekulargenetisch eindeutig bewiesen. Die *adc*-Mutanten erwarben die bezweckte Kanamycin-Resistenz, waren jedoch physiologisch extrem fragil, so dass ihre vollständige Segregation und detaillierte biochemische Untersuchung in der knapp bemessenen Projektzeit unmöglich waren.

Über die physiologische Funktion (das Ausbleiben der Aceton-Bildung zugunsten höherer Butanol-Endkonzentration) können zu diesem Zeitpunkt keine Aussagen gemacht werden; die Butanol-bildende Funktion der *adc*-Mutanten lässt sich erst nach ihrer vollständigen Segregation untersuchen und bewerten.

Es ist erforderlich, die Transformations- und Kultivierungsbedingungen zu optimieren, um die Anzahl der Transformanden deutlich zu steigern, und damit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, robustere Mutanten zu erhalten. Da es auf diesem Gebiet weltweit bisher keine Erfahrungswerte gibt, müssen diese Bedingungen in zeitintensiven Laborexperimenten durch Ausprobieren herausgefunden werden.

Insbesondere die Modifikation der Spannungstärke bei der Elektroporation und der Temperatur an definierten Punkten bzw. in definierten Phasen des Transformationsprozesses könnten einen signifikant positiven Einfluss auf die Anzahl der Mutanten-Kandidaten und deren Lebenserwartung haben, und somit die Erfolgsaussichten des Vorhabens deutlich erhöhen.

## **2.4 Entwicklung und Optimierung der Fermentation (AP 4)**

### **2.4.1 Methodik**

#### ***Fermenteranlage***

Für die Reaktorversuche wurde ein Fermenterstand mit parallel betreibbaren Glasreaktoren verwendet und an den Prozess angepasst. In dieser Anlage können Temperatur, Redoxpotential und pH-Wert überwacht werden. Eine pH-Wert gesteuerte oder Substrat- und Produktabhängige (HPLC) automatische Nachfütterung erlaubt Fermentationen im Batch- und Fed-Batch Betrieb. Eine Optimierung der Konversion zu Butanol erfolgte durch die Änderung der Medienzusammensetzung, mögliche Fütterungsstrategien und Variationen verschiedener Prozessparameter.

#### ***Kultivierungsversuche mit Clostridium saccharoperbutylacetonicum (DSM 14923)***

Erste Kultivierungsversuche in 50 mL Vials und auf Agarplatten wurden durchgeführt, um den Umgang mit dem Stamm, bezüglich Sauerstoffempfindlichkeit, Kontaminationsgefahr und Praktikabilität, zu erproben. Das Animpfen unter anaeroben Bedingungen ist notwendig. Allerdings können geringe Sauerstoffkonzentrationen toleriert werden, wenn eine ausreichend hohe Zell-

dichte erreicht ist. Unter sterilen Bedingungen besteht auch keine erkennbare Kontaminationsgefahr, zumal unter anaeroben Bedingungen ein zusätzlicher Selektionsdruck zu Gunsten anaerober Organismen besteht.

Die Inkubation in Mikrotiterplatten unter anaeroben Bedingungen wurde ebenfalls getestet, konnte aber leider nicht für weitere Versuche genutzt werden, da eine zu starke Gasentwicklung die Messung der Zelldicht durch Bläschen behinderte und zu Kreuzkontaminationen führte. Außerdem entwichen die flüchtigen Endprodukte (Aceton, Butanol, Ethanol) aus den Kunststoff-Wells, was zu falschen Ergebnissen bei der Produktmessung führte.

### **Stammauswahl**

Clostridien als anaerobe Sporenbildner sind robuste Organismen und zeichnen sich durch ein breites Substratnutzungsspektrum aus. Diese Gattung ist natürlicherweise befähigt, Butanol mit Konzentrationen von bis zu 16 g/L zu bilden (Tashiro, et al. 2004). Zwar gibt es Organismen, die eine Butanol-Konzentration von bis zu 45 g/L (*Pseudomonas putida*) tolerieren (Ruhl, et al. 2009), jedoch nicht in der Lage sind eine solche Konzentration selbst zu produzieren. Bis heute wurden noch keine Organismen gefunden, die hohe Produktkonzentrationen von 45 g/L sowohl bilden als auch tolerieren können.

Unter den vier im Projekt getesteten Clostridien-Stämmen *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* und *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* konnten mit Letzterem die besten Ergebnisse im Vial, mit TYA-Glucose-Medium bei 30 °C erzielt werden. Zellen, die die Fermentation vollständig durchlaufen hatten waren jedoch nicht mehr als Inokulum geeignet. Sie degenerierten und bildeten nur noch Zellmasse und Säuren ohne Lösemittel zu produzieren. Hierbei konnte zwar eine beginnende Sporenbildung zu beobachten werden, allerdings waren keine reifen, keimfähigen Sporen zu erkennen. Die Entwicklung einer Strategie zur Herstellung einer optimalen Vorkultur war Grundlage für das Gelingen der nachfolgenden Fermentationen.

### **Medien**

Für die ersten nicht optimierten Versuche wurde ein Komplexmedium mit Trypton und Hefeextrakt aus der Literatur verwendet, da es vorerst um das reproduzieren von Literatur-Ergebnissen ging. Im Zuge der Optimierung wurden komplexe Bestandteile reduziert, um die Kosten des Mediums zu senken.

**Tabelle 2.4-1:** Zusammensetzung der in den Fermentationen verwendeten Medien TYA und YA

TYA-Medium	[g/L]	YA-Medium	[g/L]
<b>Trypton</b>	6,00	<b>Trypton</b>	0,00
<b>Hefeextrakt</b>	2,00	<b>Hefeextrakt</b>	2,00
<b>Ammoniumacetat</b>	3,00	<b>Ammoniumacetat</b>	3,00
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,30	<b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,30
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,50	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,50
<b>FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,01	<b>FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,01
<b>L-Cystein-HCl</b>	0,28	<b>L-Cystein-HCl</b>	0,28
<b>Resazurinlösung (5 %)</b>	1 mL	<b>Resazurinlösung (5 %)</b>	1 mL

**Tabelle 2.4-2:** Zusammensetzung des in den Fermentationen verwendeten Mineralsalzmediums sowie der Vitamin- und Spurenelementlösung

A-Medium	[g/L]	Vitaminlösung	[mg/L]	Spurenelement- lösung	[mg/L]
<b>Trypton</b>	0,00				
<b>Hefeextrakt</b>	0,00	<b>Biotin</b>	2	<b>ZnCl</b>	70
<b>Ammoniumacetat</b>	3,00	<b>Nicotinsäure</b>	20	<b>MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O</b>	100
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,30	<b>Thiamin HCl</b>	10	<b>CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	200
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,50	<b>4-Aminobezoat</b>	10	<b>NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	100
<b>FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,01	<b>Pantothenat</b>	5	<b>CuCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O</b>	20
<b>L-Cystein HCl</b>	0,28	<b>Pyridoxamin</b>	50	<b>NaMoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O</b>	50
<b>Resazurinlösung ( 5%)</b>	1 mL	<b>2HCl</b>	20	<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 5 H<sub>2</sub>O</b>	26
<b>Spurenelementlösung</b>	1 mL	<b>Cyanocobalamin</b>		<b>HCl (25 %)</b>	1 mL
<b>Vitaminlösung</b>	3 mL				

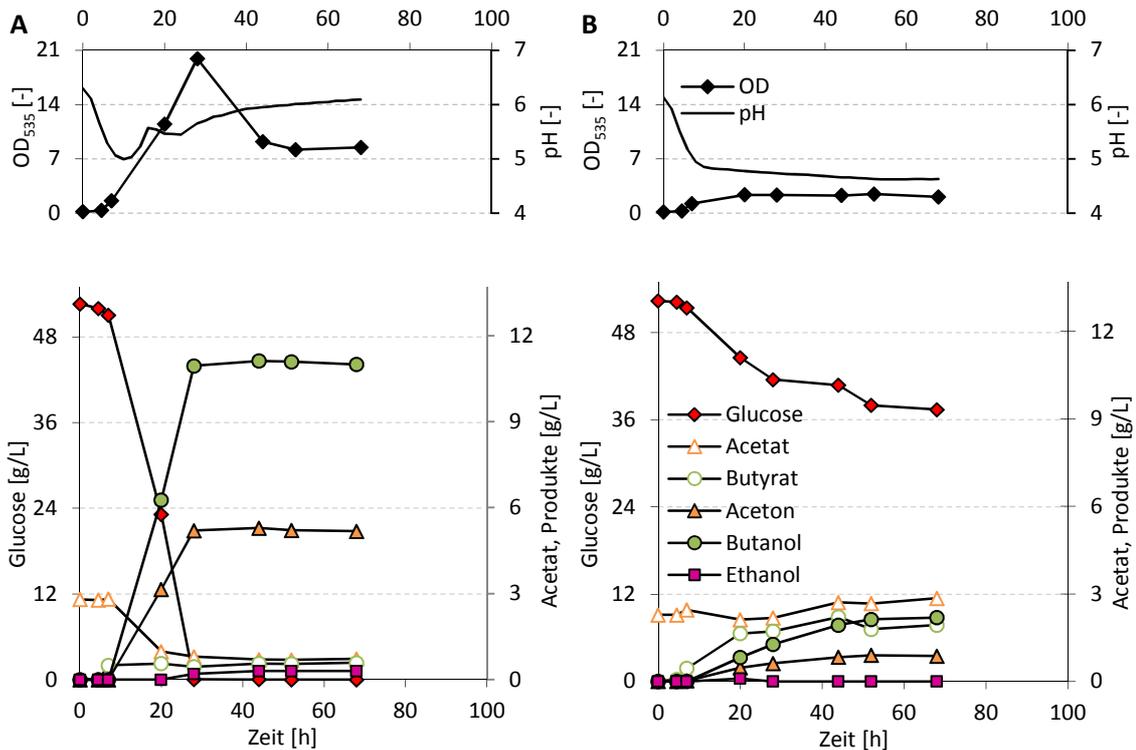
**Tabelle 2.4-1** und **Tabelle 2.4-2** zeigen die Zusammensetzungen der einzelnen Medien, die in den verschiedenen Versuchen eingesetzt wurden. Durch den Einsatz eines Trypton-freien Mediums (YA-Medium) waren weniger Störpeaks in den Chromatogrammen der HPLC-Analytik zu erkennen, was die Auswertung der Ergebnisse verbesserte. In folgenden Versuchen werden die Ergebnisse mit unterschiedlichen Medien dargestellt und verglichen. Mithilfe der Ergebnisse konnten die Prozessbedingungen an das jeweilige Medium angepasst und optimiert werden.

Es konnten allerdings nicht mehr die ursprünglichen Wachstumsraten oder Produktkonzentrationen erreicht werden. Deshalb wurden die Prozessbedingungen angepasst. Zusätzlich wurden eine Spurenelement- und eine Vitaminlösung zugegeben.

## **2.4.2 Ergebnisse**

### ***Einfluss von Trypton***

In diesem Experiment wurde der Einfluss von Trypton unter Reaktorbedingungen untersucht. In einem Parallel-Fermentersystem mit 500 mL Reaktoren wurden zwei Ansätze mit jeweils 400 mL TYA- oder YA-Medium und 50 g/L Glucose unter N<sub>2</sub>-Begasung und Rührung (500 upm) bei 30 °C inkubiert.



**Abbildung 2.4-1:** Zeitliche Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen, des pH-Wertes und der  $OD_{535}$  einer Batch-Fermentation mit *C. spba.* in 500 mL Reaktoren mit 400 mL TYA- (A) oder YA-Medium (B) und 50 g/L Glucose als Substrat. Inkubation bei 30 °C mit  $N_2$ -Begasung und Rührung (500 upm), Start-pH-Wert: 6,3 (ungeregelt)

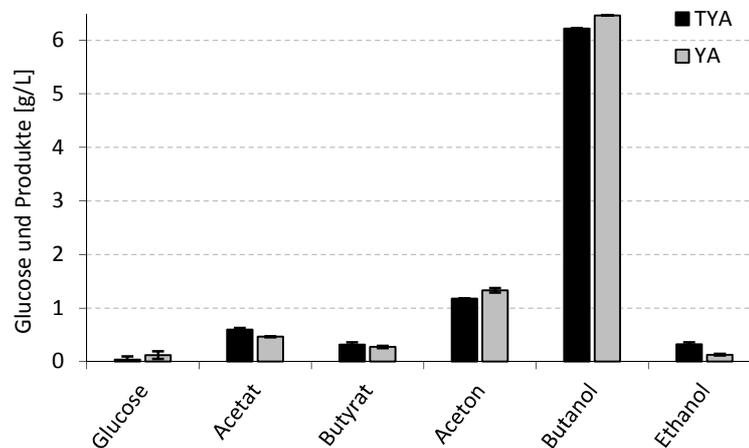
Im Reaktor mit TYA-Medium (**Abbildung 2.4-1A**) erfolgte eine vollständige Umsetzung von Glucose und Acetat zu 11 g/L Butanol und 5,2 g/L Aceton. Acetat und Butyrat waren nach 44 h in geringen Konzentrationen mit 0,7 g/L und 0,6 g/L in Lösung nachweisbar. Die maximale Produktivität für Butanol betrug von 20 h - 28 h  $0,58 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ . Der pH-Wert fiel innerhalb der ersten 10 h von 6,3 auf 5 ab und stieg mit eintreten der solventogenen Phase wieder bis auf 6,1 an. Mit Erreichen der maximalen Butanol-Konzentration konnte auch die maximale  $OD_{535}$  mit einem Wert von 20 ermittelt werden, welche nach 52 h bis auf 8,2 abfiel.

Ohne Trypton wurden nur etwa 15 g/L Glucose verbraucht (**Abbildung 2.4-1B**). Es konnten nur geringe Konzentrationen an Butanol (2,2 g/L) und Aceton (0,9 g/L) aber vergleichsweise hohe Konzentrationen der Säuren Butyrat (1,9 g/L) und Acetat (2,9 g/L) gemessen werden. Der pH-Wert fiel innerhalb von 10 h auf unter 5 stieg aber, im Gegensatz zum Ansatz mit Trypton, nicht mehr an, sondern sank weiter auf 4,6 ab. Die  $OD_{535}$  erreichte maximal 2,4 und lag damit weit unter der des Vergleichsreaktors mit TYA-Medium. Die Ethanol-Konzentration kam mit Trypton auf 0,3 g/L und ohne auf 0,1 g/L, wurde aber aufgrund des geringen Anteils nicht weiter betrachtet.

Der Vergleich beider Fermentationen (**Abbildung 2.4-2**) zeigte deutliche Unterschiede im Verlauf der ermittelten Konzentrationen und Parameter. Trypton hatte im Reaktor, unter den oben genannten Bedingungen einen positiven Effekt auf Substratumsetzung und Produktbildung. Um sich vor Übersäuerung durch das gebildete Acetat und Butyrat zu schützen, geht *C. spba.* von der acidogenen Phase in die solventogene Phase über (Millat, et al. 2013). Ohne Trypton konnten aber

die gebildeten Säuren, unter den oben genannten Bedingungen, nur unzureichend zu Lösemitteln umgewandelt werden, wodurch der pH-Wert auf 4,6 sank, jedoch nicht mehr anstieg und das Zellwachstum zum Erliegen kam.

Parallel zum Reaktorversuch wurden mit denselben Zellen Kontrollen in 20 mL Vials mit einem Arbeitsvolumen von 10 mL TYA- bzw. YA-Medium und 20 g/L Glucose, stehend bei 30 °C inkubiert.



**Abbildung 2.4-2:** Endkonzentrationen nach 120 h in 20 mL Vials mit 10 mL TYA- oder YA-Medium und 20 g/L Glucose als Doppelansatz, inkubiert bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,3

Im TYA-Medium waren nach 120 h Inkubation 1,2 g/L Aceton und 6,2 g/L Butanol nachweisbar. Ohne Trypton konnten 1,3 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol gebildet werden. Mit Trypton im Medium waren die Endkonzentrationen von Säuren und Ethanol in geringem Maße höher als ohne Trypton. Die Ergebnisse des Vial-Versuchs (**Abbildung 2.4-2**) zeigten damit vergleichbare Produkt-Endkonzentrationen in TYA- und YA-Ansätzen, was aber im Reaktorversuch (**Abbildung 2.4-1**) nicht beobachtet werden konnte. Dies warf folgende Fragen auf:

- Welche der in **Tabelle 2.4-3** aufgeführten Parameter beeinflussen die Produktbildung speziell bei Verwendung von Medium ohne Trypton?
- Unter welchen Bedingungen kann in einer Fermentation im Reaktor ohne Trypton eine Butanol-Konzentration über 10 g/L erreicht werden?

**Tabelle 2.4-3:** Unterschiede zwischen den Systemen Vial und Reaktor

Vial	Reaktor
kein Gasaustausch	Be- und Entgasung möglich
entstehen hoher Drücke (bis 4 Bar)	kein Überdruck
keine Durchmischung	Durchmischung
geringes Volumen	größeres Volumen

Im Metabolismus solventogener Clostridien werden ATP und Reduktionsäquivalente (NAD(P)H+H<sup>+</sup>) in der Glykolyse gebildet und reichern sich in der Zelle an. Das Bakterium kann bei zu hoher NAD(P)H+H<sup>+</sup>-Konzentration und einem geringen H<sub>2</sub>-Partialdruck mithilfe von Ferredoxin-

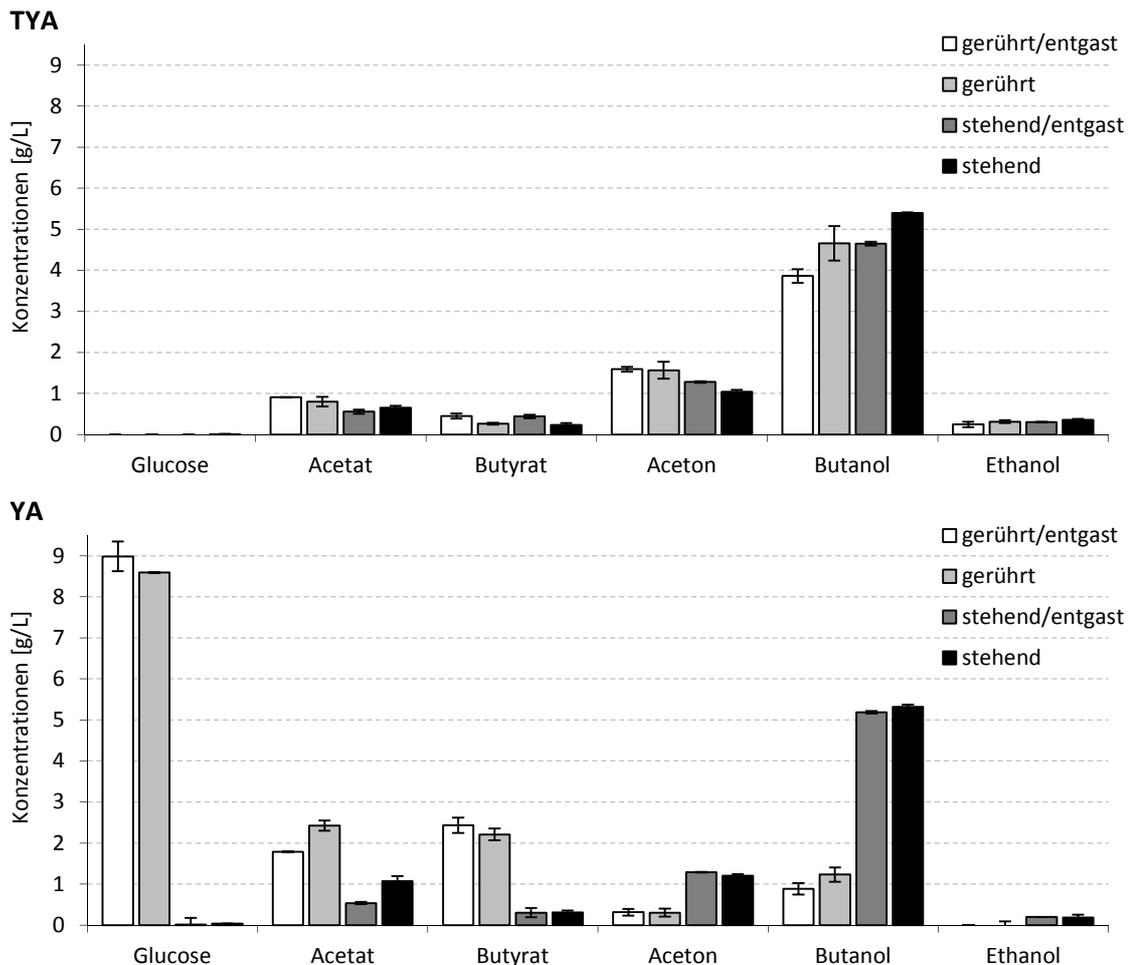
Oxidoreduktasen und Hydrogenasen  $\text{NADH(P)}+\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  und molekularem  $\text{H}_2$  umwandeln, welcher an die Umwelt abgegeben wird (Mollah and Stuckey 1992).  $\text{NAD(P)}^+$  liegt nun wieder als Oxidationsmittel in der Glykolyse vor.

In der acidogenen Phase gewinnt die Zelle mit der Bildung von Säuren (Acetat und Butyrat) ebenfalls Energie in Form von ATP, was allerdings zu einem Absinken des pH-Wertes führt. Die Zelle kann dem entgegen wirken indem ihr Stoffwechsel in die solventogene Phase umschaltet, um die Säuren mithilfe von  $\text{NAD(P)}\text{H}+\text{H}^+$  zu Alkoholen (Ethanol und Butanol) zu reduzieren (Nakayama, et al. 2008). Wurde bereits ein Großteil des  $\text{NAD(P)}\text{H}+\text{H}^+$  zu  $\text{NAD(P)}^+$  und  $\text{H}_2$  umgewandelt stehen nicht mehr genügend Reduktionsäquivalente für die Reduktion der Säuren zur Verfügung und der pH-Wert fällt unter einen kritischen Wert. Um diesen Effekt zu reduzieren, sollte das Medium möglichst mit molekularem  $\text{H}_2$  gesättigt sein.

Wie aus einigen Quellen bekannt (Brosseau, et al. 1985; Doremus, et al. 1985), hat die aktive Durchmischung von Clostridienkulturen, z.B. durch Rühren oder Schütteln, einen Einfluss auf die Freisetzung der gebildeten Gase. Eine Durchmischung begünstigt dabei den Gasaustausch zwischen Flüssig- und Gasphase zu Gunsten des chemischen Gleichgewichts der Gase. Wird ein Gas in einer Flüssigkultur gebildet, diffundiert es in die Gasphase, bis ein chemisches Gleichgewicht erreicht ist. Die Durchmischung der Kultur beschleunigt diesen Prozess. Da  $\text{H}_2$  in Form von  $\text{NAD(P)}\text{H}+\text{H}^+$  eine wesentliche Rolle bei der Hydrierung der Säuren Acetat und Butyrat zu den Alkoholen Ethanol und Butanol spielt, sollte dessen Freisetzung, z. B. durch sättigen der Lösung mit  $\text{H}_2$ , verringert werden.

Durch Verringerung der Durchmischung, Begasung der Kultur mit  $\text{H}_2$  oder durch Anlegen eines Überdrucks kann dies erreicht werden (Doremus, et al. 1985). Diese Parameter wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Produktbildung in folgenden Reaktor- und Vialversuchen untersucht.

Im folgenden Versuch wurden die Parameter Rührung und Entgasung in Zusammenhang mit Trypton untersucht. Mit 60 mL TYA- oder YA-Glucose-Medium inkubierte *C. spba.* für 114 h in 100 mL Schraubflaschen bei 30 °C. Jeweils ein 3-fach Ansatz wurde entweder gerührt und entgast, nur gerührt, nur entgast oder stehend inkubiert. Nicht entgaste Ansätze waren gasdicht verschlossen, wodurch sich Überdrücke von bis zu 4 bar in der Schraubflasche aufbauen konnten.



**Abbildung 2.4-3:** Endkonzentrationen von *C. spba.* in gasdichten 100 mL Schraubflaschen mit 60 mL TYA- oder YA-Medium und 20 g/L Glucose bei 30 °C nach 114 h Inkubation; stehend (0 upm), gerührt (150 upm), entgast (über Gärröhrchen), Start-pH-Werte TYA: 6,8; YA: 6,7

Mit TYA-Medium wurden die vorgelegten 20 g/L Glucose unter allen untersuchten Bedingungen verbraucht (**Abbildung 2.4-3**). Die durchmischten Ansätze zeigten höhere Acetat (0,8 g/L) und Aceton-Konzentrationen (1,6 g/L) im Vergleich zu den Standkulturen mit 0,6 g/L Acetat und 1 g/L sowie 1,3 g/L Aceton. Der Ansatz „gerührt/entgast erreichte die geringste Butanol-Konzentration von 3,9 g/L, gefolgt von den Ansätzen „gerührt und „stehend/entgast mit jeweils 4,7 g/L sowie der stehend inkubierten Kultur mit dem Höchstwert von 5,4 g/L. Um 0,2 g/L höhere Butyrat-Konzentrationen konnten in den entgasten Ansätzen ermittelt werden. Die Ethanol-Konzentrationen ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

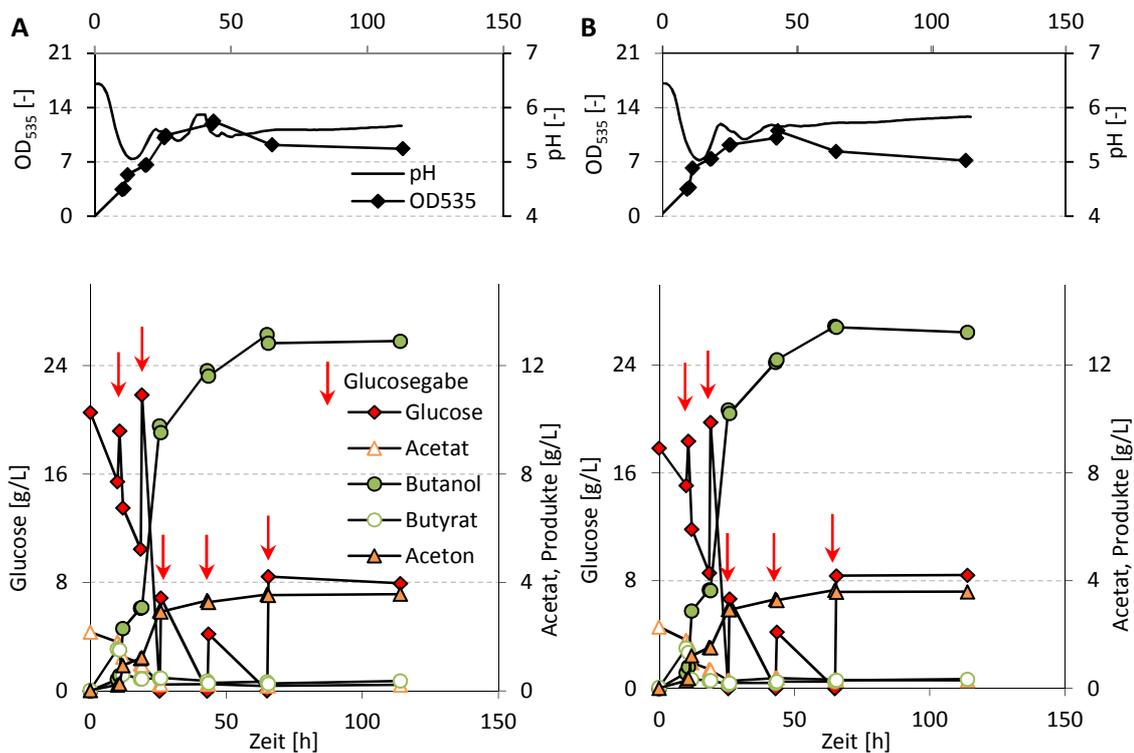
In YA-Medium wurde die Glucose nur in den stehend inkubierten Kulturen vollständig verbraucht, was sich auch auf die Konzentrationen der Endprodukte auswirkte. Acetat war im Ansatz „gerührt/entgast mit 1,8 g/L und im gerührten Ansatz mit 2,4 g/L nachweisbar. Ohne Entgasung konnten weniger Gase aus der Kultur entweichen, was unter anderem den weiteren Abbau von Acetat zu Aceton unter CO<sub>2</sub>-Bildung hemmen könnte. Allerdings war der Effekt in den gerührten Kulturen an den ohnehin schon niedrigen Aceton-Konzentrationen (entgast: 0,31 g/L; verschlossen: 0,30 g/L) nur schwer zu erkennen und nicht signifikant. Der Einfluss der Entgasung zeigte sich auch in den Standkulturen, wobei Acetat mit 0,5 g/L (entgast) und 1,1 g/L (verschlossen) gemessen

wurden. Aceton lag mit 1,3 g/L (entgast) und 1,2 g/L (verschlossen) vor. In den Rührkulturen befanden sich mit Entgasung 2,4 g/L und ohne Entgasung 2,2 g/L Butyrat in Lösung. Die Standkulturen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Butyrat-Konzentrationen zwischen entgasten (0,30 g/L) und verschlossenen Kulturen (0,31 g/L). Butanol konnte in den gerührten Ansätzen mit 0,9 g/L und 1,2 g/L nachgewiesen werden. Die Standkulturen bildeten 5,2 g/L und 5,3 g/L Butanol sowie jeweils 0,2 g/L Ethanol. Ohne Trypton konnte ein verstärkter Einfluss der Rührung auf die Produktbildung beobachtet werden.

Ohne Rührung und/oder Entgasung wurden höhere Alkoholkonzentrationen gebildet. Die Effekte verstärkten sich ohne Trypton, wobei die Rührung den größten Einfluss auf die Produktbildung der Kulturen hatte. Ohne Trypton konnten nur in den Standkulturen Butanol-Konzentrationen von über 5 g/L erzielt werden, was mit den besten Konzentrationen der Trypton-haltigen Ansätze vergleichbar war.

### ***Einfluss von Wasserstoff auf die ABE-Fermentationen***

Da solventogene Clostridien in der Lage sind ihre Reduktionäquivalente selbst zu generieren (Alalayah, et al. 2008), sollte es ausreichen die Abgabe des H<sub>2</sub> an Medium und Gasphase zu hemmen. Um die H<sub>2</sub>-Freisetzung zu erschweren, sollte die Kultur mit H<sub>2</sub> gesättigt sein. Damit eine annähernde H<sub>2</sub>-Sättigung erreicht werden konnte, wurden zwei mögliche Varianten getestet und verglichen (**Abbildung 2.4-4**). Ansatz **A** wurde wieder mit H<sub>2</sub> begast wobei der zugeführte H<sub>2</sub> und die gebildeten Gase über Gärröhrchen ungehindert entweichen konnten. Reaktor **B** wurde mit einem Druckhalteventil versehen, das ein Entweichen der selbst gebildeten Gase bis zu einem Überdruck von 0,2-0,3 bar verhinderte, welche sich dadurch im Reaktor anreichern konnten. In beiden 200 mL Reaktoren wurde *C. spba.* in 130 mL YA-Glucose-Medium bei 30 °C inkubiert und mit 200 upm gerührt. Substrate und Produkte wurden zeitnah vermessen und gegebenenfalls Substrat, als konzentrierte, anaerobe Glucose-Lösung nachgeführt.



**Abbildung 2.4-4:** Konzentrationsverläufe der Substrate und Produkte sowie OD<sub>535</sub> und pH-Werte einer Fedbatch-Parallelerfermentation mit *C. spba.* in 200 mL Glasreaktoren mit 130 mL YA-Glucose-Medium. 30 °C Inkubationstemperatur, 200 upm Rührung, mit H<sub>2</sub>-Begasung (A) oder mit 0,2-0,3bar Überdruck (B)

Im Reaktor mit H<sub>2</sub>-Begasung (**Abbildung 2.4-4 A**) reduzierte sich die Acetatkonzentration in 26 h von 2,2 g/L auf 0,2 g/L. Butyrat nahm innerhalb von 10 h auf 1,5 g/L zu und sank, mit Beginn der solventogenen Phase, nach 12 h wieder auf 0,6 g/L und im weiteren Verlauf auf 0,3 g/L ab. Aceton erreichte innerhalb von 65 h eine Konzentration von 3,6 g/L. Die Butanol-Konzentration stieg in dieser Zeit auf 13,1 g/L, wobei *C. spba.* dabei etwa 47 g/L Glucose nutzte, was einem Ertrag von knapp 28 % entsprach. Von 19-26 h betrug die maximale Butanol-Produktivität im mit H<sub>2</sub> begasten Ansatz 0,96 g (L·h)<sup>-1</sup>. Nach 43 h erreichte die OD<sub>535</sub> ihren Höchstwert von 12,4 und sank bis zum Ende auf 8,7 ab. Der pH-Wert fiel, beginnend bei 6,4, auf 5,0 ab, erreichte nach 21 h einen Wert von 5,6, fiel nach weiteren 8 h auf 5,4 und pegelte sich zum Schluss auf 5,6 ein.

Im Vergleichsreaktor mit 0,2-0,3 bar Überdruck zeigte sich das gleiche Verlaufsmuster. Hier wurden 13,2 g/L Butanol aus 43 g/L Glucose gebildet und damit 4 g/L weniger Substrat verbraucht, wodurch ein Ertrag von 30,5 % erzielt werden konnte. Pro Stunde konnten hier maximal 0,95 g/L Butanol gebildet werden. Die maximale OD<sub>535</sub> lag nach 43 h bei 11 und fiel zum Ende hin auf 7,1 ab. Ausgehend von einem Start-pH-Wert von 6,4 sank dieser in 12 h ebenfalls auf 5,0 ab, erreichte nach 21 h einen Wert von 5,7, fiel nach weiteren 8 h auf 5,4 und pegelte sich zum Schluss auf 5,8 ein.

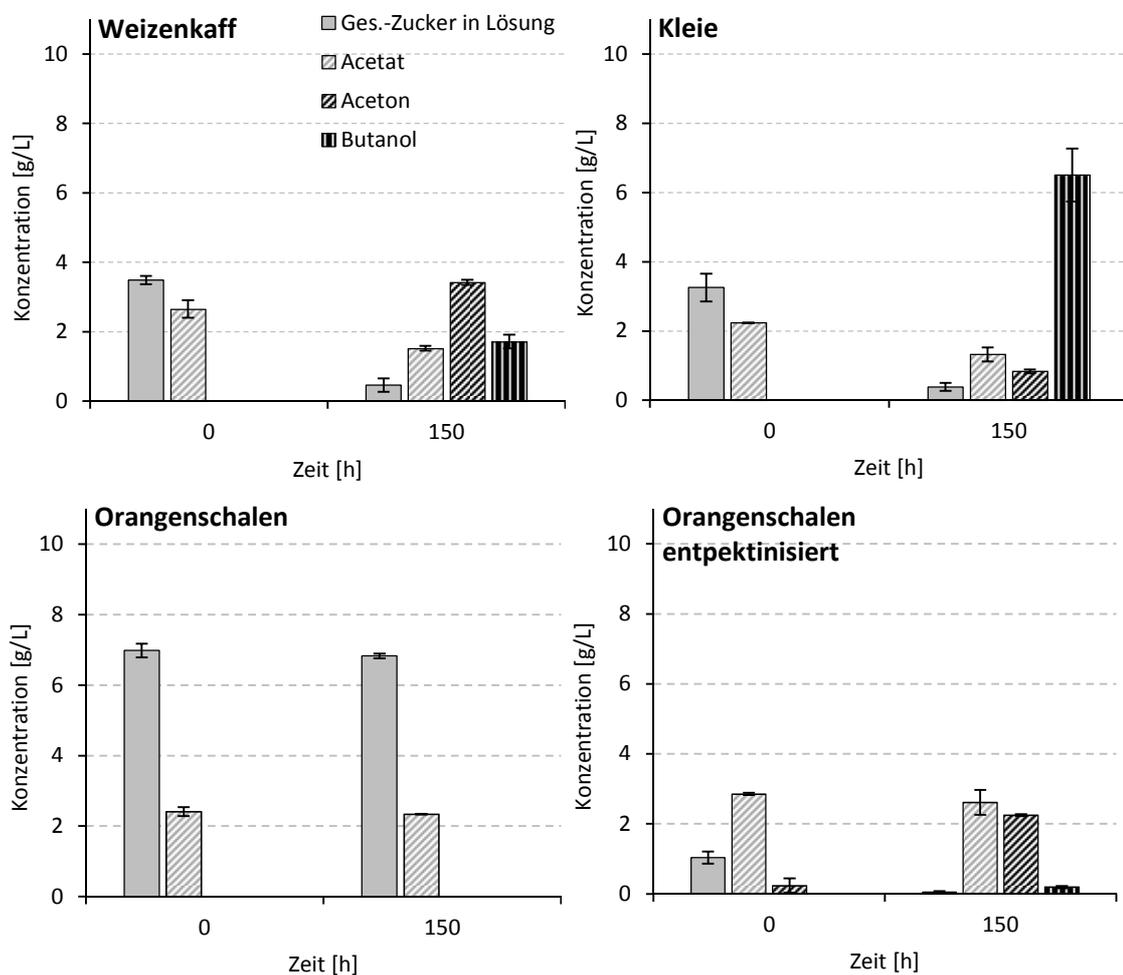
Die Ergebnisse beider Fermentationen mit YA-Glucose Medium und H<sub>2</sub>-Begasung oder 0,2-0,3 bar Überdruck zeigten fast identische Verläufe. Im Vergleich zur Behandlung mit H<sub>2</sub> konnten mit leicht-

tem Überdruck ebenso gute Produktkonzentrationen erzielt werden. In folgenden Reaktorversuchen wurde die günstigere Variante Anlegen eines Überdrucks von 0,2-0,3 bar verwendet.

### Rohsubstrate

#### Weizenkleie, Weizenkleie, Orangenschale, entpektinierte Orangenschale

In folgenden Vialversuchen sind Substrate wie Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale oder entpektinierte Orangenschale auf ihre Verwertbarkeit für den ABE-Prozess getestet worden. Die zerkleinerten Substrate wurden mit jeweils 50 g/L Trockenmasse in YA-Medium autoklaviert. Nach dem Animpfen der 30 mL Ansätze inkubierten sie für 150 h bei 30 °C in 50 mL Vials. Die Zelldichte konnte wegen der hohen Eigentrübung der Substrate im Medium nicht über die OD<sub>535</sub> bestimmt werden.



**Abbildung 2.4-5:** Substrat und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in YA-Medium mit jeweils 50 g/L Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale oder entpektinierte Orangenschale als Substrat, inkubiert bei 30 °C für 150 h. Start-pH-Werte: 6,6-7,0

Weizenkaff oder Spreu ist ein Abfallprodukt, das beim Dreschen von Getreide entsteht und mit 1-2 t/ha (Streit, et al. 2011) bei der Getreideernte anfällt. Es besteht aus Samenhülsen, Spelzen, Grannen, Schalen, Schoten, Korn-, Blatt- oder Stängelteilen eines Fruchtstandes (Ries, et al. 1957). Bestandteile des Weizenkaffs sind Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Silikate (Kumakura and Kaetsu 1984). Als Abfallprodukt würde es nicht mit der Nahrungsmittelindustrie konkurrieren und

wäre aufgrund seines hohen potentiellen Kohlehydratgehaltes ein geeignetes Substrat. Im autoklavierten Weizenkaff-Ansatz (**Abbildung 2.4-5 A**) lagen zu Beginn des Versuchs 3,5 g/L Zucker und 2,6 g/L Acetat vor. Nach 150 h waren 0,5 g/L Zucker, 1,5 g/L Acetat, 3,4 g/L Aceton und 1,7 g/L Butanol in Lösung. Unter Verbrauch von 3 g/L gelöstem Zucker und 1,1 g/L Acetat entstanden 5,1 g/L Lösemittel. Die ermittelte Substratkonzentration in Lösung war für die gebildete Menge an Produkten zu gering. Allein für die 1,7 g/L Butanol hätte *C. spba.* rein rechnerisch 5-6 g/L Zucker benötigt. Dies ist ein Hinweis, dass *C. spba.* wie auch andere Clostridien (Virunanon, et al. 2008), über cellulolytische Enzyme verfügt, womit ein enzymatischer Aufschluss des Cellulose- und Hemicellulose-haltigen Rohsubstrats möglich war.

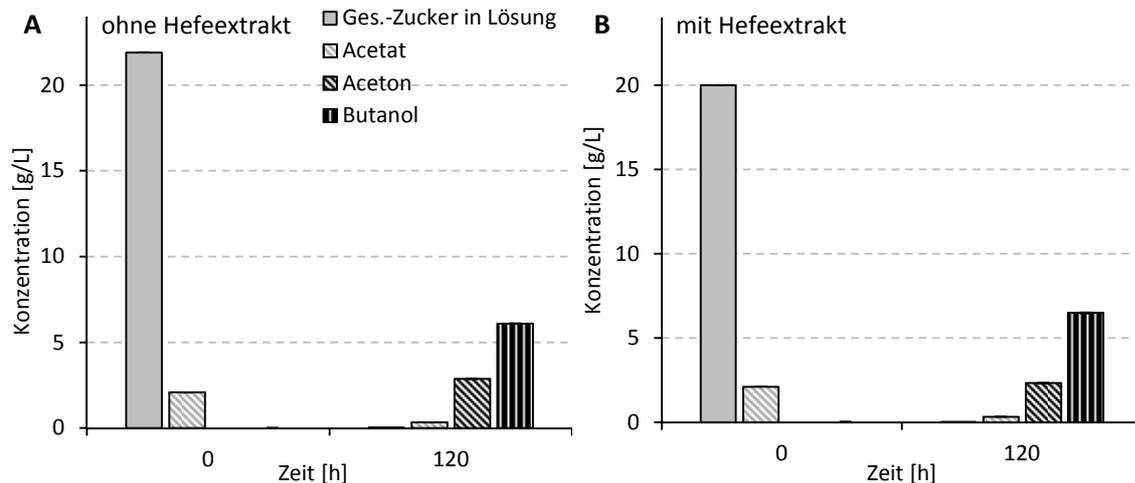
Kleie ist ein Rückstand in der Mehlproduktion und besteht zum größten Teil aus zurückbleibender Stärke, Hemicellulose, Cellulose, Proteinen und Lignin (Choteborska, et al. 2004; Palmarola-Adrados, et al. 2005). Mit dem Weizenkleie-Ansatz (**Abbildung 2.4-5 B**) waren anfangs 3,3 g/L Zucker und 2,2 g/L Acetat in Lösung. In der Endprobe konnten 0,4 g/L Glucose, 1,3 g/L Acetat, 0,8 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol im Überstand ermittelt werden. Auch hier wurde mehr Produkt gebildet, als aus der zu Beginn in Lösung nachgewiesenen Zuckerkonzentration möglich gewesen wäre. Durch das Vorhandensein von Amylasen und cellulolytischen Enzymen (Keis, et al. 2001; Virunanon, et al. 2008) konnten Stärke, Cellulose oder Hemicellulose zu verwertbaren Zuckern aufgespalten werden, weshalb am Ende Lösemittel in höheren Konzentrationen als erwartet vorlagen.

Im Ansatz mit getrockneten Orangenschalen (**Abbildung 2.4-5 C**), lagendurch partielle Autolyse (Rivas, et al. 2008) bereits Zuckerkonzentrationen von knapp 7 g/L in Lösung vor. Die Zucker- oder Acetatkonzentration zeigten jedoch nach der Inkubation keine signifikante Abnahme. In der Endprobe konnten auch keine Endprodukte nachgewiesen werden.

Bei Orangenschalen mit Vorbehandlung zur Entpektinierung (**Abbildung 2.4-5 D**) lagen im Medienansatz 1,0 g/L Zucker und 2,9 g/L Acetat vor. Der gesamte Zucker sowie 0,6 g/L Acetat wurden verbraucht und in 0,2 g/L Aceton und 0,2 g/L Butanol umgewandelt.

### *Zuckerrübe*

Zuckerrübe wurde als ein weiteres Rohsubstrat getestet, dafür zerkleinert, autoklaviert und in 50 mL Vials mit A- oder YA-Medium auf 30 mL aufgefüllt. Die Konzentration an Zuckerrübe im Medium betrug dabei 100 g/L, von der etwa 20 % Zucker in Lösung vorlagen. Die Ansätze inkubierten mit *C. spba.* für 120 h bei 30 °C.



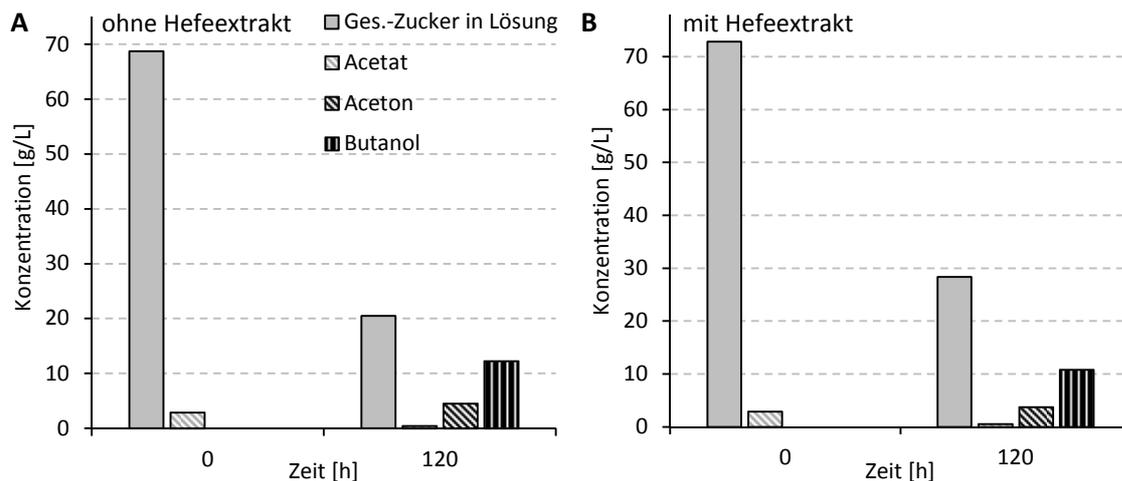
**Abbildung 2.4-6:** Zucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in A- (A) und YA-Medium (B) mit 100 g/L Zuckerrübe als Substrat inkubiert bei 27 °C. 30 mL Ansätze in 50 mL Vials. Start-pH-Wert: 6,2

Wie aus **Abbildung 2.4-6 A** entnommen werden kann, enthielt die Startprobe im A-Medienansatz 21,9 g/L Gesamtzucker und 2,1 g/L Acetat in Lösung. Daraus entstanden 2,9 g/L Aceton und 6,1 g/L Butanol, was einer Butanol-Ausbeute von 28 % entsprach. Mit YA-Medium (**Abbildung 2.4-6 B**) konnten aus gelösten 20 g/L Zucker und 2,1 g/L Acetat 2,3 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol gebildet werden. Die Butanol-Ausbeute betrug hier 33 % und lag damit um 5 % höher als im Medium ohne Hefeextrakt. Zuckerrübe scheint, in Anbetracht der guten Ausbeuten, ein geeignetes Substrat für die Konversion zu Butanol zu sein.

#### *Weizenkaff-Hydrolysat*

Das hier verwendete Weizenkaff wurde einem Organosolv-Aufschluss unterzogen, um die Zugänglichkeit für den darauf folgenden enzymatischen Aufschluss zu erhöhen [ANDERS, 2013]. In der gewonnenen Hydrolysat-Lösung lag eine Gesamt-Zuckerkonzentration von 70-80 g/L vor, welche hauptsächlich Zucker wie Glucose (23 %), Xylose (18 %) und Arabinose (11 %) enthielten [ANDERS, 2013].

Als Medienvarianten dienten A- und YA-Medium, welche in konzentrierter Form zum Weizenkaff-Hydrolysat zugegeben wurden. Die Inkubation von *C. spba.* mit jeweils 10 mL Medienansätzen fand bei 27 °C in 20 mL Vials statt. Nachdem binnen 72h nach Sichtung noch keine deutliche Trübung oder Gasbildung und damit auch kein Zellwachstum erkennbar war, wurde jeder Ansatz nochmals mit Reduktionsmittel versetzt (0,28 g/L L-Cystein-HCl) und mit frischer Vorkultur beimpft. Danach inkubierten die Ansätze unter täglicher Beobachtung für weitere 120 h, bevor die Endprobenahme erfolgte.



**Abbildung 2.4-7:** Zucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in 10 mL A- (A) und YA-Medium (B) mit Weizenkaff-Hydrolysat als Substrat inkubiert bei 27 °C in 20 mL Vials für 120 h. Start-pH-Wert: 6,2

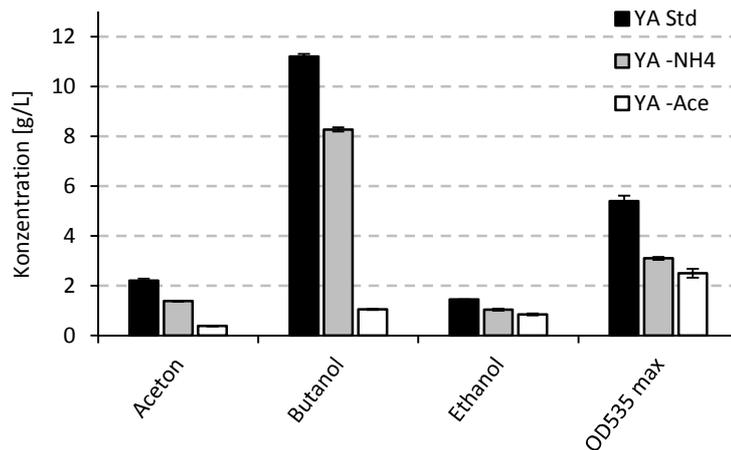
Aus 48,2 g/L Zucker entstanden im Ansatz ohne Hefeextrakt (**Abbildung 2.4-7A**) 4,5 g/L Aceton und 12,2 g/L Butanol was einer Butanol-Ausbeute von 25 % entsprach. Die Acetatkonzentration sank dabei von 2,9 auf 0,4 g/L.

Die Zugabe von Hefeextrakt brachte keine Verbesserung in den Produktausbeuten oder Endkonzentrationen (**Abbildung 2.4-7B**). Bei einem Zuckerverbrauch von 44,6 g/L sind hier 3,7 g/L Aceton und 10,8 g/L Butanol gebildet worden. Die Acetat-konzentration nahm von 2,9 g/L auf 0,5 g/L ab. Die Butanol-Ausbeute betrug hier 24 %.

Enzymatisch aufgeschlossenes Weizenkaff konnte erfolgreich als Substrat eingesetzt werden. Es lieferte zum einen genügend verwertbare Zucker und zum anderen ausreichend Acetat, sodass keine zusätzliche Acetatquelle zugegeben werden musste. Die Endkonzentrationen und Ausbeuten für Butanol waren mit maximal 12,2 g/L und 25 % als Vialversuch vergleichsweise hoch (vgl. **Abbildung 2.4-8**). Im Reaktor sollten unter optimierten Bedingungen (27 °C, 0,2-0,3 bar, 200 upm) mit Weizenkaff-Hydrolysat noch höhere Konzentrationen möglich sein, was jedoch noch zu prüfen wäre.

### **Einfluss von Ammonium und Acetat auf die Produktbildung**

In diesem Vialversuch wurden Untersuchungen zum Einfluss der Medienbestandteile Ammonium und Acetat in Bezug auf die ABE-Bildung durchgeführt. Dazu sind die Medien YA, YA ohne Ammonium oder YA ohne Acetat mit 50 g/L Glucose für die Inkubation von *C. spba.* in 3-fach Ansätzen bei 30 °C genutzt worden.

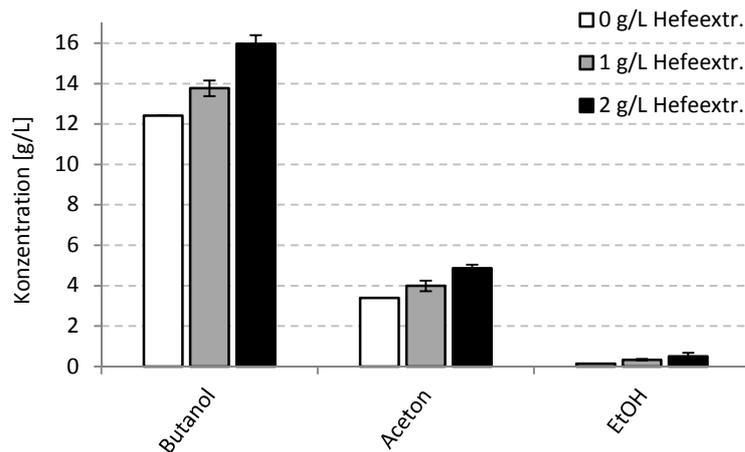


**Abbildung 2.4-8:** Endkonzentrationen und maximale OD nach 154 h in 50 mL Vials mit 30 mL verschiedener YA-Medienvarianten wie YA (YA Std), YA-Medium ohne Ammonium (YA-NH<sub>4</sub>) und YA-Medium ohne Acetat (YA-Ace) jeweils mit 50 g/L Glucose, inkubiert bei 30 °C als 3-fach Ansatz, Start-pH-Wert: 6,3

Ohne die Stickstoffquelle Ammonium konnte eine Abnahme der Endkonzentrationen um 37 % Aceton (0,8 g/L), 26 % Butanol (3 g/L) und 28 % Ethanol (0,4 %) beobachtet werden (**Abbildung 2.4-8**). Ohne Acetatzugabe, zeigte sich eine noch deutlichere Abnahme der Lösemittelkonzentrationen um 83 % bei Aceton (-1,8 g/L), über 90 % bei Butanol (-10,1 g/L) und 41 % bei Ethanol (-0,6 g/L). Obwohl *C. spba.* dazu befähigt ist selbst Acetat zu bilden, begünstigt die Zugabe von Acetat (2,5 g/L) das Zellwachstum um 54 % und die Produktbildung um bis zu 90 % (Butanol). Arbeiten von Chen and Blaschek (1999a), (1999b) zeigten ebenfalls, dass Acetat als Zusatz im Medium die Zelldegeneration und Lösemittelbildung von *C. beijerinckii* positiv beeinflusste.

#### ***Einfluss von Hefeextrakt auf die Produktbildung***

Hefeextrakt gehört wie Trypton zu den Komplexbestandteilen im Medium und ist mit 6,00-6,40 €/Kg (German.alibaba.com 2013a) ein bedeutender Kostenfaktor für den Fermentationsprozess. Im YA-Medium wurden 2 g/L Hefeextrakt eingesetzt, um am Ende der Fermentation eine Konzentration von etwa 14 g/L Butanol zu erhalten (**Abbildung 2.4-9**). Daraus ließen sich Kosten für Hefeextrakt in Höhe von 0,75-0,80 €/Kg Butanol berechnen. Deshalb wurde geprüft, wie groß der Einfluss der Hefeextrakt-Konzentration auf den Prozess ist und ob auch in einer Fermentation ohne Hefeextrakt vergleichbare Produktkonzentrationen möglich wären.



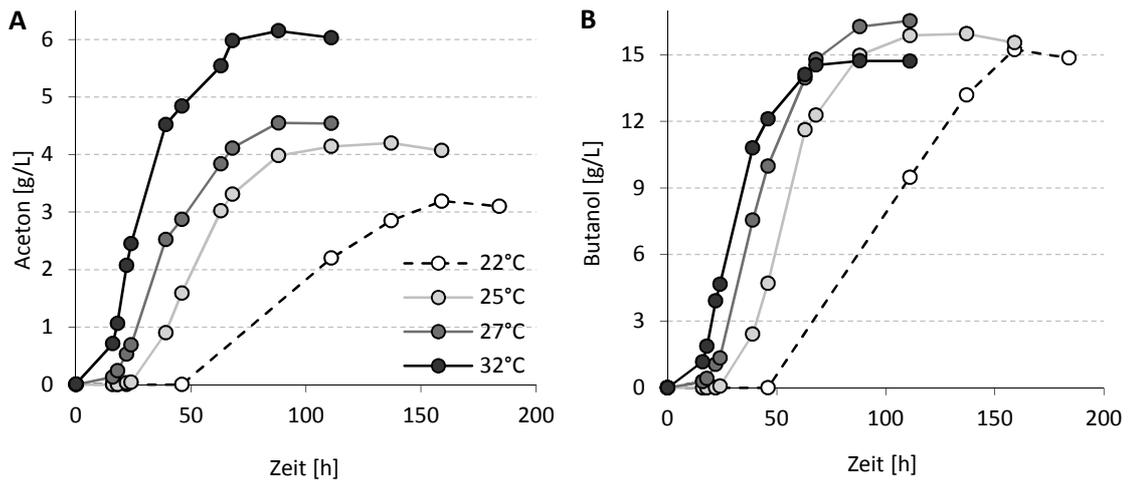
**Abbildung 2.4-9:** Endkonzentrationen der Produkte aus dem Inkubationsversuch mit 50 mL YA-Medium, 75 g/L Glucose und verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen in 100 mL Schraubflaschen mit Gärverschluss bei einer Inkubationstemperatur von 26 °C im Schüttler mit 120 upm für 23 Tage; Hefeextrakt-Konzentrationen: 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L; Start-pH-Wert: 6,3

Der Versuch fand in 100 mL Schraubflaschen statt, welche mit Gärverschluss versehen waren, um eine Entgasung unter anaeroben Bedingungen zu gewähren. Zusätzlich sind die Gärröhrchen mit mehreren Lagen Parafilm® verschlossen worden, um die Entwicklung eines leichten Überdrucks während der Inkubation zu ermöglichen. Dies sollte eine Anreicherung der Gase im Medium begünstigen. Die Probenahme erfolgte zu Beginn und am Ende des Versuchs (nach 23 Tagen), um das System so wenig wie möglich zu stören.

Wie in **Abbildung 2.4-9** zu erkennen ist, führte die Zugabe von Hefeextrakt zu einer signifikanten Steigerung der Produktendkonzentrationen. Aber selbst im Ansatz ohne Hefeextrakt konnten Endkonzentrationen von 3,4 g/L Aceton, 12,4 g/L Butanol und 0,1 g/L Ethanol aus 54,3 g/L Glucose erreicht werden. Mit 1 g/L Hefeextrakt wurden 13,7 g/L Butanol, 4,0 g/L Aceton und 0,3 g/L Ethanol aus 56,5 g/L Glucose gebildet. 15,9 g/L Butanol, 4,9 g/L Aceton sowie 0,5 g/L Ethanol ergaben sich aus dem Ansatz mit 2 g/L Hefeextrakt, in dem 64,4 g/L Glucose verbraucht wurden. Ohne Hefeextrakt betrug der Butanol-Ertrag 23 %, mit 1 g/L Hefeextrakt 24 % und mit 2 g/L Hefeextrakt 25 %. Die Butanol Erträge stiegen demnach um 1 % pro g Hefeextrakt an. Eine Fermentation ohne Hefeextrakt ist möglich und erzielte zudem annehmbare Produktkonzentrationen von 12,4 g/L in Schüttelkultur.

### **Einfluss der Temperatur im Reaktor**

*C. spba.* inkubierte unter optimierten Bedingungen (0,2-0,3 bar, 200 upm) in 130 mL YA-Medium mit 75 g/L Glucose bei Temperaturen von 22 °C, 25 °C, 27 °C und 32 °C.



**Abbildung 2.4-10:** Verlauf der Aceton- (A) und Butanol-Konzentrationen (B) während einer Batch-Fermentation mit *C. spba.* in 130 mL YA-Medium und 75 g/L Glucose bei verschiedenen Temperaturen mit einem Überdruck von 0,2-0,3bar und einer Rührung von 100 upm. Start-pH-Wert: 6,3

**Abbildung 2.4-10 A** zeigt den Verlauf der Aceton-Konzentrationen in den vier Reaktoransätzen. Nach 88 h sind 6,2 g/L Aceton im 32 °C-Ansatz und 4,6 g/L im Reaktor mit 27 °C erreicht worden. Mit 25 °C konnte erst nach 137 h eine Aceton-Konzentration von 4,2 g/L gemessen werden. Bei 22 °C dauerte es 159 h bis 3,2 g/L Aceton gebildet wurden, wobei hier die Lag-Phase schon etwa 50 h ausmachte. Die Aceton-Endkonzentration stieg auch im Reaktor proportional zur Temperatur an, was die Ergebnisse aus dem vorherigen Vialversuch bestätigte.

Die Verläufe der Butanol-Konzentrationen sind in **Abbildung 2.4-10 B** dargestellt. Mit einer Temperatur von 32 °C wurde nach 88 h eine Butanol-Konzentration von höchstens 14,7 g/L ( $0,17 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ ) erreicht. Bei 27 °C verstoffwechselte *C. spba.* das Substrat zu Butanol mit einer maximalen Konzentration von 16,5 g/L in 111 h ( $0,15 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ ). Mit 25 °C wurden knapp 16 g/L nach 137 h ( $0,12 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ ) erreicht und im Ansatz mit 22 °C konnten nach 159 h 15,6 g/L ( $0,10 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ ) nachgewiesen werden.

### **Fermentation mit Online-Extraktion der Endprodukte**

#### *Extraktionsmitteltest für Online-Extraktion mit C. spba.*

In den Reaktoren stieg die Produktivität mit der Temperatur an, die maximale Butanol-Endkonzentration wurde jedoch schon bei 27 °C, mit einer nur um  $0,02 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$  verringerten Gesamtproduktivität, erreicht. Des Weiteren ist an den Kurvenverläufen zu erkennen, dass mit einer höheren Inkubationstemperatur die Aceton-Konzentration anstieg und bei 32 °C mit 1,6 g/L um 35 % höher lag als bei 27 °C.

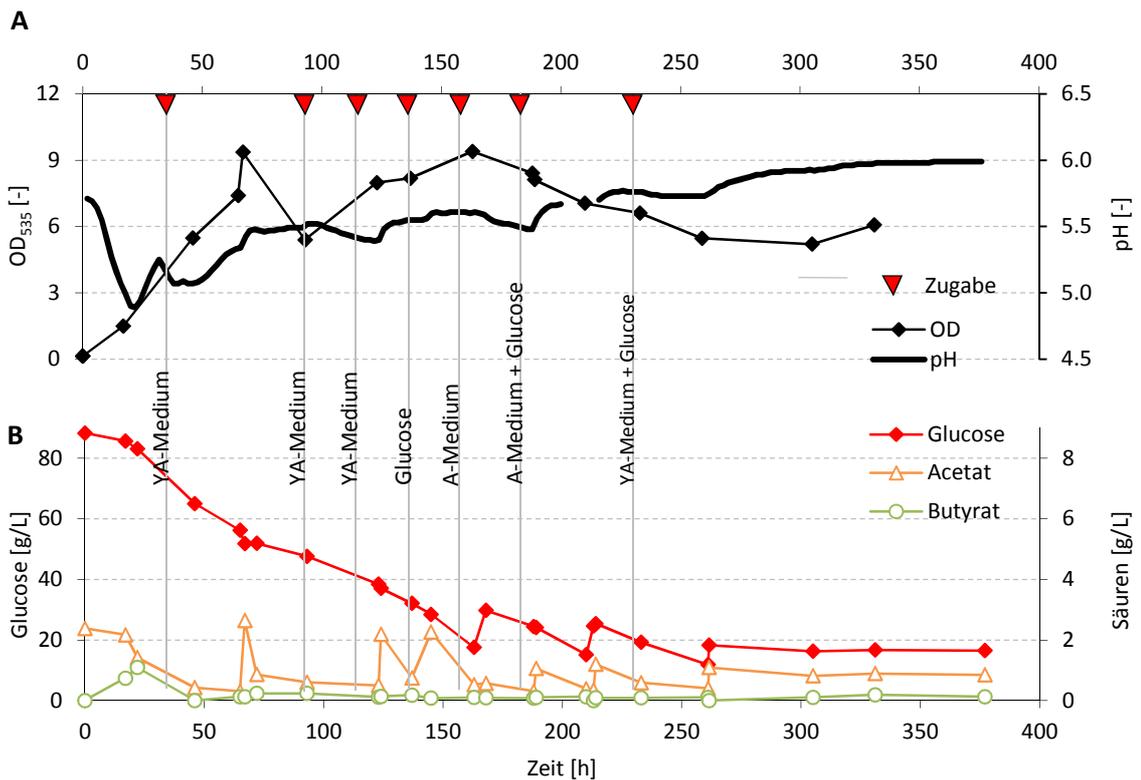
**Tabelle 2.4-4:** Verteilungskoeffizienten von Butanol in dem jeweiligen Extraktionsmittel und H<sub>2</sub>O ( $k_{E/W}$ ) bei 23 °C sowie dem Wachstum von *C. spba.* unter Einfluss des Extraktionsmittels in 5 mL TYA-Glucose-Medium bei 27 °C in 20 mL Vials

Extraktionsmittel 50 Vol-%	$k_{E/W}$ [HELLERT, 2013]	$k_{E/Kulturbrühe}$ [Literatur]	Wachstum
1-Decanol	9,3	6,2 (Evans and Wang 1988a)	-
1-Dodecanol (fest < 25°C)	n.d.		-
Isofol®12 (2-Butyloctan-1-ol)	4,3	5,1-5,5 (Evans and Wang 1988b)	+
Isofol®14T (Gemisch)	3,5	-	+
Isofol®16 (2-Hexyldecanol)	2,9	-	+
Isofol®20 (2-Octyldodecanol)	n.d.	4,5 (Chiellini, et al. 2003)	+
n-Heptan	0,2	3,5 (Barros, et al. 1987)	+

**Tabelle 2.4-4** zeigt die auf Toxizität getesteten Extraktionsmittel mit deren bei 23 °C ermittelten [HELLERT, 2013] oder aus der Literatur recherchierten Verteilungskoeffizienten und den Ergebnissen des Toxizitätstest. Daraus geht hervor, dass 1-Decanol zwar sehr gut für die Extraktion von Butanol geeignet ist aber leider auch wachstumshemmend auf *C. spba.* wirkte. 1-Dodecanol wird in der Literatur (Evans and Wang 1988b) ebenfalls als gutes Extraktionsmittel für Butanol beschrieben, hatte jedoch gleich zwei Nachteile. Zum einen konnte auch hier im Toxizitätstest mit *C. spba.* kein Zellwachstum festgestellt werden und zum anderen nimmt 1-Dodecanol bei 24 °C einen festen Aggregatzustand an, was für eine technische Nutzung aufgrund der Verstopfungsgefahr in Leitungen ungünstig ist. Dennoch gibt es auch hierzu in Verbindung mit einer PTFE-Membran aktuelle Untersuchungen [Tanaka et al. 2012]. Alle anderen in **Tabelle 2.4-4** aufgeführten Extraktionsmittel zeigten keine wachstumshemmende Wirkung auf *C. spba.*

#### *Fermentation mit Online-Extraktion (Isofol®12)*

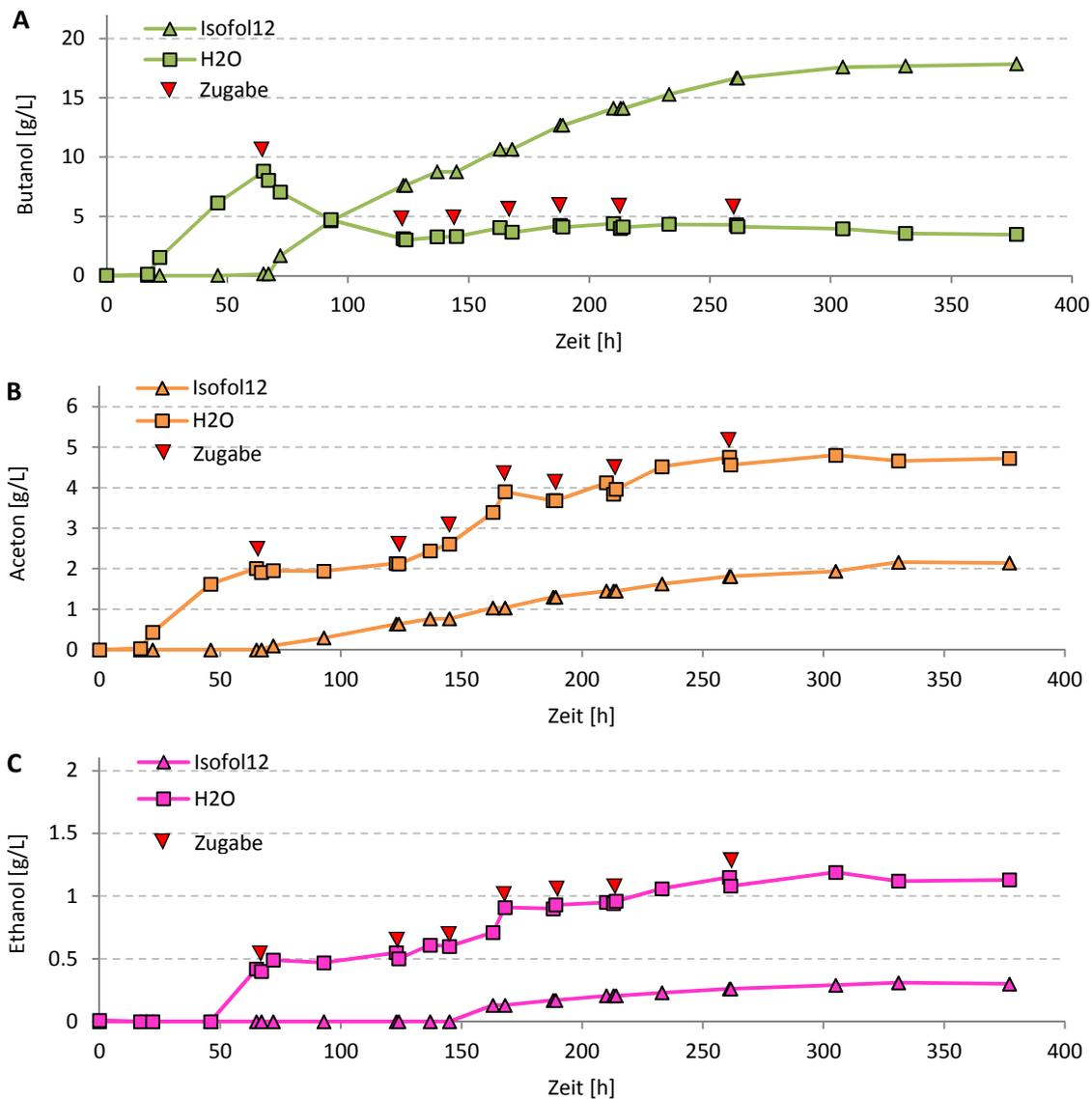
Den Abschluss dieser Arbeit stellte eine 2-Phasen Fedbatch-Fermentation mit wässriger (YA-Medium) und organischer Phase (Isofol®12) dar, wodurch die Butanol-Toxizität mittels kontinuierlicher Extraktion der Lösemittel umgangen werden sollte. Im Glasreaktor wurde *C. spba.* in 600 mL YA-Medium mit 90 g/L Glucose inkubiert, bis nach 65 h eine Butanol-Konzentration von knapp 9 g/L erreicht wurde. Nun erfolgte die Einleitung von 900 mL des Extraktionsmittels Isofol®12, wobei sich ein 2-Phasen-System mit wässriger und organischer Phase in einem Volumenverhältnis von 2:3 ausprägte. Bei geringen Acetatkonzentrationen (< 0,5 g/L) wurde YA-Medium (67 h, 124 h, 145 h, 261 h) bzw. definiertes A-Medium (189 h, 214 h) als konzentrierte Lösung zugegeben. Bei geringen Glucose-Konzentrationen (< 20 g/L) erfolgte die Zugabe einer konzentrierten Glucose-Lösung (168 h, 213 h, 261 h), um eine Substratlimitierung auszuschließen.



**Abbildung 2.4-11:** Zeitlicher Verlauf von pH-Wert und  $OD_{535}$  (A) sowie den Glucose- und Säurekonzentrationen (B) aus der 2-Phasen-Fedbatch-Fermentation mit YA-Glucose Medium und Isofol 12 als Extraktionsmittel, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar, 200 upm, Start-pH-Wert: 5,7; vertikale, graue Linien: Medien-/Substratzugabe

Nach einer kurzen Lag-Phase von etwa 2 h begann der pH-Wert mit der Bildung von Butyrat zu sinken (**Abbildung 2.4-11**). Mit Erreichen des geringsten pH-Wertes von 4,9 nach 18 h setzte die solventogene Phase ein. Die Butyrat-Konzentration nahm auf 0,1-0,2 g/L ab (**Abbildung 2.4-11 B**), während der pH-Wert nach 32 h wieder bis auf 5,3 anstieg und nach 44 h wieder auf 5,1 abfiel. Der pH-Wert stieg nun bis zum Ende auf 6 an, wobei nach Medien- oder Acetatzugabe ein leichter pH-Wert-Anstieg zu verzeichnen war. Der Verbrauch von Glucose und Acetat nahm mit der  $OD_{535}$  zu, welche nach 67 h das erste Mal ein Maximum von 9,4 erreichte, hinterher aber wieder einbrach. Nach 93 h lag die  $OD_{535}$  bei 5,4 und erreichte nach 163 h wieder 9,4. Bis 305 h sank die  $OD_{535}$  auf 5,2 ab. Nach 305 h wurde die Rührerdrehzahl auf 400 upm erhöht, um abgesetzte Zellen in Suspension zu bringen, wodurch die  $OD_{535}$  nach 331 h auf 6,1 anstieg.

Das Zuführen konzentrierter Medienlösungen (YA- oder A-Medium) konnte durch einen Anstieg der Acetatkonzentration bei 67 h, 124 h, 145 h, 189 h, 214 h und 261 h beobachtet werden (**Abbildung 2.4-11 B**). Die Zugabe der Medienlösungen ergab eine Acetat-Konzentration von anfangs etwa 2 g/L sowie bei den letzten drei Zugabe-Zeitpunkten 1 g/L. Glucose wurde ebenfalls bei Bedarf nachgeführt und fiel nie unter 10 g/L. Zum Ende der Fermentation ( $\geq 305$  h) verblieb die Glucose-Konzentration auf 16,5 g/L.



**Abbildung 2.4-12:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen ( $\Delta, \square$ ) Konzentrationen von Butanol (A), Aceton (B) und Ethanol (C) in wässriger ( $\square$ ) und organischer ( $\Delta$ ) Phase einer 2-Phasen-Fedbatch-Fermentation mit YA-Glucose Medium und Isofol<sup>®</sup>12 als organische Phase, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar, 200 RPM, Start-pH-Wert: 5,7: Die nach unten zeigenden Dreiecke bezeichnen die Zugabe von Substrat, Isofol<sup>®</sup>12 oder Medienbestandteilen (vgl. **Abbildung 2.4-11**)

17 h nach Start der Fermentation begann, mit Einsetzen der solventogenen Phase, die ABE-Produktion (**Abbildung 2.4-12**). Nach 65 h wurden 8,8 g/L Butanol, 2 g/L Aceton und 0,4 g/L Ethanol erreicht, was einem A:B:E-Verhältnis von 5:22:1 entspricht. Die Einleitung des Extraktionsmittels (900 mL Isofol<sup>®</sup>12) führte zu einem sofortigen Absinken der Butanol-Konzentration in der wässrigen Phase (~600 mL YA-Medium) und einem Anstieg der Butanol-Konzentration in der organischen Phase. Nach 123 h erreichte Butanol im Medium eine Konzentration von 3,1 g/L, stieg bis 210 h wieder auf 4,4 g/L an und erreichte nach 377 h 3,5 g/L. Die stetige Zunahme der Butanol-Konzentration in der organischen Phase begann nach 65 h und wuchs innerhalb von 377 h auf 17,8 g/L an (**Abbildung 2.4-12 A**). In diesem Versuch bei 26 °C betrug der Verteilungskoeffizient

( $k_{E/W}$ ) für Butanol in Isofol®12 und Kulturbrühe 5,06 und bestätigten die Ergebnisse in **Tabelle 2.5-2**).

Bei Aceton und Ethanol verringerte sich mit Zugabe des Extraktionsmittels der Anstieg der Konzentrationsverläufe (**Abbildung 2.4-12 B, C**). Aceton erreichte in der wässrigen Phase eine Konzentration von 4,7 g/L und ging mit bis zu 2,1 g/L in das Extraktionsmittel über. Dies entspricht einem  $k_{E/W}$  für Aceton in Isofol®12 und Kulturbrühe von 0,45. Ethanol erreichte zum einen nur eine geringe Konzentration von 1,1 g/L in Kulturbrühe und ging auch nur mit 0,3 g/L in Isofol®12 über, was einem  $k_{E/W}$  von 0,27 entsprach.

## **2.5 Produktgewinnung: Abtrennung und Aufreinigung des n-Butanols aus der Fermentationsbrühe (AP5)**

### **2.5.1 Einleitung**

Dieses Arbeitspaket beschäftigt sich mit der Abtrennung und Aufreinigung des n-Butanols aus der Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentationsbrühe. Aufgrund der Toxizität des n-Butanols auf die Mikroorganismen erreicht die Fermentation nur geringe Endkonzentrationen um 15 g/L, was hohe Prozesskosten zur Folge haben kann. Dem wirkt ein effektives Downstreaming entgegen. Kann das Downstreaming in situ durchgeführt werden, sodass n-Butanol bereits während der Fermentation aus der Brühe abgetrennt wird, verringert sich die toxische Wirkung und es werden zusätzlich höhere Ausbeuten erreicht.

In dem hier bearbeiteten Projekt wurden die Trennverfahren Adsorption, Extraktion und Reaktivextraktion untersucht, weil diese im Vergleich zu Gas Stripping und Pervaporation weniger Energie benötigen [Qureshi et al., 2005]. Die zwei erstgenannten können in situ durchgeführt werden, sofern die Adsorber und Extraktionsmittel bioverträglich sind. Die Reaktivextraktion wurde bei einer Mindesttemperatur von 75°C und unter Zugabe von Schwefelsäure als Katalysator durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die hier verwendeten Mikroorganismen *Clostridium saccharoperbutylaceticum* N1-4 nicht lebensfähig, weshalb dieses Trennverfahren nur ex situ angewendet werden kann. Die Versuche wurden überwiegend mit einer Modelllösung durchgeführt, welche aus deionisiertem Wasser mit 15 g/l n-Butanol bestand. Bei der Adsorption und Extraktion wurden zusätzliche Versuche mit synthetischer Fermentationsbrühe durchgeführt, um die Einflüsse der anderen Substanzen in der Brühe zu berücksichtigen. Die synthetische Fermentationsbrühe bestand aus deionisiertem Wasser mit 15 g/L n-Butanol, 1 g/L Natriumlactat, 60 g/L Glucose Monohydrat, 1 g/L Buttersäure, 5 g/L Aceton, 1 g/L Ethanol und 2 g/L Essigsäure. Der pH-Wert lag bei 6.

Nach einer kurzen Beschreibung der verwendeten Analytik wird genauer auf die Trennverfahren eingegangen.

## 2.5.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

### Einleitung

Da in der Literatur die Flüssig-Flüssig-Extraktion als vielversprechender Ansatz beschrieben wird, um n-Butanol aus Fermentationsbrühen zu gewinnen [Groot et al, 1992], wurde diese genauer untersucht. Die Vorteile dieses Trennverfahrens liegen in der einfachen Handhabung, dem geringen Energieverbrauch und der guten Selektivität. Die Kapazität hängt stark vom verwendeten Extraktionsmittel ab. Außerdem kann die Flüssig-Flüssig-Extraktion in situ durchgeführt werden, dessen Vorteile bereits in der Einleitung beschrieben wurden. Es wurden verschiedene Extraktionsmittel untersucht. Diese waren n-Heptan, n-Decanol, Isofol 12 (2-Butyloctan-1-ol), Isofol 14T (Mischung aus i-C12OH, i-C14OH und i-C16OH), Isofol 16 (2-hexyldecan-1-ol), Isofol 20 (2-octyldodecan-1-ol) und Oleylalkohol.

### Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Zum Vergleich der Extraktionsmittel wurde jeweils der Verteilungskoeffizient  $k$  bestimmt, welcher das Verhältnis der Butanol-Konzentration im organischen Extraktionsmittel zu der Butanol-Konzentration in der wässrigen Modelllösung angibt. Dazu wurde die Modelllösung (15 g/L n-Butanol in deionisiertem Wasser) und das Extraktionsmittel mit einem Turrax bei 25 °C und einem Volumenverhältnis zwischen Modelllösung und Extraktionsmittel von 1:1 emulgiert und ein zeitlicher Verlauf der Butanol Konzentration in beiden Phasen aufgenommen. Nach Erreichen des Gleichgewichtes wurde der Verteilungskoeffizient berechnet. Zudem wurde im Rahmen des Arbeitspaketes 4 „Entwicklung und Optimierung der Fermentation die Bioverträglichkeit der Extraktionsmittel auf das *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2.5-1** dargestellt:

**Tabelle 2.5-1:** Verteilungskoeffizienten  $k$  (25°C), Siedepunkt und Bioverträglichkeit der Extraktionsmittel

Extraktionsmittel	$k$	Bioverträglichkeit [Arbeitspaket 4]	Siedepunkt [°C]
n-Heptan	0,2	+	98
n-Decanol	5,4	-	230
Isofol 12	4,3	+	ca. 243
Isofol 14T	3,5	+	ca. 245-305
Isofol 16	2,9	+	ca. > 285
Oleylalkohol	3,1	+	330-360

Es ist ersichtlich, dass bei dieser Auswahl 1-Decanol n-Butanol am besten aus der Modelllösung extrahiert. Da es jedoch toxisch auf die Mikroorganismen wirkt, kann das n-Butanol hiermit nur ex situ isoliert werden. Extraktionsmittel mit einem hohen Verteilungskoeffizienten sind meistens nicht bioverträglich [Kapucu et al, 1998]. Da ein in situ-Trennverfahren jedoch vorteilhaft bezüglich Kosten und Ausbeute ist, wurde für weitere Untersuchung das Isofol 12 gewählt. Es ist bioverträglich und weist dennoch mit 4,3 bei 25 °C einen guten Verteilungskoeffizienten auf. Der hohe Sie-

depunkt des Isofol 12 von ca. 243 °C ermöglicht eine energetisch günstige Destillation des n-Butanols aus dem Extraktionsmittel, da es mit 117 °C einen niedrigeren Siedepunkt besitzt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Extraktionsverhalten von n-Butanol in Isofol 12 beeinflusst wird, wenn es anstelle aus einer Modellösung aus einer synthetischen Fermentationsbrühe abgetrennt wird. Die Zusammensetzung der synthetischen Fermentationsbrühe kann aus der Einleitung (Kap. 2.5.1) entnommen werden. Die Verteilungskoeffizienten der verschiedenen Substanzen sind in **Tabelle 2.5-2** zusammengefasst.

**Tabelle 2.5-2:** Verteilungskoeffizienten k (25 °C) in Isofol 12 aus einer synthetischen Fermentationsbrühe

Substanz	k
n-Butanol	5,0
Aceton	0,4
Ethanol	0,2
Buttersäure	0,1
Glucose	0
Lactat	0
Essigsäure	0

Wie aus **Tabelle 2.5-2** ersichtlich, verbessert sich der Verteilungskoeffizient für n-Butanol in Isofol 12 durch die Zugabe weiterer Fermentationssubstanzen zu einem Wert von 5,0. Positiv ist auch, dass Glucose vollständig und Buttersäure überwiegend in der wässrigen Lösung verbleiben. Dies ist wichtig, da sie zur Produktion von n-Butanol benötigt werden.

Da der Verteilungskoeffizient temperaturabhängig ist, wurde er von Isofol 12 für verschiedene Temperaturen bestimmt. Die Werte sind in **Tabelle 2.5-3** aufgeführt.

**Tabelle 2.5-3:** Verteilungskoeffizienten k für n-Butanol aus Wasser in Isofol 12 bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur [°C]	k
25	4,3
30	4,4
40	4,9

In **Tabelle 2.5-3** ist eine deutliche Temperaturabhängigkeit zu erkennen. Je höher die Temperatur ist, desto höher ist der Verteilungskoeffizient für n-Butanol aus Wasser in Isofol 12. Er steigt von 4,3 bei 25 °C auf 4,9 bei 40°C. Die Fermentation mit Zugabe von Isofol 12 im Arbeitspaket 4 dieses Projektes wurde bei 27 °C durchgeführt. Dabei war ebenfalls der Einfluss der weiteren Substanzen

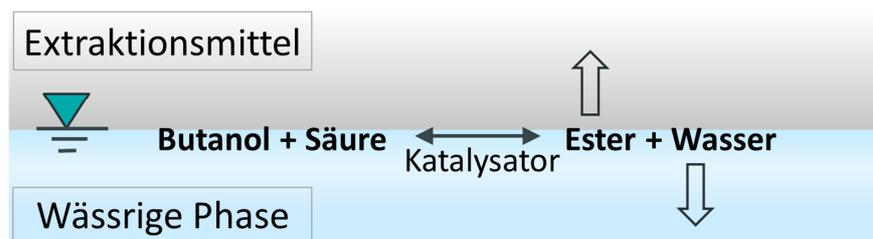
in der Fermentationsbrühe bemerkbar, sodass der Verteilungskoeffizient von n-Butanol bei gleichem pH-Wert über 5,0 lag.

Um den Verteilungskoeffizienten zu verbessern, gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen wird einem bioverträglichen Extraktionsmittel mit geringem Verteilungskoeffizienten ein toxisches mit einem höheren Verteilungskoeffizienten beigemischt [Evans et al, 1988]. Zum anderen gibt es Versuche, das Fermentationsprodukt in ein Derivat umzuwandeln, welches sich stärker im Extraktionsmittel löst als das ursprüngliche Produkt. Diese sogenannte Reaktivextraktion wurde für Ethanol von Kim [Kim et al, 1999] durchgeführt und wird hier für n-Butanol aus Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentationsbrühen untersucht.

### 2.5.3 Reaktivextraktion

Für die Reaktivextraktion von n-Butanol wurde hier die Veresterungsreaktion gewählt, da Ester hydrophob sind und 60 % des n-Butanols ohnehin industriell zu Estern weiterverarbeitet werden [Harvey et al, 2011]. Eine gelungene Reaktivextraktion beinhaltet somit zwei Prozesse in einem Schritt und bewirkt eine Prozessintensivierung.

Während der Reaktivextraktion werden n-Butanol und Säure säurekatalytisch zu Ester und Wasser umgesetzt. Eine solche Reaktion ist in wässrigen Lösungen wie z.B. einer Fermentationsbrühe nicht möglich, da das Reaktionsgleichgewicht bereits aufgrund des vorherrschenden Wassers auf der Produktseite liegt. Hier konnte jedoch die Veresterung in der wässrigen Modelllösung erfolgreich durchgeführt werden, da der Ester durch die gleichzeitige Extraktion mit einem organischen Extraktionsmittel sofort der Rückreaktion entzogen wurde und sich somit das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Esterbildung verschob. Dieser Vorgang ist in **Abbildung 2.5-1** schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.5-1:** Schema einer Reaktivextraktion

Es wurde überwiegend mit n-Heptan als Lösemittel gearbeitet, da es sowohl keine Toxizität gegenüber Mikroorganismen aufweist als auch sehr schlecht in Wasser löslich ist (2,2 mg/L bei 25°C).

#### **Versuchsaufbau und Durchführung**

Butanol/Wasser sowie Butanol/Heptan bilden ein Azeotrop, welche beide bei 93°C sieden [Handbook of Chemistry and Physics, 53<sup>rd</sup> Edition]. Um Verdampfungsverluste zu vermeiden, wurde die Reaktivextraktion in einem geschlossenen Reaktor untersucht. Er besteht aus druckfestem Glas und fasst ein Volumen von 400 ml. Ein Temperaturfühler, ein Drucksensor, ein Probenentnahme-

rohr sowie eine mittig angeordnete Rührwelle mit Rührkopf sind im Reaktordeckel integriert. Über einen Doppelmantel kann die Reaktionstemperatur mit einem Thermostat konstant eingestellt werden. Ein Foto des Versuchsaufbaus ist in **Abbildung 2.5-2** zu sehen.



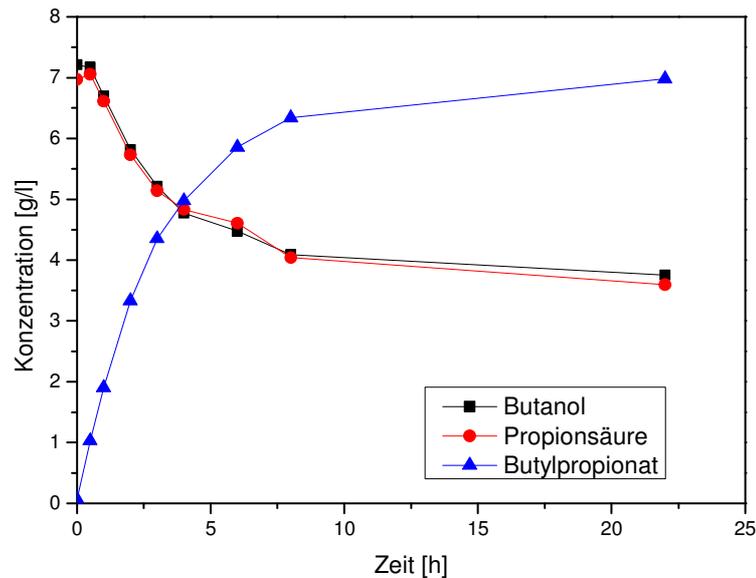
**Abbildung 2.5-2:** Foto des Versuchsaufbaus für die Reaktivextraktion

Die Versuche wurden mit einem Gesamtvolumen von 360 mL bei 75 °C und 1200 upm durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurde n-Heptan und als Katalysator 98 %ige Schwefelsäure verwendet. Die eingesetzte Katalysatormenge betrug 10 Gew % der wässrigen Modelllösung, in welcher 15 g/L n-Butanol enthalten waren. Die zur Veresterung eingesetzte Säure lag stöchiometrisch zu n-Butanol in der Modelllösung vor.

Außer der Schwefelsäure wurden alle Einsatzstoffe bei Raumtemperatur in den Reaktor gegeben. Nach Schließung des Reaktors erfolgte die Aufheizung auf 75 °C über den Thermostat. Sobald die Temperatur erreicht war, wurde der Katalysator zugegeben und damit die Reaktion gestartet.

Die Reaktivextraktion wurde mit folgenden Säuren als Reaktionspartner untersucht: Propionsäure, Acrylsäure, Essigsäure, Octansäure, 3-Chlorpropionsäure und 4-Pentensäure.

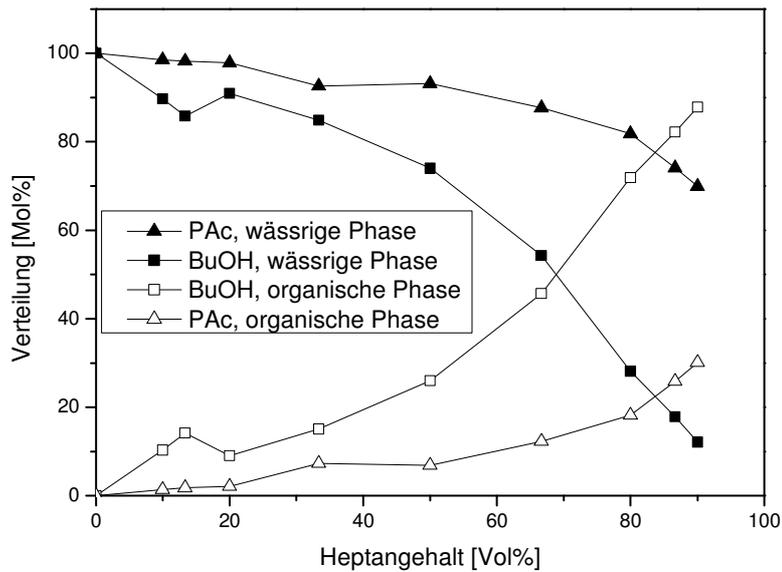
In **Abbildung 2.5-3** ist der Reaktionsverlauf anhand der Reaktion mit Propionsäure exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 2.5-3:** Reaktionsverlauf der Veresterung von n-Butanol mit Propionsäure

Die dargestellten Konzentrationsverläufe beziehen sich auf das Gesamtvolumen und sind somit abhängig vom Phasenverhältnis zwischen n-Heptan und der wässrigen Modelllösung. Bei dem Versuch aus **Abbildung 2.5-3** beträgt das Phasenverhältnis 1:1, woraus sich die Anfangskonzentrationen von n-Butanol und der Propionsäure von ca. 7,5 g/L ergeben. Die Konzentrationen von n-Butanol und Propionsäure nehmen während der Veresterung ab, während sich gleichzeitig Butylpropionat bildet. Auch ist gut zu erkennen, dass sich nach ca. 25 Stunden das Reaktionsgleichgewicht einstellt.

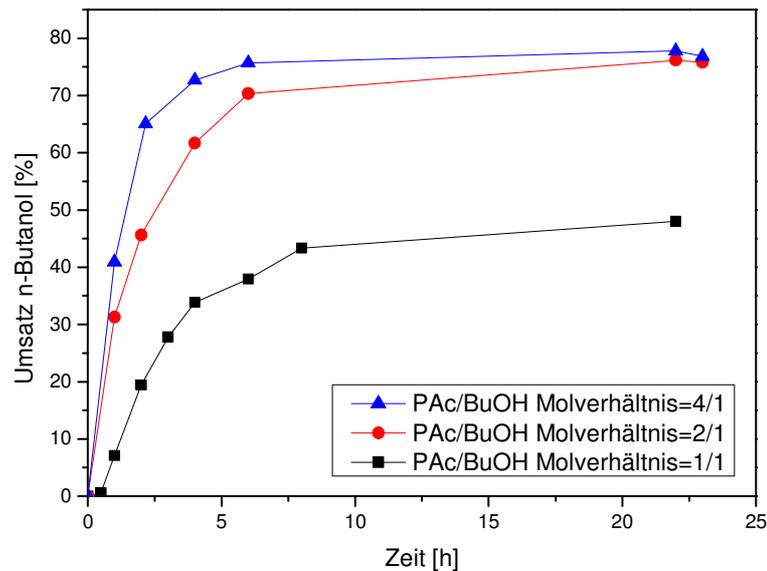
Des Weiteren wurde die Verteilung von n-Butanol (BuOH) und Propionsäure (PAC) auf die verschiedenen Phasen untersucht. Dazu wurde bei gleichbleibendem Gesamtvolumen von 360 mL der Heptangehalt zwischen 0 Vol % und 90 Vol % variiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 2.5-4** aufgetragen.



**Abbildung 2.5-4:** Verteilung von n-Butanol (BuOH) und Propionsäure (PAC) auf die organische und wässrige Phase

Bei niedrigem Heptangehalt sind n-Butanol und Propionsäure überwiegend in der wässrigen Modelllösung gelöst. Je mehr n-Heptan zugegeben wird, desto mehr n-Butanol löst sich darin bis bei 90 %igem Heptangehalt 88 % des n-Butanols in das n-Heptan übergegangen ist. Die Propionsäure löst sich dagegen schlecht in n-Heptan und erreicht dort nur einen Maximalwert von 30 %. Das Molverhältnis der Edukte in der wässrigen Modelllösung ist also stark von der eingesetzten Menge an n-Heptan abhängig. Je größer der Heptangehalt ist, desto größer wird das Molverhältnis von Propionsäure zu n-Butanol.

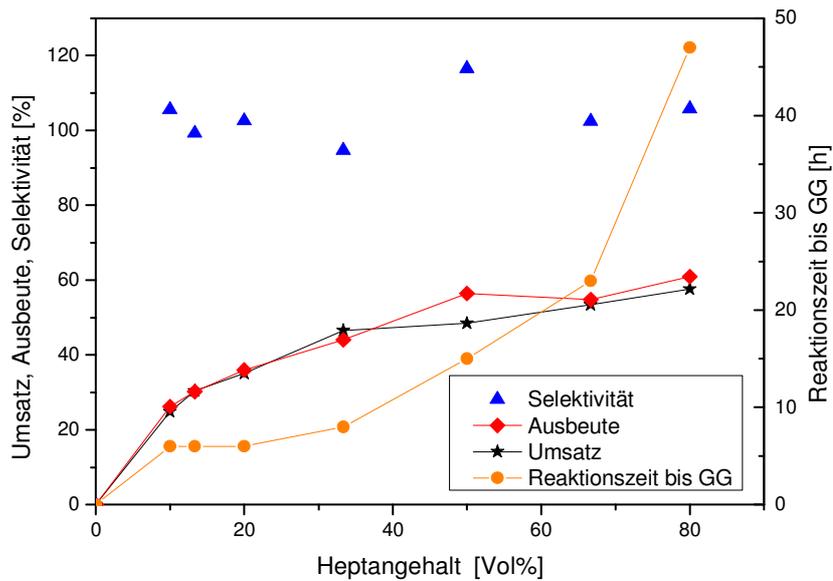
Daraus ergibt sich die Frage, wie sich das Molverhältnis der Edukte auf den Umsatz von n-Butanol auswirkt. Dazu wurde der Versuch aus **Abbildung 2.5-3** mit zweifachem und vierfachem molarem Überschuss an Propionsäure durchgeführt und der Umsatz von n-Butanol über die Zeit aufgetragen. Die Darstellung der Ergebnisse findet sich in **Abbildung 2.5-5**.



**Abbildung 2.5-5:** Einfluss des Eduktverhältnisses auf den Umsatz von n-Butanol

Aus **Abbildung 2.5-5** ist deutlich zu erkennen, dass der Umsatz von n-Butanol mit zunehmendem Überschuss an Propionsäure steigt. Bei einem Molverhältnis zwischen Propionsäure und n-Butanol von 4:1 kann der Umsatz von n-Butanol auf 76 % fast verdoppelt werden im Gegensatz zu einem Umsatz von 47 % bei einem Molverhältnis von 1/1.

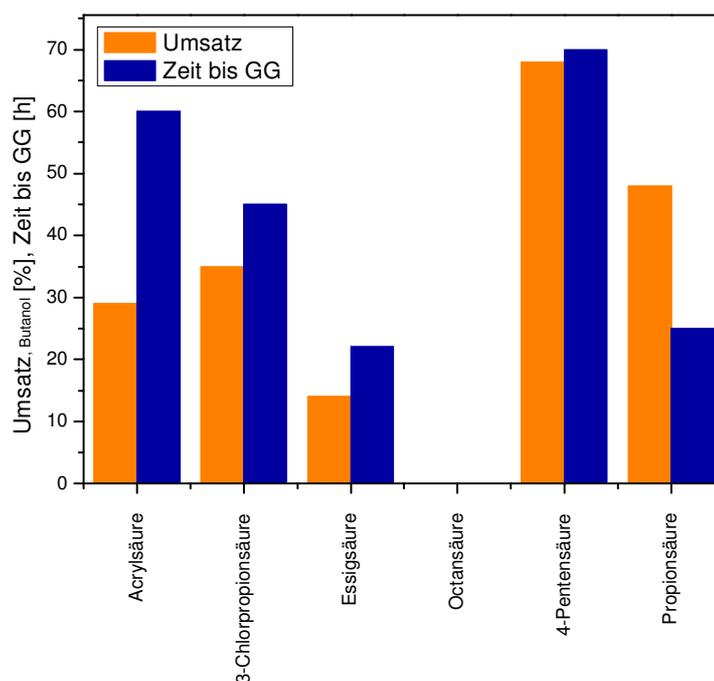
Zusammen mit der Erkenntnis, dass das Molverhältnis mit steigendem Heptangehalt größer wird, folgt, dass auch der Umsatz von n-Butanol mit steigendem Heptangehalt verbessert wird. Um dies zu verdeutlichen, wurden die Versuche aus **Abbildung 2.5-4** nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes hinsichtlich des Umsatzes, der Ausbeute, der Selektivität und der Dauer bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes (GG) analysiert. Die Ergebnisse können der **Abbildung 2.5-6** entnommen werden.



**Abbildung 2.5-6:** Umsatz, Ausbeute, Selektivität und Zeit bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes (GG) in Abhängigkeit vom Heptangehalt

Aus **Abbildung 2.5-6** geht hervor, dass sich der Umsatz von n-Butanol mit einem 10 %igem Heptangehalt von 25 % auf 58 % steigern lässt, wenn der Heptangehalt auf 80 % erhöht wird. Da bei der Veresterung mit Propionsäure keine Nebenreaktionen auftreten, steigt die Ausbeute gleichermaßen an. Allerdings gibt es bei hohen Heptanmengen neben den hohen Massenströmen noch den Nachteil der längeren Reaktionszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtes. Denn je mehr n-Heptan zugegeben wird, desto verdünnter liegt n-Butanol in der wässrigen Modelllösung vor, in welcher die Veresterungsreaktion stattfindet. In diesem Fall steigt sie von 6 h auf 47 h an. Es muss also zwischen Ausbeute, Reaktionszeit und Massenströmen ein Kompromiss gefunden werden.

Außer der Propion- und Acrylsäure wurden 3-Chlorpropionsäure, 4-Pentensäure, Octansäure und Essigsäure für die Reaktivextraktion getestet. Das Phasenverhältnis betrug jeweils 1:1. Die maximal erreichten Umsätze von n-Butanol und die Zeit bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes (GG) sind in **Abbildung 2.5-7** dargestellt.



**Abbildung 2.5-7:** Umsatz von n-Butanol und Reaktionszeit für Veresterung mit verschiedenen Säuren

Bei der Reaktivextraktion mit 4-Pentensäuren wird der höchste Umsatz an n-Butanol mit 68 % erreicht. Allerdings ist hier die Zeit bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes mit 70 h am längsten. Mit Octansäure wird kein Umsatz erzielt. Octansäure löst sich nur in n-Heptan wogegen der Katalysator in der wässrigen Modelllösung vorliegt, sodass die säurekatalytische Veresterungsreaktion nicht abläuft.

Außerdem wurden die Reaktionen hinsichtlich ihrer Nebenreaktionen geprüft. Bei der Veresterung mit Propionsäure und Essigsäure entstanden keine Nebenprodukte. 3-Chlorpropionsäure reagierte mit der als Katalysator eingesetzten 98 %-igem Schwefelsäure zu Salz- und Acrylsäure. Dies erklärt den entgegen den Erwartungen geringen Umsatz zu 3-Chlorpropionsäurebutylester. Denn aufgrund des elektronenziehenden induktiven Effektes des Chloratoms, sollte die nukleophile Addition der Veresterungsreaktion stärker begünstigt werden, als bei den anderen eingesetzten Säuren. Bei den Reaktionen mit 4-Pentensäure und Acrylsäure entstanden ebenfalls Nebenprodukte, welche jedoch nicht qualifiziert werden konnten.

## 2.5.4 Adsorption

### *Einleitung*

Die Abtrennung von n-Butanol aus der Fermentationsbrühe mittels Adsorption ist ein einfaches Verfahren, da der Adsorber als Feststoff vorliegt und leicht von der Fermentationsbrühe abgetrennt werden kann. Es kann jedoch nur sinnvoll angewendet werden, wenn der Adsorber eine hohe Selektivität und Kapazität für n-Butanol aufweist.

## Durchführung

Für die Adsorptionsversuche kamen verschiedene Aktivkohlen, Hytrel (Elastomer) und Polystyren zum Einsatz. Dabei wurden 20 ml Modelllösung mit einer Butanol-Konzentration von 15 g/L mit je 2 g Adsorber in einem geschlossenen Behälter für 28 Stunden bei 25 °C und 100 upm in einen Schüttler gestellt. Um die Verfahren der Adsorption und der Flüssig-Flüssig-Extraktion miteinander vergleichen zu können, wurde der Verteilungskoeffizient für n-Butanol in Isofol 12 mit einem vergleichbaren Volumenverhältnis der Phasen bestimmt. Dazu wurde zu 20 mL Modelllösung 2 g Isofol 12 gegeben, was einem Volumenverhältnis von 8/1 entspricht.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Adsorptionsversuche sind in **Tabelle 2.5-4** aufgeführt.

**Tabelle 2.5-4:** Beladung verschiedener Adsorber mit n-Butanol in Modelllösung mit 15 g/L Anfangskonzentration

Adsorber	C <sub>n</sub> -Butanol nach 28 h [g/L]	Beladung [mg <sub>Adsorpt</sub> /g <sub>Adsorber</sub> ]
Aktivkohle: Hydrodarco C (Pulver)	6,2	88
Aktivkohle: Norit PK 1-3 (Körner, 1mm)	2,4	126
Elastomer: Hytrel (Plättchen, 1x2 mm)	15	0
Polystyrol (Vollchips, 6x4 mm)	15	0
Isofol® 12 (viskose Flüssigkeit)	9,5	55

Die Aktivkohle Norit PK 1-3 adsorbiert mit einer Beladung von 126 mg<sub>Adsorpt</sub>/g<sub>Adsorber</sub> am meisten n-Butanol aus dieser Auswahl. Polystyrol und das Elastomer Hytrel kommen als Adsorber für n-Butanol dagegen nicht in Frage. Der Vergleich mit Isofol 12 zeigt, dass hiermit weniger n-Butanol extrahiert wird als bei der Adsorption mit Aktivkohle.

Wie schon bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde auch hier das Adsorptionsverhalten von n-Butanol im Zusammenhang mit weiteren Substanzen aus Fermentationsbrühen untersucht. Dafür wurde dieselbe synthetische Fermentationsbrühe wie für die Extraktionsversuche eingesetzt (vgl. Kap. 2.5.1).

**Tabelle 2.5-5:** Beladung verschiedener Adsorber mit n-Butanol in synthetischer Fermentationsbrühe

Substanz	Beladung [mg <sub>Adsorpt</sub> /g <sub>Adsorber</sub> ]		
	Aktivkohle, Hydrodarco C	Aktivkohle, Norit PK 1-3	Isofol 12
n-Butanol	83	116	63
Aceton	12	18	4
Ethanol	0	1	0
Buttersäure	1	0	0
Glucose	16	20	0
Lactat	1	0	0
Essigsäure	0	0	0

Die Adsorptionsleistung der Aktivkohle Norit PK 1-3 aus **Tabelle 2.5-5** liegt für n-Butanol mit einer Beladung von 116 mg/g im selben Bereich wie bei den vorherigen Versuchen mit wässriger Modelllösung. Adsorption ist also auch für die Anwendung in Fermentationsbrühen gut geeignet, um n-Butanol daraus abzutrennen. Die für die Butanol-Bildung erforderliche Buttersäure verbleibt vollständig in der Fermentationsbrühe. Glucose wird bei einer hohen Anfangskonzentration von 60 g/L Glucose Monohydrat mit einer Beladung von 20 mg Glucose/g Adsorber verhältnismäßig wenig adsorbiert.

Im Vergleich zur Aktivkohle extrahiert Isofol 12 mit 63 mg/g Adsorber weniger n-Butanol aus der synthetischen Fermentationsbrühe. Allerdings entstehen bei Verwendung von Isofol 12 weder Verluste von Buttersäure noch von Glucose.

Extraktionsversuche mit realen Fermentationsbrühen aus dem Arbeitspaket 4 zeigen, dass bei gleichem pH-Wert der Extraktionskoeffizient für n-Butanol in Isofol 12 höher ist, als bei den hier gezeigten Versuchen mit synthetischer Fermentationsbrühe. Dieser Trend ist für die Adsorption mit Aktivkohle nicht zu erwarten, da ein Vergleich zwischen Modelllösung und synthetischer Fermentationsbrühe keinen Einfluss auf die Beladung mit n-Butanol zeigte. Außerdem muss bei der Adsorption mit Aktivkohle beachtet werden, dass zusätzliche Verfahrensschritte zur Vermeidung des Bewuchses mit Mikroorganismen auf der Aktivkohle und bei der Gewinnung des n-Butanols von der Aktivkohle notwendig sind.

### 2.5.5 Zusammenfassung

Für die Abtrennung und Aufreinigung des n-Butanols aus der ABE-Fermentationsbrühe wurden Extraktion und Adsorption als auch in-situ-Verfahren untersucht. Das bioverträgliche Extraktionsmittel Isofol 12 mit einem Verteilungskoeffizienten von 4,3 und der Adsorber Aktivkohle Norit PK 1-3 mit einer Beladung von 126 mg/g erzielten bei 25°C die besten Ergebnisse. Außerdem wurde das ex situ-Verfahren der Reaktivextraktion mit Veresterung des n-Butanols durchgeführt, bei welcher unter anderem die Reaktion mit Propionsäure einen Butanol-Umsatz von 48 % ohne Nebenreaktionen ermöglichte.

## 2.6 Bewertung und Auswahl von Softwaretools (AP 6.1) und Datenbanken (AP 6.2)

Es gibt eine Reihe von Umweltbewertungsinstrumenten, die entweder alleinstehend oder durch Kombination mit anderen Berechnungsinstrumenten eine Abschätzung der Nachhaltigkeit von biotechnologischen Konversionsverfahren zur Herstellung von Butanol mehr oder weniger gut erlauben, allerdings ist derzeit die Datenlage für eine detaillierte Analyse nicht gegeben. Im Folgenden werden die Stärken und Schwächen ausgewählter Berechnungsinstrumente sowie deren Funktionalität beschrieben.

Einige Berechnungsinstrumente sind für die Bewertung von Biotreibstoffen entwickelt worden, z. B. Biograce (<http://www.biograce.net>) und GREET (<http://greet.es.anl.gov>) oder aber für das Produkt-labeling, z.B. UMBERTO for Carbon footprint (UMBERTO for CF). Diese Instrumente zielen nur auf die Beurteilung von Produkten bzw. Verfahren bezüglich ihrer Klimarelevanz ab, andere Umweltaspekte (Eutrophierung oder Auswirkung auf die menschliche Gesundheit) werden nicht berücksichtigt, daher müssten diese Instrumente mit anderen Bewertungsinstrumenten gekoppelt werden. Dies gestaltet sich in der Regel schwierig, da ihre Flexibilität durch methodische Vorgaben stark eingeschränkt ist. Einschränkungen ergeben sich aus dem Zweck der Analyse, sollen Biotreibstoffe gemäß der Europäischen Erneuerbaren Energierichtlinie EU-RED [BSI 2008; EU 2009] bewertet werden, so müssen deren methodische Vorgaben befolgt werden gleiches gilt für Analysen zum Produkt Carbon footprint gemäß PAS2050 [BSI 2008] oder aber dem System Environmental Product Declaration (EPD). Ziel dieser drei Ansätze ist die Vergleichbarkeit zwischen konkurrierenden Produkten, daher werden die methodischen Freiheitsgrade wie Systemgrenzen, Allokationsansatz, Hintergrunddaten, etc. stark eingeschränkt und somit sind diese Instrumente für die Prozessentwicklung und -optimierung in der Regel von begrenztem Nutzen.

Eco-Efficiency und SEEBalance sind von der BASF entwickelte Bewertungsinstrumente. EcoEfficiency berücksichtigt ökonomische und ökologische Aspekte, während SEEBalance zusätzlich soziale Aspekte berücksichtigt. Diese Instrumente werden überwiegend für BASF-Produkte eingesetzt; die Instrumente werden nicht als kommerzielle Produkte vertrieben, allerdings bietet die BASF ihren Kunden aber auch Externen die Erstellung von entsprechenden Analysen als kostenpflichtige Dienstleistung an. Die methodischen Grundlagen sind in der Literatur beschrieben [Saling, Kicherer et al. 2002; Shonnard, Kicherer et al. 2003; Saling, Maisch et al. 2005]. Obwohl die Methodik offengelegt ist, ist die Transparenz der zugrunde liegenden Hintergrunddaten begrenzt. Außerdem ist die Nähe zu einem der „Big Player in der chemischen Industrie mit gewissen Nachteilen verbunden, insbesondere hinsichtlich der Einschätzung von Außenstehenden in Bezug auf Unabhängigkeit bzw. Unvoreingenommenheit.

GEMIS und CCaLC sind freiverfügbare Instrumente, die sowohl eine eingeschränkte Ökobilanzierung aber auch ökonomische Bewertung erlauben. Beide sind als Stand-alone Anwendungen entwickelt worden, wobei GEMIS eine eigene, wenn auch nicht immer konsistente, Datenbank beinhaltet und sich besonders für die Analyse energierelevanter Fragestellungen eignet. GEMIS hat jedoch insbesondere hinsichtlich der Umweltauswirkungen, insbesondere Eutrophierung und Versauerung, von Agrarprodukten Schwächen. Die beiden genannten Umweltauswirkungen wer-

den überwiegend aus den Emissionen, die bei der energetischen Nutzung der Produkte entstehen berechnet, Feldemissionen werden in der Regel nicht vollständig erfasst, so dass es im Sinne einer kompletten Ökobilanzierung zu Unterbefunden kommen kann. Allerdings ist die zugrunde liegende Methodik klar beschrieben; diese muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. GEMIS war bis 2011 als Download auf der Internet-Seite des Ökoinstituts Darmstadt frei verfügbar.

CCaLC ist ein Makro-basiertes EXCEL tool, welches speziell für KMUs an der Universität Manchester entwickelt wurde. CCaLC ermöglicht die Berechnung des Carbon Footprints von Produkten und Prozessen, aber auch anderer, ausgewählter Umweltaspekte gemäß der CML-Bewertungsmethodik. Darüber hinaus können auch ökonomische Value-added Analysen und Water footprint Analysen angefertigt werden. Ergänzend zur CCaLC Datenbank, die auf der PAS2050 Methodik beruht, sind die Carbon footprint Hintergrunddaten der ECOINVENT-Datenbank Version 2.0 verfügbar sowie die Hintergrund Daten der ILCD hinterlegt. Die Funktionalität umfasst verschiedene Allokationsmethoden, Szenario-Analysen, die vergleichende Betrachtung von Ergebnissen sowie Export- und Import-Funktionen zum Austausch von Daten innerhalb einer Zuliefererkette. Die umfassenden Datenbanken haben jedoch entsprechend lange „Lade- und Speicherzeiten zur Folge, außerdem ist unklar wie lange die Software und die Datenbanken aktualisiert werden. CCaLC ist nur in der englischen Version verfügbar und kann kostenfrei von folgender Homepage heruntergeladen werden: [www.ccalc.org.uk](http://www.ccalc.org.uk)

UMBERTO, Sima Pro und GABI sind professionelle Lebenszyklusbewertungsinstrumente, die alle eine Implementierung der ECOINVENT-Datenbank ([www.ecoinvent.org](http://www.ecoinvent.org)) erlauben und regelmäßig aktualisiert werden. Alle drei Hersteller arbeiten auch als Dienstleister und vertreiben zusätzliche Datenbanken bzw. Datensätze. Alle drei Tools erlauben:

- Die Aktualisierung alter Datensätze und Modelle
- Parametrisierte Modellierung und Allokationsmodellierung auf Prozessebene
- Die Vernetzung über verschiedenen Hierarchieebenen
- Verwendung verschiedener Wirkungsabschätzungsmethoden
- Erstellung eigener Indikatoren
- Szenario-Analysen und vergleichende Analysen
- Unsicherheitsberechnung mit Monte Carlo Analyse
- Graphische Darstellung der Ergebnisse und Sankey-Darstellung
- Exportmöglichkeiten zu MS-EXCEL

Die zugrunde liegende Datenbankkonzepte beeinflussen die Funktionalität und Flexibilität des jeweiligen Instrumentes. SimaPro arbeitet mit einer Matrix-basierten Datenbank und erlaubt daher auch die Analyse anhand von Input/Output und unterstützt somit auch Hybrid-Ökobilanzen, die Prozessmodellierung ist jedoch gewöhnungsbedürftig. GABI beinhaltet eine Objekt-orientierte Datenbank und kann daher Input/output Tabellen nicht verarbeiten, erlaubt aber die intuitive Modellierung von Prozessen. SimaPro und GABI sind geschlossene Ökobilanzinstrumente mit denen Life-Cycle-Costing (LCC) Analysen erstellt werden können, beide folgen strikt dem Konzept der Lebenszyklusanalyse und erlauben daher keine vom LCC-Konzept abweichende ökonomische

Betrachtung, außerdem ist die Anbindung an andere Software weitgehend ausgeschlossen. GABI hat in der aktuellen Version bereits Soziale Indikatoren integriert.

UMBERTO beruht auf dem Konzept neuronaler Netze und verfügt über eine Schnittstelle zu ERP-Systemen von SAP. Der Umfang der UMBERTO-Datenbank ist deutlich kleiner als die Datenbanken von SimaPro und GABI, außerdem ist die Auswahl der festinstallierten Umweltbewertungsmethoden (CML, IMPACT200+, TRACI, RECEIPE, etc.) geringer. Durch die Möglichkeit von PHYTON-Programmierung verfügt UMBERTO über eine im Vergleich zu GABI und SimaPro höhere Flexibilität, auch können mit UMBERTO verschiedene ökonomische Bewertungsansätze mit den vorgegebenen oder selbsterstellten ökologischen Bewertungsmethoden gekoppelt werden.

SABENTO ist ebenso wie UMBERTO for CF eine vereinfachte Version der UMBERTO-Software. Sabento wurde vor allem für die Bewertung von geplanten biotechnologischen Produktionsprozessen bzw. Prozessen in frühen Entwicklungsstadien konzipiert. Es beinhaltet vordefinierte biotechnologische Prozesse ebenso wie vordefinierte soziale Indikatoren. SABENTO ist auf KMUs zugeschnitten und verfügt über keine nicht auch direkt in UMBERTO programmierbare Funktionen. Die vordefinierte Bewertungsmethodik ist nicht sonderlich transparent und für Nicht-Experten von begrenztem Nutzen, außerdem ist die Datenbasis im Vergleich zu GABI, SimaPro, UMBERTO, GEMIS und CCaLC begrenzt.

In **Tabelle 2.6-1** sind verschiedene kommerzielle und frei verfügbare Bewertungsinstrumente zusammengestellt. Die Instrumente sind für verschiedene Fragestellungen entwickelt und unterscheiden sich daher in ihrer Komplexität und Anwenderfreundlichkeit.

**Tabelle 2.6-1:** Übersicht über Tools und Datenbanken

Tools	Carbon footprint	Andere Umwelt Aspekte	Ökonomische Aspekte	Soziale Aspekte	Daten für n-Butanol		Software*
					Fossile Rohstoffe	Na-WaRo	
Biograce	x			-	-	-	F
CCaLC	x	x	x	-	(x)	x	F
GREET	x			-	-	x	F
GEMIS	x	(x)	(x)	-	-	-	F
GABI	x	x	x	(+)	x	-	K
UMBERTO	x	x	x	(+)	x	-	K
UMBERTO for CF	x						K
SABENTO		x	x	+		?	K
SEEBalance	x	x	x	+	?	?	K
SimaPro	x	x	x	?	x	-	K

\*F: Freeware, K: Kommerzielles Produkt

Tools, die sich auf bestimmte Fragestellungen konzentrieren wie z. B. Biotreibstoffe oder Carbon-footprint sind in der Regel einfacher zu bedienen; sie erlauben aber keine umfassende Umweltbewertung und sind daher auch für die Verwendung in diesem Projekt nicht geeignet. Für die vergleichende Ökobilanzierung in AP 6.4 können die klimarelevanten Ergebnisse jedoch als Referenz herangezogen werden.

Freeware-Tools sind kostengünstig, allerdings ist die Aktualisierung von Software und Datenbanken nicht gesichert. Somit sind diese Tools eher für kurzfristige Anwendungen oder als Lerntools geeignet, sollen Prozesse langfristig gesichert und ggf. zu einem späteren Zeitpunkt aktualisiert werden, muss auf professionelle Ökobilanzsoftware-Tools zurückgegriffen werden.

Grundsätzlich eignen sich UMBERTO, GABI und SimaPro gleichermaßen für die Bewertung in diesem Projekt.

### 2.6.1 Ökobilanz der Butanolproduktion (AP 6.3)

Im Rahmen des Projektes sind einzelne Verfahrensschritte untersucht und optimiert worden, diese jedoch nicht in Hinblick auf den gesamten Gesamtprozess kombiniert. Folglich liegen keine für eine Ökobilanz konsistenten und vollständigen Daten vor. Daher wurde die Ökobilanz für die fermentative Butanol Herstellung anhand von Literaturdaten erstellt.

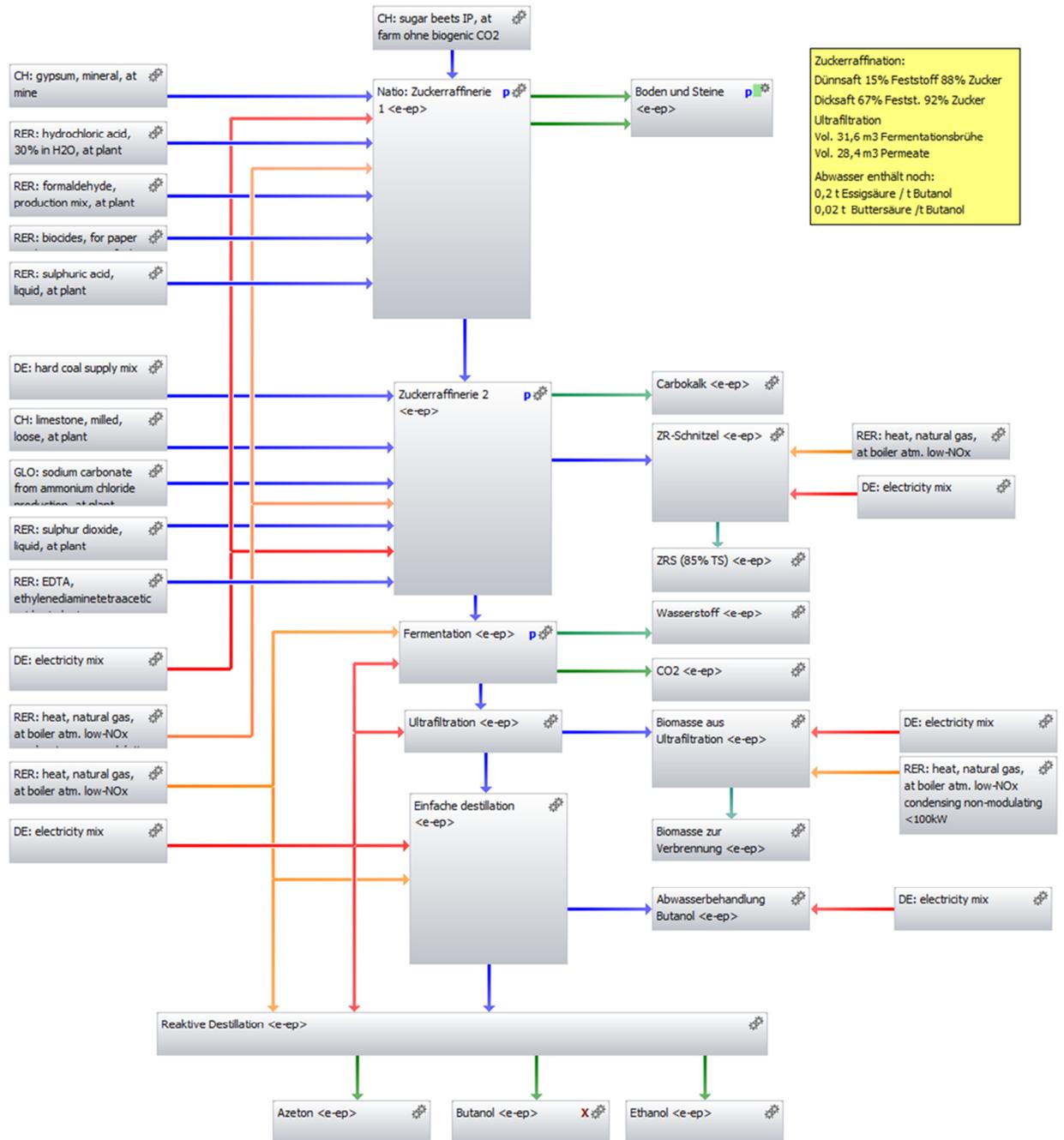
Als Grundlage dient der NNFCC-Report, der auch im CCaLC-Tool verwendet wurde. In dem Report wurden Daten für die fermentative Butanol-Herstellung aus Zuckerrüben entlang des gesamten

Lebensweges erhoben. Kritisch anzumerken ist, dass die Daten sich im Wesentlichen auf den Zeitraum vor 2008 beziehen und die Konzentration von Butanol in der Fermentationsbrühe mit 12,7 g/L eher eine konservative Annahme darstellt. Der NNFCC wird als vertrauliche Datenquelle eingestuft, daher wurden die Sachbilanzdaten keiner Vollständigkeitsprüfung unterworfen; die Plausibilität wurde für relevante Daten anhand von weiteren Literaturwerten geprüft. Als Hintergrunddaten wurde die ECOINVENT-Datenbank Version 2.2 verwendet. Sofern nationale Datensätze vorhanden waren, wurden deutsche Daten verwendet.

Ziel der Studie ist es die Umweltwirkungen der fermentativen Butanol-Herstellung abzuschätzen. Die Butanol-Herstellung ist ein Multi-output-System bei dem neben Butanol auch Aceton, Ethanol, Gase, Futtermittel und vorgetrocknete Biomasse aus der Fermentation zur energetischen Verwertung entstehen. Die Ergebnisse werden sowohl für das Gesamtsystem als auch für Butanol anhand ökonomischer Allokation dargestellt. In der verwendeten Literaturstudie werden auch Preise und virtuelle Preise aufgeführt; diese Daten wurden für die ökonomische Allokation verwendet.

Die Systemgrenze wird bis zum Fabriktor der Butanol-Anlage (cradle-to-gate) festgelegt und die funktionelle Einheit ist definiert als 1 t Butanol. Die Abwasserbehandlung wird mitbetrachtet, jedoch nicht der Transport von Zuckerrüben zur Anlage und der Rücktransport des bei der Zuckerrübenraffination anfallenden Bodens, da der Einfluss des Transportes bei dieser Abschätzung als gering eingestuft wird und die Festlegung der Transportentfernung ohnehin willkürlich wäre.

Das Ökobilanzmodell ist modular aufgebaut, so dass einzelne Module, wenn aktuellere Daten vorliegen, ausgetauscht werden können. Das Modell ist in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt, dabei sind Stoffströme blau, Elektrizitätsströme rot, Wärmeströme orange und Produkt- sowie Nebenproduktströme grün dargestellt. Das Modell wurde mit der Ökobilanzsoftware GABI 6 erstellt.



**Abbildung 2.6-1:** Ökobilanzmodell für die fermentative Herstellung von Butanol aus Zuckerrüben

Bei der fermentativen Herstellung von Butanol aus Zuckerrüben werden auch Futtermittel (FM), Carbokalk, Wasserstoff, biogenes Kohlendioxid, Aceton, Ethanol und Biomasse (BM) aus der Fermentation produziert. Das Futtermittel und die Biomasse aus der Fermentation müssen vor der Verwendung getrocknet werden. Die Produktmassenströme und das Preisverhältnis bezogen auf Butanol sind in **Tabelle 2.6-2** dargestellt.

**Tabelle 2.6-2:** Produktströme bei der fermentativen Herstellung von Butanol aus Zuckerrüben

	Butanol	FM (TS 85 %)	Carbo- kalk	Was- serstoff	Biogenes CO <sub>2</sub>	Aceton	Ethanol	BM (TS 60 %)
<b>Masse [t]</b>	1	3,20	1,46	0,013	2,65	0,48	0,102	3,10
<b>Preisverhältnis</b>	1	0,21	0,01	3,23	0,11	0,83	0,88	0

Für die Wirkungsabschätzung wird die CML Methode [Guinée 2002] basierend auf den im Jahr 2010 aktualisierten Wirkungskoeffizienten verwendet und die folgenden Wirkungskategorien betrachtet:

- Fossiler Ressourcenverbrauch
- Versauerung
- Eutrophierung
- Treibhauseffekt
- Ozonabbau in der Stratosphäre
- Bodennahe Ozonbildung (Sommersmog)

Die genannten Umweltwirkungskategorien haben eine bedeutende Wirkung für das Ökosystem der Erde; es gibt wissenschaftliche Ansätze für ihre Quantifizierung und sie sind (fast) universell anwendbar. Die CML-Methode ist derzeit die am häufigsten verwendete Methode bei der Anwendung von Ökobilanzen. Die CML-Methode umfasst auch eine Reihe von Toxizitäts- und Ökotoxizitätswirkungskategorien, die jedoch mit erheblichen Unsicherheiten behaftet sind, daher werden diese nicht berücksichtigt.

Die in der Ökobilanz definierten Module sind:

- Zuckerrübenanbau (ZR)
- Zuckerrübenraffination (ZR-R)
- Futtermittelaufbereitung (FM)
- Fermentation und Produktaufbereitung (Ferm-Auf)
- Trocknung der bei der Fermentation anfallenden Biomasse (BM)
- Abwasserbehandlung (AWB)

Die Ergebnisse bezogen auf die funktionelle Einheit von 1 t Butanol sind in **Tabelle 2.7-3** dargestellt, außerdem wird der prozentuale Anteil der einzelnen Module in **Tabelle 2.7-4** gezeigt.

**Tabelle 2.6-3:** Umweltwirkungen der fermentativen Herstellung von 1 t Butanol aus Zuckerrüben

	Gesamt	ZR	ZR-R	FM	Ferm-Auf	BM	AWB
<b>Fossiler Ressourcenverbrauch [MJ]</b>	624405	9725	38351	365606	194140	10910	5674
<b>Versauerung [kg SO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	63,56	17,75	3,36	25,44	15,75	0,76	0,49
<b>Eutrophierung (EP) [kg Phosphate-Equiv.]</b>	78,64	14,89	4,60	21,57	35,53	0,64	1,41
<b>Treibhauseffekt [kg CO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	41032	1842	2341	23579	12214	704	352
<b>Ozonabbau [kg R11-Equiv.]</b>	4,49E-03	9,34E-05	2,44E-04	3,14E-03	9,09E-04	9,35E-05	1,50E-05
<b>Bodennahe Ozonbildung [kg Ethene-Equiv.]</b>	8,50	0,56	0,48	5,23	2,01	0,16	0,05

**Tabelle 2.6-4:** Prozentualer Beitrag der einzelnen Module zu den Umweltwirkungskategorien

	Gesamt	ZR	ZR-R	FM (TS 85 %)	Ferm-Auf	BM (TS 60 %)	AWB
<b>Fossiler Ressourcenverbrauch [MJ]</b>	100	1,56	6,14	58,55	31,09	1,75	0,91
<b>Versauerung [kg SO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	100	27,93	5,29	40,03	24,78	1,19	0,78
<b>Eutrophierung (EP) [kg Phosphate-Equiv.]</b>	100	18,94	5,85	27,43	45,18	0,82	1,79
<b>Treibhauseffekt [kg CO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	100	4,49	5,71	57,47	29,77	1,71	0,86
<b>Ozonabbau [kg R11-Equiv.]</b>	100	2,08	5,43	69,82	20,25	2,08	0,33
<b>Bodennahe Ozonbildung [kg Ethene-Equiv.]</b>	100	6,65	5,71	61,59	23,66	1,84	0,55

Die Hotspots sind die Trocknung des Futtermittels und die Fermentation und Abtrennung der Fermentationsprodukte aufgrund des hohen Energiebedarfs. So werden bei der Futtermitteltrocknung 2,6E5 MJ Wärme und 2,3E4 MJ Elektrizität und bei der Fermentation/Produkttrennung und Abwasserbehandlung 5,5E4 MJ Wärme und 5,2E4 MJ Elektrizität benötigt. Der Wassergehalt der Zuckerrübenschnitzel wird mit 96 % angegeben und die Ausbeute bei der Fermentation 20 g ABE/L Fermentationsbrühe, davon 12,7 g/L Butanol, 6,1 g/L Aceton und 1,3 g/L Ethanol bzw. im Verhältnis Butanol:Aceton:Ethanol von 10:4,8:1. Diese Werte werden durch andere Literaturstellen bestätigt. Die destillative Trennung der Fermentationsprodukte in obigem Modell hat einen Wärmebedarf von ca. 22 MJ/kg Butanol. Kraemer hat für die Destillation einen Energiebedarf von

20 MJ/kg Butanol für die Destillation errechnet, weist aber auch daraufhin, dass der Energiebedarf durch Einsatz von Mesitylen (1,3,5-Trimethylbenzol) als Extraktionsmittel um den Faktor 3 gesenkt werden könnte.

Um die Rohstoffherstellung und -aufbereitung von der Fermentation und weiteren Produktaufbereitung besser unterscheiden zu können, werden die Module weiter aggregiert. Damit wird auch ein virtueller Prozess simuliert, indem der Dicksaft bzw. eine äquivalente Substratmenge vorkettenfrei zur Verfügung gestellt wird. Dazu werden ZR-Anbau, ZR-Raffination und die Trocknung des Futtermittels als „Rohstoff zusammengefasst, ebenso die Fermentation und Produktaufbereitung sowie die Abwasserbehandlung und die Abtrennung und Trocknung der Biomasse aus der Fermentation als „Ferm-Auf“. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.6-5:** Umweltwirkungen der Rohstoffbereitstellung und des Herstellungsverfahrens

	Rohstoff	F/A*	Rohstoff	F/A
	Absolutwerte		Prozent	
<b>Fossiler Ressourcenverbrauch [MJ]</b>	413682	210723	66,25	33,75
<b>Versauerung [kg SO<sub>2</sub>-Äquiv.]</b>	46,56	17,00	73,25	26,75
<b>Eutrophierung (EP) [kg Phosphat-Äquiv.]</b>	41,06	37,58	52,22	47,78
<b>Treibhauseffekt) [kg CO<sub>2</sub>-Äquiv.]</b>	27762	13270	67,66	32,34
<b>Ozonabbau [kg R11-Äquiv.]</b>	3,47E-03	1,02E-03	77,33	22,67
<b>Bodennahe Ozonbildung [kg Ethen-Äquiv.]</b>	6,28	2,21	73,95	26,05

\*Fermentation und Aufarbeitung

Die Rohstoffbereitstellung trägt zum Großteil der Umweltauswirkungen bei, der Beitrag liegt zwischen 52 % zum Treibhauseffekt und 78 % beim Ozonabbau. Allerdings gilt dabei zu bedenken, dass bei Verwendung von „umweltfreundlicher Energie die Umweltwirkungen erheblich geringer liegen würden. Der hohe Energiebedarf ist für das beschriebene System notwendig aufgrund der stark verdünnten Fermentationslösung und des hohen Wassergehalts des Rückstandes bei der Zuckerraffination.

Mit Hilfe der ökonomischen Allokation können die Umweltbelastungen von Butanol von denen der anderen Produkte getrennt werden. Die ökonomische Allokation bietet sich in diesem Fall an, da sie die Antriebskraft für Unternehmen widerspiegelt und da mit Ausnahme der Biomasse aus der Fermentation Preise für die anderen Produkte vorliegen. Der Nachteil der ökonomischen Allokation ist jedoch, dass die Vergleichbarkeit aufgrund der Preisvolatilität nur bedingt gegeben ist. Außerdem liegt für die aus der Fermentation gewonnene Biomasse kein Preis vor.

Alternativ könnte auch eine Allokation auf Basis der Heizwerte durchgeführt werden, allerdings wäre der Heizwert für Dicksaft eine höchst spekulative Größe, da diesem zwar ein Heizwert zugeordnet werden könnte, der Dicksaft jedoch in der Realität nicht energetisch genutzt wird. Der Energiegehalt der getrockneten Biomasse aus der Fermentation ist höher als die für die Trocknung benötigte Energie, somit stünde diese Energie für die Produktabtrennung zur Verfügung, würde aber zusätzliche Investitionen für ein Biomassebeheizte Kraft-Wärme-Kopplungs-Anlage erfordern. Die theoretische Überschussenergie beträgt ca. 13 MJ/kg Butanol und könnte den Energiebedarf eines optimierten Abtrennungsprozesses vollständig decken.

Auch die Systemerweiterung könnte angewandt werden, hier ergibt sich ebenso wie bei der energetischen Allokation das Problem, dass die Wahl der Substitutionsprodukte für Futtermittel sowie der getrockneten Biomasse aus der Fermentation das Ergebnis erheblich beeinflussen würde.

Die Ergebnisse nach ökonomischer Allokation sind **Tabelle 2.6-6** dargestellt.

**Tabelle 2.6-6:** Umweltwirkungen der fermentativen Herstellung von 1 t Butanol aus Zuckerrüben nach ökonomischer Allokation

	Gesamt	Rohstoff	F/A*	Rohstoff	F/A*
	Absolutwerte			Prozent	
<b>Fossiler Ressourcenverbrauch [MJ]</b>	281156	160023	121133	56,92	43,08
<b>Versauerung [kg SO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	27,72	18,01	9,71	64,97	35,03
<b>Eutrophierung (EP) [kg Phosphate-Equiv.]</b>	36,80	15,88	20,91	43,16	56,84
<b>Treibhauseffekt [kg CO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	18376	10739	7637	58,44	41,56
<b>Ozonabbau [kg R11-Equiv.]</b>	1,95E-03	1,34E-03	6,07E-04	68,89	31,11
<b>Bodennahe Ozonbildung [kg Ethene-Equiv.]</b>	3,72	2,43	1,29	65,25	34,75

\*Fermentation und Aufarbeitung

Der Beitrag zu den Wirkungskategorien verschiebt sich nach Allokation erwartungsgemäß. So nimmt der Beitrag zur Wirkungskategorie Treibhauseffekt ab, da dieser zum erheblichen Teil aus der für die Trocknung des Futtermittels erforderlichen Wärme resultiert, während der Anteil zu den anderen Wirkungskategorien zunimmt, was auf die höhere Wertschöpfung von Butanol im Vergleich zu den anderen Produkten sowie dem hohen Strombedarf bei der Fermentation zurückzuführen ist.

## 2.6.2 Vergleichende Ökobilanzierung (AP 6.4)

**Vorbemerkung:** Die vorliegende Analyse beruht auf den Sachbilanzdaten des NNFCC-Berichts. Die dort getroffenen Annahmen sind als konservativ einzustufen. Mögliche Prozessoptimierung, z.B. durch die von Kraemer vorgeschlagene Hybrid-Extraktion mit Mesitylen, die den Energiebedarf bei der Produktaufbereitung um den Faktor 3 reduzieren könnte, sind dabei ebenso wenig berücksichtigt wie die energetische Nutzung der getrockneten Biomasse aus der Fermentation. Beide Faktoren würden die Ökobilanz von Butanol aus fermentativer Herstellung erheblich verbessern. Allerdings liegen zu diesen bisher noch nicht technisch umgesetzten Varianten keine monetären Daten vor. Um die Konsistenz der umweltrelevanten und der ökonomischen Daten zu gewährleisten, wurden die konservativen Daten aus dem NNFCC-Bericht für die Ökobilanz übernommen. Die hier vorgestellte Analyse stellt somit eine „Worst-case-Betrachtung dar. Szenario-Analysen könn-

ten helfen die Randbedingungen für die Prozessschritte im Sinne einer Gesamtsystemoptimierung zu definieren, dies ist jedoch im Rahmen des Projektes nicht vorgesehen

Für die vergleichende Ökobilanz wird die Herstellung von Butanol aus fossilen Ressourcen über die Route Hydroformylierung von Propylen verwendet. Die Hydroformylierung von Propylen ist die derzeit gängige Methode zur Herstellung von Butanol. Als Referenzdatensatz wird wie in der vorherigen Analyse die ECOINVENT-Datenbank V. 2.2 verwendet. Somit ist das methodische Vorgehen bei der Erstellung der Hintergrunddaten identisch und somit ist auch die maximale Vergleichbarkeit gewährleistet. Bei Verwendung anderer Datensätze müssten die methodischen Randbedingungen angepasst werden, dies ist im vorliegenden Fall nicht erforderlich.

Die konventionelle Herstellung von Butanol wird mit der fermentativen Butanol-Herstellung aus Zuckerrüben verglichen. Zusätzlich werden die Module Rohstoffbereitstellung sowie Fermentation inklusive Produktaufbereitung verglichen. Dieses Vorgehen ermöglicht es, die Rohstoffbereitstellung und die „eigentliche Butanol-Produktion getrennt zu betrachten. Außerdem wird das Verhältnis der Umweltwirkungen für das Gesamtsystem Butanol aus erneuerbaren Ressourcen und das Verhältnis aus Ferm-Auf zu Butanol aus fossilen Ressourcen gezeigt (**Tabelle 2.6-7**).

**Tabelle 2.6-7:** Umweltwirkungen von Butanol aus fossilen und erneuerbaren Ressourcen

	<b>Butanol (fossil)</b>	<b>Butanol aus ZR</b>	<b>Rohstoff</b>	<b>Ferm-Auf</b>	<b>Verhältnis Butanol zu ZR-fossil</b>	<b>Verhältnis F/A* zu Butanol-fossil</b>
<b>Fossiler Ressourcenverbrauch [MJ]</b>	74434	281156	160023	121133	3,78	1,63
<b>Versauerung [kg SO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	6,81	27,72	18,01	9,71	4,07	1,43
<b>Eutrophierung (EP) [kg Phosphate-Equiv.]</b>	3,87	36,80	15,88	20,91	9,50	5,40
<b>Treibhauseffekt) [kg CO<sub>2</sub>-Equiv.]</b>	2609	18376	10739	7637	7,04	2,93
<b>Ozonabbau [kg R11-Equiv.]</b>	2,45E-04	1,95E-03	1,34E-03	6,07E-04	7,96	2,48
<b>Bodennahe Ozonbildung [kg Ethene-Equiv.]</b>	2,69	3,72	2,43	1,29	1,38	0,48

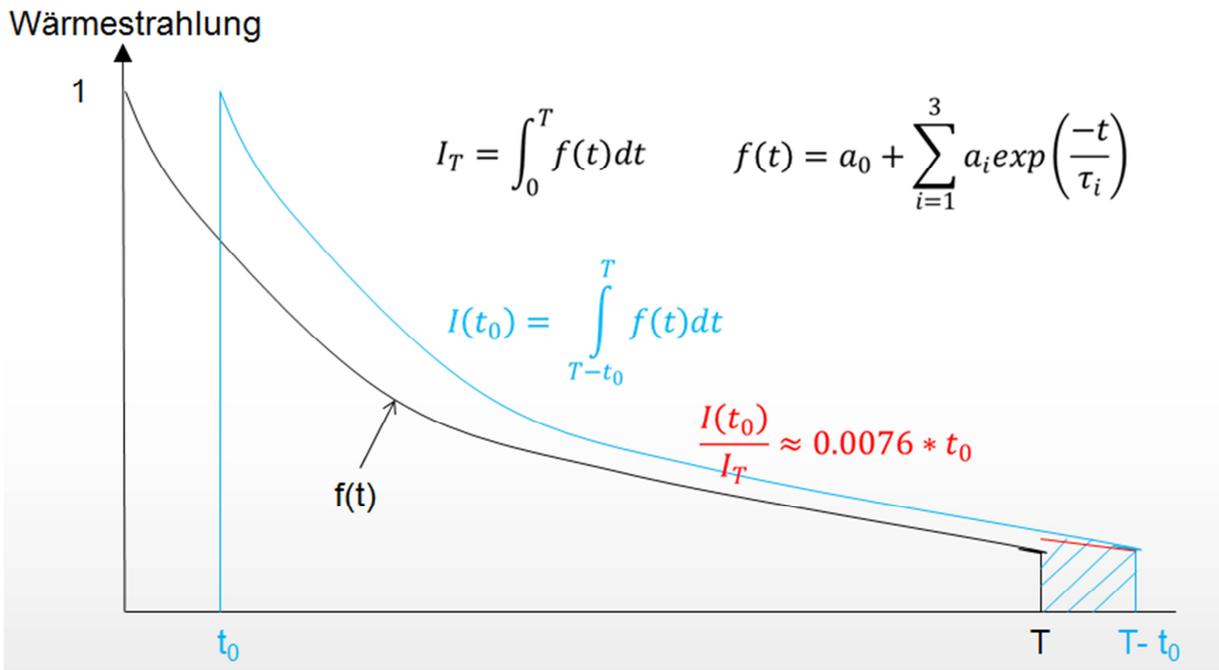
\*Fermentation und Aufarbeitung

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Herstellung von Butanol aus fossilen Ressourcen in den ausgewählten Umweltwirkungskategorien erheblich umweltfreundlicher ist als die fermentative Herstellung von Butanol aus erneuerbaren Rohstoffen, wenn die für diese Analyse angenommenen Prozessbedingungen nicht erheblich verbessert werden. Auch wenn nur die Fermentation und Produktaufbereitung betrachtet wird, also ohne Berücksichtigung der Vorkettenemission aus der Substratbereitstellung, ist das Butanol aus fossilen Ressourcen in den meisten Umweltwirkungskategorien besser. Eine Ausnahme ist die Umweltwirkungskategorie Bodennahe Ozonbildung, die

sich im Wesentlichen aus der Freisetzung von Kohlenwasserstoffen errechnet. Die Freisetzung von Kohlenwasserstoffen ist bei Verwendung von Erdöl als Ausgangsstoff in den überwiegenden Fällen höher als bei der Verwendung von erneuerbaren Rohstoffen. Die vorliegende Analyse schließt die Verwendung des Butanols jedoch nicht mit ein.

Unterschiede zwischen Butanol aus fossilen Ressourcen und solchem aus erneuerbaren Ressourcen ergeben sich zwar nicht in der Nutzungsphase, aber ggf. in der Entsorgungsphase. Nimmt man an, dass das Butanol zu 100 % zur Kunststoffherstellung verwendet wird und nach der Nutzungsphase verbrannt wird, würden die CO<sub>2</sub>-Emissionen aus dem aus erneuerbaren Rohstoffen hergestellten Butanol nicht mitgerechnet. Die betrifft jedoch nur die Wirkungskategorie Treibhauseffekt. Unter den beschriebene Annahmen werden bei der Verbrennung von 1 t Butanol 2375 kg CO<sub>2</sub> frei; doch selbst unter dieser sehr optimistischen Annahme, wäre Butanol aus fossilen Ressourcen immer noch klimafreundlicher als Butanol aus erneuerbaren Rohstoffen unter der Annahme, dass das Substrat vorkettenfrei angeliefert werden kann und die Butanol-Ausbeute bei der Fermentation bei ca. 13 g/L liegt. Derzeit werden in der Literatur Butanol-Konzentrationen von bis zu 20 g/L beschreiben; diese werden jedoch mit hochreinem Substrat (Zucker) erzielt. Stellt man die beiden getroffenen Annahmen vorkettenfreies Substrat und eine moderate Ausbeute von 13 g Butanol pro Liter Fermentationsbrühe gegenüber, wird deutlich, dass die vorgestellten Ergebnisse Praxisrelevanz haben. Es ist davon auszugehen, dass eine signifikante Erhöhung der Butanol-Ausbeute bei der Fermentation nur mit reinen Substraten zu erzielen ist und sich somit die Umweltwirkungen zumindest zum Teil kompensieren.

Eine zusätzliche Verminderung des Treibhauseffektes kann sich durch die temporäre Speicherung von Kohlenstoff in Butanol aus erneuerbaren Rohstoffen ergeben. Legt man den von der IPCC verwendeten Impulsansatz für das Treibhauspotential zugrunde ergibt sich das in **Abbildung 2.6-2** gezeigte Verhalten: Die schwarze Linie das Verhalten von Kohlendioxid über einen definierten Zeitraum T (üblicherweise 100 Jahre). Die blaue Linie zeigt das Potential, wenn die Freisetzung um  $t_0$  - Jahre verzögert wird. Die blau-straffierten Fläche unter der Kurve entspricht der Einsparung von CO<sub>2</sub> bei einer Nutzungsdauer von  $t_0$ -Jahren. Für Nutzungsphasen unter 25 Jahren kann auch die mit der roten Linie gekennzeichnete lineare Beziehung angesetzt werden. Dann ergeben sich allerdings leichte Unterbefunde (Differenz: blaue/rote Line).



**Abbildung 2.6-2:** Verminderung des Treibhauseffektes aufgrund temporärer Kohlenstoffspeicherung in langlebigen Produkten.

Bei einer Nutzungsphase von 10 Jahren ergibt sich für Produkte die 1 t Butanol enthalten somit eine zusätzlich Verminderung des Treibhauseffektes von 180 kg CO<sub>2</sub> und kann somit den höheren Treibhauseffekt bei der fermentativen Herstellung von Butanol aus erneuerbaren Rohstoffen im Vergleich zu Butanol auf Erdölbasis nicht kompensieren. **Abbildung 2.6-2** zeigt deutlich, dass nur Butanol-Produkte mit einer Nutzungsdauer von mehreren Jahrzehnten zu einer Verminderung des Treibhauseffektes beitragen können.

## 2.7 Ökonomische Bewertung (AP 7)

### 2.7.1 Kaffbergung (zu AP 7.3)

Ein möglicher Rohstoff für eine Butanolanlage könnte Weizenkaff sein. Im Folgenden soll abgeschätzt werden, wie viel die Bereitstellung des Weizenkaffs kosten könnte:

Es lassen sich Verfahren unterscheiden, bei denen die Aufbereitungstechnik getrennt von der Erntemaschine steht und entsprechend zusätzliches Bedienpersonal erfordert und solcher Technik, die mit der Erntemaschine verbunden werden kann. Die verschiedenen Ansätze, das Kaff zu bergen sind im einzelnen:

- Die Bergung des Kaffs erfolgt in einem An- oder aufgebauten Sammelbehälter am Drescher, der Transport in diesen Behälter erfolgt über Schnecken oder Gebläse. Dieses Verfahren lässt sich an marktgängigen Mähdreschern nachrüsten.
- Kaff und Körner werden gemeinsam aufgefangen, die Trennung erfolgt nicht im Mähdrescher wie derzeit üblich. Stattdessen findet diese am Feldrand oder in einer Annahmestelle statt. Dieses Verfahren wäre vermutlich ohne große Umbauten am Mähdrescher zu realisieren.
- Kaff, Stroh und Körnern werden gemeinsam gesammelt. Dieses Verfahren ist mit der derzeitigen Dreschertechnik nicht zu machen und erfordert andere Technik. Hierzu müsste der Mähdrescher praktisch entkernt werden, die Trennung in die Bestandteile müsste abgesetzt erfolgen.
- Gemeinsames Auffangen von Stroh und Kaff. Dies ist mit kleinen Veränderungen möglich, hier würde das Kaff auf dem Strohschwad abgelegt und zusammen mit dem Stroh in einer Presse aufgesammelt. Allerdings wären Stroh und Kaff dann vermengt und könnten nur nach Auflösen der Ballen wieder getrennt werden.

Loses Kaff weist eine Dichte von ca. 25-50 kg/m<sup>3</sup> auf. Bei einer angenommenen Dichte von 30 kg/m<sup>3</sup> und einem Transportvolumen von maximal 90 m<sup>3</sup> kann ein LKW ca. 2,7 t Kaff transportieren. Dies führt zu unverhältnismäßig hohen Transportkosten, so dass eine vorbereitende Behandlung des Materials notwendig ist.

Mögliche Ansätze zur Erhöhung des Raumgewichts sind das Pressen des Kaffs, das Mahlen oder das Pelletieren. (siehe **Tabelle 2.7-1**).

**Tabelle 2.7-1:** Raumgewicht von Kaff nach Art der Vorbehandlung

Transportart	Raumgewicht
lose	30-50 kg/m <sup>3</sup>
in Quaderballen gepresst	150 kg/m <sup>3</sup>
Mehl, abgeleitet aus Getreidemehl	400 kg/m <sup>3</sup>
Pellets	550 kg/m <sup>3</sup>

Quelle: KTBL 2009, NRG-consultants 2013

Führt man die Möglichkeiten zur Kaffbergung am Mähdrescher mit dem Ziel einer Reduzierung der Transportkosten zusammen, so erscheinen die folgenden Maschinenlösungen zielführend:

- Vorhandene Drescher bergen das Kaff zusammen mit dem Getreide. Die Reinigung erfolgt am Feldrand, dort wird das Kaff im Anschluss daran aufbereitet, das heißt gemahlen, gepresst oder pelletiert. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass neben der zusätzlichen Technik eine weitere Arbeitskraft am Feldrand steht, die diese Maschine bedient und überwacht. Diese zusätzliche Arbeitskraft ist verursachungsgemäß vollständig der Kaffbergung zuzuordnen.
- Der Mähdrescher wird mit einer Mahleinrichtung ausgerüstet. Das Kaffmehl wird in Bigbags geborgen und dann abgesetzt oder bei Bedarf umgeladen. Nachteil dieser Technik ist, dass sie nicht ohne weiteres an bestehenden Mähdreschern ergänzt werden kann, sondern entsprechend ab Werk ausgerüstete Maschinen erfordert.

Um für die ökonomische Bewertung die notwendige Transportentfernung abschätzen zu können, wird zunächst von einer Anlage mit einem Substratbedarf von 250.000 t p.a. ausgegangen. Bei einem angenommenen Anteil der Ackerfläche an der Gesamtfläche von 1/3 und einem Getreideanteil von 50 % an der Ackerfläche ergibt sich damit unter Berücksichtigung von Zu- und Abschlägen für den Straßenverlauf (siehe AP 7.4) eine durchschnittliche Transportentfernung von ungefähr 50 km.

Für den Transport werden 40 t-Sattelzüge mit einer maximalen Zuladung von 25 t bzw. 90 m<sup>3</sup> angenommen. Die Frachtraten für die betrachtete Entfernung sind mit ca. 225 €/LKW angesetzt.

Die abgeführten Nährstoffe werden dem Kaff zugerechnet, eine Rückführung ist nicht berücksichtigt. Sollte diese erfolgen, können die Bereitstellungskosten entsprechend angepasst werden. Hierbei sind ausgehend von KTBL-Daten folgende Entzüge angenommen:

**Tabelle 2.7-2:** Annahmen zu Nährstoffentzügen

Nährstoffentzug	0,5 kg N/dt OS	0,13 kg P/dt OS	1,16 kg K/dt OS	0,36 kg Ca/dt OS
Preis	0,67 €/kg N	1,10 €/kg P	0,6 €/kg K	0,10 €/kg Ca

Quelle: KTBL 2009, eigene Annahmen

Für die technische Anpassung wurden Maschinendaten von KTBL übernommen, diese wurden mit zusätzliche Bauteile modifiziert. Betrachtet wurden die Varianten eines losen Transportes des Kaff, einer Vermahlung am Feldrand, einer Ballenpresse am Feldrand sowie eines umgerüsteten Mähdreschers. Die Variante der Pelletierung konnte nicht betrachtet werden, weil hierzu keine gesicherten Daten verfügbar waren. Im Einzelnen sind folgende zusätzlichen Anpassungen zu konventioneller Technik in die Berechnung eingeflossen:

**Tabelle 2.7-3:** Annahmen zu zusätzlichen Anforderungen der geänderten Mechanisierung

	<b>Lose Bergung</b>	<b>Ballenpresse Feldrand</b>	<b>Vermahlung Feldrand</b>	<b>Vermahlung Drescher</b>
<b>Zusätzliche Maschinen-ausstattung</b>	Reinigung, Überladewagen	Reinigung, angepasste Ballenpresse, Überladewagen, Frontladerschlepper	Reinigung, Mühle, Überladewagen	Drescheranpassung, Frontladerschlepper
<b>Investitionssumme</b>	35.500 €	210.000 €	41.200 €	25.000 €
	Reinigung, Überladewagen durch Lohnunternehmer	Überladewagen und Frontladerschlepper durch Lohnunternehmer	Überladewagen durch Lohnunternehmer	Frontladerschlepper durch Lohnunternehmer
<b>Nutzungsdauer</b>	27.000 t	75.000 Ballen	27.000 t	5 Jahre
<b>Bedienpersonal</b>	1	1	1	0

Quelle: eigene Berechnungen nach KTBL 2009

Es wurde ein Dieselpreis von 1,20 €/L zu Grunde gelegt, für das Bedienpersonal wurden 25 €/h Arbeitgeberbrutto veranschlagt. Mit den getroffenen Annahmen ergeben sich folgende Bereitstellungskosten für das Kaff frei Fabrikator, ohne Lagerung:

**Tabelle 2.7-4:** Bereitstellungskosten für Kaff

<b>€/t</b>	<b>Lose Bergung€</b>	<b>Ballenpresse Feldrand</b>	<b>Vermahlung Feldrand</b>	<b>Vermahlung Drescher</b>
<b>Düngewert</b>	13	13	13	13
<b>Bergungskosten</b>	57	99	67	28
<b>Transportkosten</b>	83	10	9	9
<b>Summe</b>	<b>153</b>	<b>122</b>	<b>89</b>	<b>50</b>

Quelle: eigene Berechnungen

Aufgrund des niedrigen Raumgewichtes verursacht der lose Transport des Kaffs hohe Kosten, weshalb diese Variante unwirtschaftlich ist. Weiterhin zeigt sich, dass eine Vermahlung des Kaffs auf dem Drescher bei entsprechend angepasster Technik am günstigsten erscheint. Problematisch hierbei ist jedoch, dass die benötigte Anzahl an Maschinen in bei einem Anlagenneubau nicht zur Verfügung steht. Um die kalkulierten 250.000 t Kaff zu bergen wäre es notwendig, etwa 240 Mähdrescher mit 700 ha Jahresleistung und entsprechender Ausrüstung im Einsatz zu haben. Deshalb ist zumindest für die Anfangszeit einer neuen Anlage anzunehmen, dass zunächst mit den höheren Kosten einer Vermahlung am Feldrand zu kalkulieren ist und die niedrigeren Bereitstellungskosten sich im Laufe der Zeit einstellen können, wenn die Bereitstellung des Kaffs aus Sicht der einzelnen Landwirte interessant erscheint.

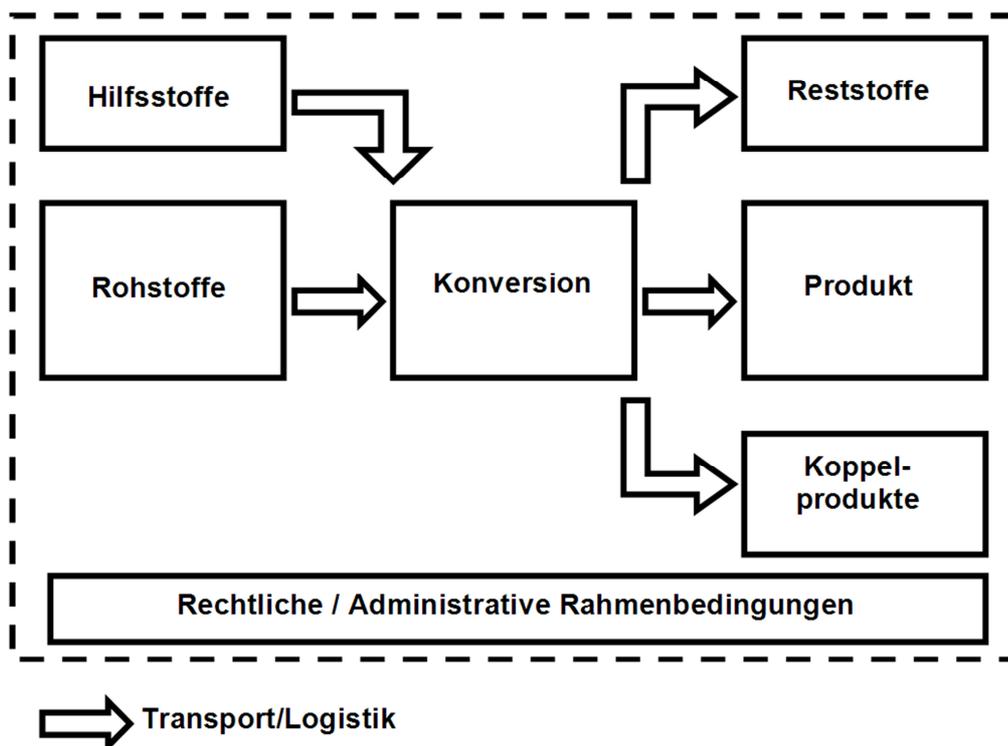
Bei der regionalen Verfügbarkeit des Kaffs ist zu bedenken, dass für einen nachhaltigen Ackerbau eine ausgeglichene Humusbilanz notwendig ist. Das heißt, es darf nur so viel organische Substanz entnommen werden, wie zu einem Erhalt des Bodenumus möglich ist. Wird also derzeit auf

Flächen schon Stroh bis an die ackerbaulich vertretbare Grenze abgefahren, so muss bei einer Nutzung des Kaffs eine entsprechende Menge Stroh auf dem Feld verbleiben. In Regionen, in denen das Stroh bereits intensiv genutzt wird kann dies zu Auswirkungen auf den Strohmarkt führen. Somit kann es durch die Nutzung des Kaffs unter Umständen auch zu indirekten Auswirkungen auf die tierische Erzeugung kommen.

Ein positiver Effekt der Kaffnutzung kann durch eine Verringerung des Unkrautdrucks aufgrund der Abfuhr von Unkrautsamen entstehen. Ebenso kann eine Verringerung des Infektionsdrucks durch eine Abfuhr von Pilzsporen eintreten. Diese Punkte können Einfluss auf den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln haben.

### 2.7.2 Ökonomie der Konversionsanlagen (AP7.1)

Für die Analyse von Konversionslinien zur stofflichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe erscheint es sinnvoll, den Filière-Ansatz zu verwenden. Hierbei werden einzelne Module zur Analyse innerhalb der Konversionslinie identifiziert, die jeweils an einer marktgängigen Schnittstelle getrennt sind. Diese verschiedenen Stufen der Wertschöpfung können dann getrennt analysiert und später für eine Bewertung der gesamten Wertschöpfungskette zusammengefügt werden (SCHAMP, 2000, S. 29ff; LENZ, 1997, S. 20ff).



**Abbildung 2.7-1:** Module für die Analyse von Konversionslinien (eigene Darstellung)

Eine Konversionsanlage soll im Folgenden dadurch gekennzeichnet sein, dass diese bestimmte Ausgangsstoffe unter Zuhilfenahme von Energie, Arbeit und Hilfsstoffen in bestimmte Produkte

umwandelt (Konversion). Hierbei sind bestimmte Austauschverhältnisse und Stoffströme für bestimmte Rohstoff- und Produktkombinationen als feststehend angenommen.

Ausgehend von einem gewünschten Endprodukt sind zunächst die verschiedenen möglichen Wege – Konversionslinien – zu identifizieren, mit Hilfe derer dieses hergestellt werden kann. Die betrachteten Anlagen sollen dabei dem neuesten Stand der Technik entsprechen. Um später eine ökonomische Analyse zu ermöglichen, sind zunächst die verschiedenen Produktionsfaktoren als Stoffströme zu erfassen. Hierbei ist es nicht ausreichend, die primären Rohstoffe zu erfassen. Ebenso sind notwendige Hilfsstoffe zu erfassen. Hierzu gehören auch Energie- und Wasserbedarf. Dabei sind neben den ein- auch die ausgehenden Ströme zu berücksichtigen und zu quantifizieren. Hierbei ist es nicht ausreichend nur das Produkt zu berücksichtigen, sondern auch eventuell anfallende Nebenprodukte oder Rest- und Abfallstoffe.

Im nächsten Schritt sind die möglichen Rohstoffe für die Anlagen zu ermitteln. Hierbei sind zunächst alle denkbaren Alternativen in Betracht zu ziehen. Dies schließt nicht nur in Deutschland hergestellte Rohstoffe, sondern auch solche von internationaler Verfügbarkeit ein. Eine Festlegung auf wenige Alternativen bereits an dieser Stelle birgt die Gefahr, dass wichtige Alternativen übersehen werden und dadurch im weiteren Verlauf eine Fehleinschätzung zur Wirtschaftlichkeit und Wettbewerbsfähigkeit erfolgt.

Die für die erforderlichen Inhaltsstoffe geeigneten Rohstoffe sind nach landwirtschaftlicher Urproduktion und Koppelprodukten anderer Prozesse getrennt zu ermitteln, weil dies bei der späteren Abschätzung der Verfügbarkeit eine unterschiedliche Betrachtung erfordert.

Nach einer Analyse der Rohstoffe und Produkte sind die denkbaren Anlagenkonstellationen auszuwählen. Für diese sind die bisher betrachteten Mengenströme nun mit Preisen zu hinterlegen. Hierbei erfolgt nun auch eine Festlegung auf Anlagengrößen. Dabei können größere Anlagen positive Skaleneffekte bedeuten, jedoch können diese auch zu einer aufwändigeren Ver- und Entsorgung der Anlage führen. Somit kann es sinnvoll sein, verschiedene Anlagengrößen zu betrachten.

Eine Aufteilung der Kosten nach DABBERT / BRAUN (2006) hat sich hier bewährt. Für die Abschätzung der Wirtschaftlichkeit scheint eine statische Betrachtung einer durchschnittlichen Periode ausreichend. Zwar ermöglicht eine dynamische Betrachtung durch die Berücksichtigung von Zinseszinsen, Inflation und jährlicher Zahlungsströme in der Theorie genauere Aussagen zur Wirtschaftlichkeit. Damit mit einer dynamischen Betrachtung auch tatsächlich eine genauere Aussage als mit der statischen Betrachtung gemacht werden kann, müssen die Zahlungsströme aber genau vorhergesagt werden können (KUHLMANN, 2003, S. 519). Dies ist ebenso wie eine Prognose von zukünftigen Preisen jedoch meist nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich, deshalb würde eine dynamische Betrachtung hier nicht zwangsläufig einen Mehrwert an Information bringen. Vielmehr wird eine Genauigkeit vorgetäuscht, die durch die vorhandenen Daten nicht gegeben ist. Somit ist es für eine solche Untersuchung ausreichend, die statische Betrachtung zu wählen.

Bei Verzinsung und Nutzungsdauer der Anlage ist zu berücksichtigen, für welche Perioden und zu welchem Zinssatz das für eine Investition notwendige Kapital verfügbar ist. So kann eine Anlage

zum Beispiel eine technisch mögliche Laufzeit von 20 Jahren haben, tatsächlich sind aber nur Investoren verfügbar die ihr Geld für maximal 10 Jahre anlegen möchten. In so einem Fall ist zu prüfen, ob es sinnvoll ist die Anlage für die Kalkulation auf 20 Jahre abzuschreiben oder ob eine Abschreibung für 10 Jahre gerechnet werden sollte, weil nicht sichergestellt werden kann ob danach noch das notwendige Kapital zu Verfügung steht.

Für die verschiedenen ausgewählten Standorte ist zunächst die Wirtschaftlichkeit zu ermitteln. Sollten bestimmte ausgewählte Standorte oder Rohstoffe nicht zu einer wirtschaftlichen Anlage führen, so ist ausgehend von der Fragestellung zu beurteilen, ob diese durch politische Eingriffe nicht wirtschaftlich betrieben werden können und diese Hemmnisse auf absehbare Zeit wegfallen. Auf der anderen Seite wäre es möglich zu überprüfen, in wie fern eine Anschubförderung die Wirtschaftlichkeit einer Anlage ermöglichen kann, sofern diese politisch gewollt ist.

Für diese wirtschaftlichen Anlagenstandorte und –auslegungen sollte im Weiteren überprüft werden, ob diese Wettbewerbsfähig gegenüber alternativen Produzenten für die Produkte sind. Eine reine Wirtschaftlichkeit der Anlagen reicht nicht aus, wenn es Möglichkeiten gibt diese Produkte günstiger zu erzeugen.

Sollte die Wettbewerbsfähigkeit durch eine Förderung erreicht werden, so ist zu überprüfen ob hier eine kurzfristige Förderung ausreichend ist oder ob zu erwarten ist, dass dauerhafte Maßnahmen für den Bestand der Anlagen notwendig sind.

Die Auswirkungen der getroffenen Annahmen sowie mögliche ökonomische Folgen einer Fehleinschätzung lassen sich am besten mit Sensitivitätsanalysen überprüfen. Es lassen sich auch kritische Rohstoffpreise bestimmen. Damit kann ausgesagt werden, was der höchste Preis ist der für die Rohstoffe gezahlt werden kann ohne das die Anlage unwirtschaftlich wird. Ebenso kann der kritische Absatzpreis für die Produkte bestimmt werden.

### **2.7.3 Preise und Substitutionsbeziehungen auf der Produktseite (AP 7.2)**

Auf der Produktseite sind die Mengen zu ermitteln, die erzeugt werden. Zum einen stellt sich die Frage, in welchem Umfang das Hauptprodukt derzeit nachgefragt wird und ob es einen möglichen Nachfrageanstieg gibt. Zum anderen ist den Koppelprodukten besonderes Augenmerk zu widmen: Sind diese nicht marktgängig und können keiner weiteren Verwendung zugeführt werden, so sind diese als Reststoffe zu betrachten. Für Reststoffe fallen entsprechende Entsorgungskosten an. Hier sind die für die Entsorgung anfallenden Kosten abzuschätzen.

Sind diese aber marktgängige Güter, so ist die Marktsituation zu beurteilen: Welche Mengen der Koppelprodukte sind derzeit auf dem Markt vertreten und wie ist die zukünftige Nachfrage einzuschätzen? Wie groß ist der Anteil der in einer Konversionsanlage anfallenden Nebenprodukte am derzeitigen Gesamtmarkt? Die folgenden Überlegungen gelten nur für den Fall eines konstanten Marktangebotes, also *ceteris paribus*.

Falls die Mengen in einer Größenordnung anfallen, dass sie den Markt nachhaltig beeinflussen können und sinkende Preise zu erwarten sind, so ist dies bei der Berücksichtigung der Nebenerlöse

zu berücksichtigen. Insbesondere auf Märkten mit wenigen Nachfragern und wenigen Verwendungsmöglichkeiten für das Koppelprodukt ist von einer sehr inelastischen Nachfrage auszugehen. Somit kann eine geringe zusätzliche Produktion zu deutlich sinkenden Preisen führen. Hier sollten die Absatzpreise für die Nebenprodukte vorsichtig erfolgen und je nach Marktverhältnissen mit entsprechenden Abschlägen versehen werden. Handelt sich hingegen um einen wachsenden Absatzmarkt mit vielen Nachfragern und verschiedenen Verwertungsmöglichkeiten, so werden geringe Produktionszuwächse den Marktpreis wahrscheinlich nicht nachhaltig beeinflussen. In so einem Fall können historische Preise gute Anhaltspunkte für die Abschätzung der Marktpreise liefern.

Ist jedoch mit einer steigenden Nachfrage zu rechnen, so sind steigende Marktpreise zu erwarten. Um das Potential nicht zu überschätzen sollten jedoch nur historische Preise angesetzt werden.

#### **2.7.4 Preise und Substitutionsbeziehungen auf der Rohstoffseite (AP 7.3)**

Auf der Rohstoffseite sind mehrere Varianten der Rohstoffgewinnung zu betrachten:

- Der Rohstoff ist ein Koppelprodukt aus einer anderen Konversion
- Der Rohstoff ist ein Agrarprodukt, das bereits angebaut wird
- Der Rohstoff muss für diese Konversion neu angebaut werden

Handelt es sich um ein Koppelprodukt aus einer anderen Produktion, so ist die Frage zu klären, ob dieses derzeit entsorgt wird oder bereits einer anderweitigen Wertschöpfung zugeführt wird. Ein Produkt, das derzeit entsorgt wird ist für die Transportkosten zu bekommen. Entwickelt sich jedoch aufgrund einer neuen Technologie ein entsprechender Markt für dieses Koppelprodukt, so ist mittelfristig mit steigenden Preisen zu rechnen. Um eine solche mögliche Entwicklung abschätzen zu können ist es erforderlich, die erwartete Rohstoffnachfrage in Abhängigkeit vom Absatzpotential des Konversionsproduktes abzuschätzen. Ist die erwartete Rohstoffnachfrage unter dem Angebot in wirtschaftlicher Transportentfernung, so sind keine Preissteigerungen zu erwarten. Liegt diese jedoch in ähnlicher Höhe vor oder ist diese größer, so ist von steigenden Preisen auszugehen.

Fällt der Rohstoff aufgrund von Förderungen eines anderen Produktes an, so ist zu prüfen ob und wie lange diese Förderung weiter besteht. Fällt die Förderung weg, so ist mit einem Wegfall des Koppelproduktes als Rohstoff zu rechnen.

Handelt es sich bei dem Rohstoff um ein Agrarprodukt, das derzeit bereits gehandelt wird, so kann dieser zugekauft werden. Steigt die nachgefragte Menge jedoch deutlich an, so ist zunächst mit steigenden Preisen zu rechnen. Steigende Preise können aber zu einer Angebotsausdehnung führen, jedoch kann es zu einem insgesamt höheren Agrarpreisniveau führen.

Wird der Rohstoff – zum Beispiel aufgrund einer geringen Transportwürdigkeit – regional bezogen, so liegt unter Umständen kein regionaler Markt vor. Hier sind als Preise die Vollkosten für die Produktion zuzüglich Transport und Lagerung ein guter Ansatzpunkt für die Rohstoffkosten. Bei den Vollkosten sind bereits alle eingesetzten Produktionsfaktoren entlohnt, so dass die Produktion

für den Landwirt wirtschaftlich ist. Kommt es zu einer Ausdehnung der Produktion aufgrund einer zusätzlichen Nachfrage, so kann dies zu steigenden Grenzkosten führen, da schwieriger zu bewirtschaftende Flächen oder zu erschließende Vorkommen einbezogen werden. In diesem Fall kann eine verteuerte Produktion auch zu steigenden Preisen oder Bereitstellungskosten führen.

Wird ein Rohstoff angebaut, der bisher überhaupt nicht produziert wurde, so muss der Landwirt mit diesem eine höhere Grundrente erwirtschaften, als es mit Alternativkulturen der Fall wäre. Um dies beurteilen zu können, müssen die mit den gängigen Alternativkulturen zu erwirtschaftenden Deckungsbeiträge betrachtet werden. Hierzu sind diese ebenfalls zu erheben, sofern keine gesicherten Daten zu diesen vorliegen. Als Entlohnung des Bodens ist dann diese Grundrente der Alternativkultur anzusetzen.

### **2.7.5 Interregionale und internationale Wettbewerbssituation (AP 7.4)**

Für die Frage, ob sich eine neue oder weiterentwickelte Technologie durchsetzt muss untersucht werden, ob die Anlagen als solche überhaupt wettbewerbsfähig sind. Insbesondere für Überlegungen hinsichtlich einer Förderung darf nicht nur ein Standort betrachtet werden, sondern es müssen verschiedene, zu erwartende Standorte untersucht werden. Sofern bei der Standortwahl keine ausreichenden Informationen für eine kontinuierliche Betrachtung vorliegen oder nicht mit vertretbarem Aufwand zu beschaffen sind, ist eine diskrete Betrachtung durchzuführen.

Für eine solche diskrete Betrachtung müssen zunächst einige Standorte ausgewählt werden, an denen die Ansiedlung einer solchen Anlage wahrscheinlich erscheint. Für diese Standorte können dann Wirtschaftlichkeit und Wettbewerbsfähigkeit ermittelt werden. Um diese Standorte auszuwählen, sind einige ökonomische Überlegungen anzustellen:

Zunächst ist zu entscheiden, ob eine auf ein Land beschränkte Betrachtung ausreichend ist. Hierbei ist von Bedeutung, um welche Rohstoffe und Endprodukte es sich handelt. Wenn diese international gehandelt werden und die Länder über die Märkte miteinander vernetzt sind reicht eine nationale Betrachtung nicht aus. Wie bereits RICARDO festgestellt hat, führen die komparativen Vorteile verschiedener Länder dazu, dass sich diese in einem freien Wettbewerb auf bestimmte Produkte fokussieren und andere ohne entsprechende Förderung nur in kleineren Mengen oder gar nicht herstellen werden. Somit kann es sein, dass eine nationale Förderung für bestimmte Linien die unvorteilhaften Produktlinien fördert, obwohl diese ohne entsprechende Subventionen niemals wirtschaftlich sind. Zum anderen können dadurch bei gleicher Rohstoffbasis die vorteilhaften Produktionslinien auf unvorteilhafte Standorte verdrängt werden.

Deshalb ist es in der Regel notwendig, mehrere in Frage kommende Länder nebeneinander zu betrachten. Als nächstes stellt sich die Frage, wo die zu betrachtenden Standorte in den verschiedenen Ländern liegen sollen. Um diese Standorte einzugrenzen erscheint ein Blick in die Standorttheorie hilfreich: ALFRED WEBER stellte in seiner Theorie zur Standortwahl von Industrieunternehmen die Transportkosten in den Mittelpunkt. Seine Betrachtung erweiterte er um Lohnkosten und Agglomerationsvorteile. Ausgehend von dieser Einteilung leitet Weber zu erwartende Standorte ab, die von den jeweiligen Rohstoffen abhängen (BATHELT, GLÜCKLER, 2003):

- Die Konversion ist am Rohstoffort zu erwarten, wenn bei der Konversion ein erheblicher Gewichtsverlust eintritt
- Die Konversion ist an einem Ort zu erwarten, wenn mehrere Rohstoffe von verschiedenen Lagerstätten eingesetzt werden müssen
- Die Konversion ist am Konsumort zu erwarten, wenn eine Gewichtszunahme eintritt oder verschiedene Rohstoffherkünfte zu erwarten sind
- Die Konversion findet an Orten statt, an denen Agglomerationsvorteile entstehen, zum Beispiel durch ähnliche Unternehmen, Abnehmer von Nebenprodukten oder durch die Nähe zu Verkehrsknotenpunkten

Moderne Industrien sind nicht in dem Maße von großen Mengen geringwertiger Rohstoffe abhängig, wie es zu Zeiten Webers zu Beginn des 20. Jahrhunderts der Fall war. Deshalb wird Webers Theorie immer wieder angegriffen. Das mag für viele moderne Industrieunternehmen auch zutreffend sein, jedoch ist gerade bei der stofflichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe der Verbrauch großer Mengen geringwertiger Rohstoffe ein wesentliches Merkmal, so dass dies eher die Bedeutung von Webers Betrachtung unterstützt.

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass Weber in seiner weiteren Analyse davon ausgeht, dass die Verfügbarkeit von Arbeitskräften überall gegeben ist. Dies mag bei arbeitsintensiven Industrieanlagen ein wesentlicher Punkt sein. Bei Konversionsanlagen in denen verhältnismäßig wenige Arbeitskräfte sind dürfte dies jedoch nicht das ausschlaggebende Argument sein. Unter Umständen wäre es aber möglich, dass höhere Gehälter notwendig sind, damit die notwendigen Arbeitskräfte zum Unternehmensstandort ziehen.

Somit lassen sich aus Webers Theorie der Optimalen Standorte die notwendigen Erkenntnisse ableiten, die eine Einschränkung der zu betrachtenden Standorte ermöglichen. Die für eine diskrete Betrachtung sinnvoller Weise einzubeziehenden Standorte sind:

- Die Region, in der die Rohstoffe erzeugt werden
- Die Region, in der das Endprodukt nachgefragt wird
- Standorte der Produktion von Hilfsstoffen oder Nachfrage nach Nebenprodukten
- Verkehrsknotenpunkte

Um geeignete Verkehrsknotenpunkte auswählen zu können, sind zunächst die zur Verfügung stehenden Transportmittel und ihre Bedeutung näher zu betrachten. Grundsätzlich können Transporte auf der Straße, der Schiene, dem Wasser, durch die Luft sowie mit stationären Transportmitteln (zum Beispiel Förderbänder) erfolgen. Da stationäre Transportmittel nur für kurze Transporte in einem sehr begrenzten Umfeld geeignet sind, können diese für die Standortwahl von Unternehmen nicht berücksichtigt werden. Ebenso scheidet der Lufttransport für Konversionsanlagen in der Regel aus, weil es sich hierbei um ein besonders teures Transportmittel handelt, die Rohstoffe und Endprodukte jedoch geringwertige Massenwaren sind.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die möglichen Transportmittel und ihre Vor- und Nachteile:

**Tabelle 2.7-5:** Verschiedene Verkehrsmittel für den Binnentransport im Vergleich

Schienerverkehr	Kraftfahrzeuge	Binnenschiff	Luftverkehr
Vorteile:	Vorteile:	Vorteile:	Vorteile:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Besondere Eignung für Massen- und Schwertransporte über größere Distanzen</li> <li>• Möglichkeit der schnellen Punkt-zu-Punkt-Verbindung wegen eigener Infrastruktur</li> <li>• Gut kalkulierbare Transportzeiten wegen geringer Witterungsabhängigkeit</li> <li>• Hohe Sicherheit wegen vergleichsweise geringer Unfallhäufigkeit</li> <li>• Geringer Energieverbrauch wegen der Vorteile des Rad-Schiene-Systems</li> <li>• Günstige Transportkosten pro Einheit im Fernverkehr</li> <li>• Vergleichsweise umweltfreundlich im Hinblick auf Flächenverbrauch und Emissionen</li> <li>• Eignung für den kombinierten Güterverkehr wegen rascher Umsetzung der Ladung</li> <li>• Gute Möglichkeiten zur Automatisierung wegen der Schienenführung des Fahrzeuges und des Betriebssystems</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flexibel einsetzbares Transportgerät unterschiedlicher Spezialisierung und Größe</li> <li>• Gute Eignung für Personen- und / oder Güterbeförderung</li> <li>• Hohe Reisegeschwindigkeit und angemessener Komfort</li> <li>• Flächendeckende Vernetzung und Raumerschließung</li> <li>• Haus-zu-Haus-Transporte ohne Umsteigen / Umladen</li> <li>• Kurzer Zeitaufwand bei beruflichen und privaten Reisen</li> <li>• Hohe individuelle Freiheit und Mobilität</li> <li>• Keine Bindung an starre Transportlinien und Fahrpläne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• großes Transportvolumen für Massengut und sperriges Schwergut</li> <li>• geringer Energieverbrauch bei niedriger Reibung des schwimmenden Behälters</li> <li>• wenig Emissionen mit vergleichsweise geringer Belastung von Luft, Wasser, Boden und niedriger Lärmpegel</li> <li>• günstige Transportkosten pro Tonne Fracht wegen geringem Personaleinsatz und Treibstoffbedarf</li> <li>• sicheres Transportmittel wegen seltener Schiffsunfälle mit besonderer Eignung für Beförderung von Gefahrgut</li> <li>• gut kalkulierbare Transportzeiten nach Einführung der Radar- und Funknavigation bei fehlendem Status und Fahrverboten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schneller Transport von Personen und hochwertigen Gütern über längere Distanzen</li> <li>• Flexibler Einsatz des Transportgeräts unterschiedlicher Größe und Reichweite</li> <li>• Gute Vernetzung mit raschen Umschlagszeiten</li> <li>• Rasche integrierte Transportabwicklung kleinerer Sendungen von Haus zu Haus (Integrator)</li> <li>• Gut kalkulierbare Transportzeiten mit angemessener Fahrplanreue</li> </ul>

Schienenverkehr	Kraftfahrzeuge	Binnenschiff	Luftverkehr
Nachteile:	Nachteile:	Nachteile:	Nachteile:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapitalintensive Einrichtungs-, Betriebs- und Erhaltungsaufwendungen</li> <li>• Geringe Flexibilität wegen des hohen Zeit- und Kostenaufwandes zur Vorbereitung und Durchführung des Transports</li> <li>• Keine flächenhafte Erschließung wegen der zumeist geringen Netzdichte</li> <li>• Lange Vorlaufzeiten für Planung und Bau von Anlagen</li> <li>• Geringe Kompatibilität beim Grenzübergang wegen unterschiedlicher Systeme</li> <li>• Missing links im Netz wegen physischer und politischer Barrieren, die nur durch aufwendigen Tunnel- und Brückenbau geschlossen werden können</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Starker Lärmpegel bei zunehmender Geschwindigkeit</li> <li>• Emission von Luftschadstoffen durch den Verbrennungsmotor</li> <li>• Verbrauch von fossilen Brennstoffen und Emission von Kohlendioxid</li> <li>• Ungünstige Energiebilanz bei Unterauslastung</li> <li>• Hohe Unfall- und Staugefahr trotz technischer Verbesserungen</li> <li>• Hohe Anschaffungskosten und schneller Wertverlust</li> <li>• Fördert Zersiedlung und Flächenverbrauch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• relativ geringe Geschwindigkeit von 10-20 km/h (zum Schutz des Wasserwegs vor Wellenbildung und Erosion nur begrenzt zu steigern)</li> <li>• geringe Netzdichte der Wasserstraßen, deshalb meist mehrere Verkehrsträger mit Umladevorgängen erforderlich</li> <li>• zeitaufwändige Umwege durch die Windungen vieler Fließgewässer (kürzere Direktverbindung auf dem Landweg)</li> <li>• begrenzte Dimension von Kanälen, Schleusen und Durchfahrts Höhen (Nachteil für Containertransport)</li> <li>• negative Auswirkungen des Kanalbaus auf Umwelt und Landschaftsbild</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ungünstige Transportkosten für sperriges und schweres Massengut</li> <li>• Vergleichsweise hoher Energiebedarf pro beförderter Gewichtseinheit</li> <li>• Hohe Emissionen in Flugplatznähe sowie Problematik der Ozonschädigung in Reiseflughöhe</li> </ul>

Quelle: eigene Darstellung nach Nuhn, Hesse, 2006

Fällt der Rohstoff gleichmäßig in der Fläche an, so beträgt die durchschnittliche lineare Entfernung des Rohstoffs von der Konversionsanlage 0,71 des Radius (SCHOLWIN ET AL., 2011). Zusätzlich ist noch ein Verlängerungsfaktor von 1,27 zu berücksichtigen, da die Straßen nicht geradlinig verlaufen (LOHSE, ZIMMERMANN, 2003). Somit sind die Transportstrecken mit den jeweiligen Faktoren zu multiplizieren. Falls nicht die gesamte Fläche für die Gewinnung des Rohstoffs zur Verfügung steht, so ist die Fläche entsprechend dem Anteil des Rohstoffs an der Gesamtfläche zu vergrößern.

Handelt es sich bei dem Rohstoff um ein Koppelprodukt, was in vielen in der Fläche verteilten Anlagen anfällt, so kann für eine Abschätzung zunächst angenommen werden, dass es gleichverteilt im Raum zu erhalten ist. Fällt der Rohstoff jedoch in großen Anlagen an, so ist die tatsächliche Transportentfernung abzuschätzen.

Eine Fehleinschätzung bei den Transportkosten kann zu erheblichen Fehleinschätzung der Anlagewirtschaftlichkeit führen: Fällt der Rohstoff in der Fläche an, so kann ein Anstieg der Trans-

portkosten um 25 % zu einem Rückgang der verfügbaren Fläche (bei gleichem durchschnittlichem Rohstoffpreis) von 36 % führen.

Zusätzlich zu den Transportkosten müssen bei saisonal anfallenden Rohstoffen die notwendigen Lagerkosten in die Kalkulation einbezogen werden.

### **2.7.6 Rechtliche und politische Rahmenbedingungen (AP7.5)**

Die Beurteilung der rechtlichen und politischen Rahmenbedingungen dient der Abschätzung der derzeitigen Situation und einer Abschätzung der möglichen zukünftigen Entwicklungen sowie eventuell möglicher Fördermöglichkeiten durch die Politik.

Hierbei sind verschiedene mögliche Eingriffe zu unterscheiden: Solche Maßnahmen können zum einen direkt wahrnehmbar sein und direkt eine bestimmte Industrie fördern, sie können aber auch weniger augenscheinlich sein und indirekt zu Vorteilen oder Nachteilen für bestimmte Industrien führen. Mögliche Maßnahmen hierbei können sein:

- Ein- und Ausfuhrzölle
- Steuern
- Förderung der landwirtschaftlichen Produktion
- Garantiepreise
- Förderung von Produkten, bei denen benötigte Koppelprodukte anfallen
- Zuschüsse / Sonderabgaben auf benötigte Rohstoffe
- Umweltauflagen
- Förderung von Organisationen zur Markttransparenz, z.B. Preisberichtsstellen
- Staatliche Monopole

Solche Rahmenbedingungen können sowohl die Produktion behindern als auch fördern. Ebenso können sie gezielt eingesetzt werden, um neue Produktionen zu unterstützen oder eine mögliche Konkurrenz zu behindern. Allerdings werden durch internationale Vereinbarungen, insbesondere im Rahmen der WTO-Verhandlungen solche Beschränkungen des internationalen Wettbewerbs zunehmend abgebaut. Soll eine neue Maßnahme empfohlen oder eingeführt werden, so ist genau zu überprüfen ob diese mit den bestehenden Abkommen vereinbar ist oder nicht.

## **2.8 Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Da es sich um ein Modellprojekt zur ganzheitlichen Bewertung der biotechnischen Butanol-Herstellung handelte, waren keine konkreten Verwertungsergebnisse zu erwarten. Im Bereich des Rohstoffaufschlusses und der Rohstoffverwertung konnten einige interessante Ergebnisse in Bezug auf Weizenkaff gewonnen werden. Dieses liefert unter optimierten Aufschlussbedingungen Zucker-Konzentrationen von 80 g/L, ein Wert, der für viele andere fermentative Prozesse durchaus von Interesse sein kann.

Die Vielzahl der Aufschlussexperimente an unterschiedlichsten Biomassen hat auch gezeigt, dass eine Optimierung des totalen Aufschlusses nach NREL Sluiter et al. (2008) angebracht ist, da dieser

nicht für die Charakterisierung aller Bestandteile von Pflanzen gleich gut geeignet ist. Je nach Zusammensetzung der Biomasse werden auch Unterbefunde an Zucker gemessen, was bei einer international anerkannten Standardmethode nicht vorkommen sollte. Hier sind sicherlich weitere Untersuchungen erforderlich.

Die ökonomischen und ökologischen Betrachtungen zur Butanol-Fermentation zeigen, dass zum derzeitigen Stand der Rohstoffpreise und der Prozessergebnisse eine großtechnische Umsetzung sowohl ökonomisch als auch ökologisch nicht konkurrenzfähig zur Synthese aus fossilen Rohstoffen erscheint.

## **2.9 Relevante Erkenntnisse von Dritten**

Im Berichtszeitraum sind zahlreiche Publikationen und Patente auf dem Gebiet der biotechnischen Butanol-Herstellung erschienen. Soweit sie für unsere Arbeiten von Bedeutung waren, wurden sie berücksichtigt und an entsprechender Stelle zitiert. Grundlegende Änderungen der Ausrichtung des Projektes sowie neue bahnbrechende Fortschritte gibt es nicht. Insbesondere im Bereich der Gentechnik fällt auf, dass sich seit Beginn des Projektes der Schwerpunkt der gentechnischen Arbeiten in Richtung *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* verschoben hat. Hier steht aber wohl mehr die Wasserstoff- als die Butanol-Produktion im Fokus.

## **2.10 Erfolgte/geplante Veröffentlichungen**

### **veröffentlicht**

Anders, N.; H. Storz; U. Prüße; K.-D. Vorlop (2013): Hydrolysis of Wheat Chaff for Biofuel Production, Vortrag EU BC&E European Biomass Conference, Kopenhagen

Hellert, J. B. Lach; U. Prüße; K.-D. Vorlop (2013): A New Way for the Removal of 1-Butanol from Aqueous Model Solutions. Posterbeitrag, 9th European Congress of Chemical Engineering (ECCE-9), The Hague, The Netherlands

### **in Vorbereitung**

Anders, N.: Dissertation, TU Braunschweig

Kaufmann, Ch.: Dissertation TU Braunschweig

Hellert, J.: Dissertation TU Braunschweig

Anders, N.; H. Storz; U. Prüße; K.-D. Vorlop: Hydrolysis of Organosolv Pre-treated Wheat Chaff with High Endo-Glucanase- and  $\beta$ -Glucosidase-Activity Enzyme Mixture.

## 2.11 Literaturverzeichnis

### 2.11.1 Zu AP 2 - Rohstoffe

- Alvira P. et al. (2010): Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review; *Bioresource Technology*, 101: 4851 – 4861
- Benkun, Q. et al. (2011): Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose; *Bioresource Technology*; 102: 2881 - 2889
- Berlin A. et al. (2007): Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis; *Biotechnology and Bioengineering*, 97 (2): 287 - 296
- Bertran M. S. & B. E. Dale (1985): Enzymatic Hydrolysis and Recrystallization Behavior of Initially Amorphous Cellulose; *Biotechnology and Bioengineering*, 17: 177-181
- Bradford M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Den Haan R. et al. (2007): Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; *Metabolic Engineering*, 9: 87-94
- Duguid, K. B. et al. (2007): Screening for sugar and ethanol processing characteristics from anatomical fractions of wheat stover; *Biomass and Bioenergy* 31: 585 – 592
- Ghose T. K. (1987): Measurement of Cellulase Activities; *Pure & Appl. Chem.*, 59 (2): 257-268
- Hermans P. H. & A. Weidinger (1946): On the Recrystallization of Amorphous Cellulose; *Journal of the American Chemical Society*, 68 (12): 2547-2552
- Linde M. et al. (2008): Steam Pretreatment of dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production; *Biomass and Bioenergy*, 32 (4): 326 - 332
- Lynd L. R. et al. (2002): Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology; *Microbiology and Biology Reviews*, 66 (3): 506 - 577.
- Oldenburg, E. et al. (2001): Pilzbefall im Getreide (und wie man ihn vermeiden kann); *Forschungsreport; Über den Tellerrand geschaut – gesunde Ernährung und sichere Lebensmittel*; 20 – 26
- Saha B. C. et al. (2005): Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol; *Process Biochemistry*, 40 (12): 3693-3700
- Serena A. & K. E. Bach Knudsen (2007): Chemical and physicochemical characterisation of co-products from the vegetable food and agro industries; *Animal Feed Science and Technology*, 139: 109-124
- Sluiter A. et al. (2011): Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Technical Report NREL, Version 07-08-2011
- Zhang X. et al. (2009): High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates; *Bioresource Technology*, 100 (23):5890 - 5897

### 2.11.2 Zu AP 3 - Gentechnik

- Tashiro, Y. et al. (2004): *Journal of Bioscience and Bioengineering*; vol. 98: 263-268.
- Nakayama, S. et al. (2007): New host-vector system in solvent-producing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *J Gen Appl Microbiol* 53 (1): 53-6.
- Nakayama, S. et al. (2008): Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster hupCBA in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (3): 483-93.

### 2.11.3 Zu AP 4 - Fermentation

- Alalayah, W. M. et al. (2008): Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (24): 7392-7396.
- Anders, N. (2012): Persönliche Mitteilung
- Barros, M. R. A. et al. (1987): Integration of enzyme catalysis in an extractive fermentation process. Laane, C., J. Tramper and M. D. Lilly (Eds): 185-196.
- Brosseau, J. D. et al. (1985): The relationship between hydrogen gas and butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 305-310.
- Chen, C. K. & H. P. Blaschek (1999 a): Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52 (2): 170-173.
- Chen, C. K. & H. P. Blaschek (1999 b): Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2): 499-505.
- Choteborska, P. et al. (2004): Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering* 61 (4): 561-565.
- Doremus, M. G. et al. (1985): Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 27 (6): 852-860.
- Evans, P. J. & H. Y. Wang (1988a): Enhancement of butanol formation by *Clostridium-acetobutylicum* in the presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (7): 1662-1667.
- Evans, P. J. & H. Y. Wang (1988b): Response of *Clostridium acetobutylicum* to the presence of mixed extractants. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17: 175-192.
- German.alibaba.com. (2013a): Hefeauszugpreis, Justlong Imp. & Exp. Co., Ltd. Retrieved 13.09., 2013, from <http://german.alibaba.com/product-gs/yeast-extract-price-566058631.html>.
- Hellert, J. (2013): Persönliche Mitteilung
- Keis, S. et al. (2001): Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp nov and *Clostridium saccharobutylicum* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2095-2103.
- Kim, J. K. et al. (1999): Extraktive Recovery of Products from Fermentation Broths. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4 (1): 1-11.
- Kumakura, M. & I. Kaetsu (1984): Enzymatic-Hydrolysis of chaff using immobilized growing-cells. *Agricultural Wastes* 11 (4): 259-268.
- Millat, T. et al. (2013): A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (14): 6451-6466.
- Mollah, A. H. & D. C. Stuckey (1992): The influence of H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and dilution rate on the continuous fermentation of acetone-butanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 (5): 533-538.
- Nakayama, S. I. et al. (2008): Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster hupCBA in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (3): 483-493.
- Palmarola-Adrados, B. et al. (2005): Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* 96 (7): 843-850.
- Ries, L. W. et al. (1957): Kaff-Definition. *Pareys Landwirtschafts-Lexikon*. L. W. Ries (Hrsg). Hamburg & Berlin, Verlag Paul Parey. 7: 240.
- Rivas, B. et al. (2008): Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (7): 2380-2387.
- Ruhl, J. et al. (2009): Selected *Pseudomonas putida* Strains Able To Grow in the Presence of High Butanol Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (13): 4653-4656.

- Streit, B. et al. (2011): Spreu ist mehr wert. SHL Info HESA, 2011, from [http://www.hafn.bfh.ch/fileadmin/docs/Home/ueberShl/Magazin\\_Taetigkeitsbericht/SHL-Magazin\\_Nr10-2011.pdf](http://www.hafn.bfh.ch/fileadmin/docs/Home/ueberShl/Magazin_Taetigkeitsbericht/SHL-Magazin_Nr10-2011.pdf).
- Tashiro, Y. et al. (2004): High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (4): 263-268.
- Virunanon, C. et al. (2007): Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract *Anaerobe* 14 (2): 109-117

#### 2.11.4 Zu AP 5 – Aufarbeitung

- Evans, P. J. & H. Y. Wang (1988): Enhancement of Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum* in the Presence of Decanol-Oleyl Alcohol Mixed Extractants, *Applied and environmental microbiology*, 54, No 7, 1662-1667
- Groot, W.J. et al. (1992): Butanol recovery from fermentation by liquid-liquid extraction and membrane solvent extraction, *Process Biochemistry* 27: 61-75
- Handbook of Chemistry and Physics, 53rd Edition (1972-1973): Published by The Chemical Rubber Company
- Harvey, B. G. & H. A. Meylemans (2011): The role of butanol in the development of sustainable fuel technologies, *Journal of Chem Technol Biotechnol* 86: 2-9
- Kapucu, H. & Ü. Mehmetoglu (1998): Strategies for Reducing Solvent Toxicity in Extractive Ethanol Fermentation; *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75, 205-214
- Kim, J.K. et al. (1999): Extractive Recovery of Products from Fermentation Broths; *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4, 1-11
- Qureshi, N. et al. (2005): Minireview: Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption; *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 27, 215-222

#### 2.11.5 Zu AP 6 - Ökologie

- BSI (2008): PAS2050: Specification for the assessment of the life cycle greenhouse gas emissions of goods and services, British Standards Institution.
- Cheng, C. L. et al. (2012): Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Applied Energy* 100 (0): 3-9.
- Dohn, N. (2013): Technische, ökonomische und ökologische Bewertung der Einsetzbarkeit von biogenem n-Butanol im Raumwärmemarkt, Dissertation TU-Berlin
- EU (2009): DIRECTIVE 2009/28/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC.
- García, V., J. et al. (2011): Challenges in biobutanol production How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2): 964-980.
- Kraemer, K. et al. (2010): Separation of butanol from acetone-butanol-ethanol fermentation by a hybrid extraction-distillation process, 20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering - ESCAPE20
- Kumar, M. et al. (2012): Comparative economic assessment of ABE fermentation based on cellulosic and non-cellulosic feedstocks. *Applied Energy* 93 (0): 193-204.
- NNFCC (2010): Report 09-018, LCA Workbooks for a Selection of Major Renewable Chemicals
- Pfromm, P. H.; et al. (2010): Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy* 34 (4): 515-524.
- Qureshi, N.; & H. P. Blaschek (2000): Economics of Butanol Fermentation using Hyper-Butanol Producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Food and Bioprocess Processing* 78 (3): 139-144.

- Qureshi, N. et al. (2008b): Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part II--Fed-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* 32 (2): 176-183.
- Qureshi, N. et al. (2010b): Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I-Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy* 34 (4): 559-565.
- Qureshi, N. et al. (2010a): Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II-Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy* 34 (4): 566-571.
- Qureshi, N. et al. (2008a): Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part 1: Batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* 32 (2): 168-175.
- Saling, P. et al. (2002): Eco-efficiency analysis by BASF: The method. *International Journal of Life Cycle Assessment* 7 (4): 203-218.
- Saling, P. et al. (2005): Assessing the environmental-hazard potential for life cycle assessment, eco-efficiency and SEEBalance (R). *International Journal of Life Cycle Assessment* 10 (5): 364-371.
- Shonnard, D. R. et al. (2003): Industrial applications using BASF eco-efficiency analysis: Perspectives on green engineering principles. *Environmental Science & Technology* 37 (23): 5340-5348.
- Swana, J. et al. (2011): An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. *Bioresource Technology* 102 (2): 2112-2117.
- van der Merwe, A. B. et al. (2013): Comparison of energy efficiency and economics of process designs for biobutanol production from sugarcane molasses. *Fuel* 105 (0): 451-458.
- Wu, M. et al., (2007): Life-cycle assessment of corn-based butanol as a transportation fuel, Report for the US Department of Energy, Nov. 2007

### 2.11.6 Zu AP 7 - Ökonomie

- Bathelt, H. & J. Glückler (2003): *Wirtschaftsgeographie, Ökonomische Beziehungen in räumlicher Perspektive*; Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Dabbert, S. & J. Braun (2006): *Landwirtschaftliche Betriebslehre*; Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- KTBL (2009): *Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft: Faustzahlen für die Landwirtschaft*, 14. Auflage, Yara, Darmstadt
- Kuhlmann, F; (2003): *Betriebslehre der Agrar- und Ernährungswirtschaft*; 2. Auflage; DLG-Verlag, Frankfurt am Main
- Lenz, B. (1997): Das Filière-Konzept als Analyseinstrument der organisatorischen und räumlichen Anordnung von Produktions- und Distributionsprozessen; in: *Geographische Zeitschrift* 85, Jg. 1997, Heft 1, S. 20-33; Franz Steiner Verlag Wiesbaden GmbH, Stuttgart
- Lohse, D. & F. Zimmermann (2003): Erreichbarkeitsanalyse des Untersuchungsraumes. Teilstudie im Rahmen des Forschungsvorhabens „Umbau von Siedlungsstrukturen unter Schrumpfungsbedingungen als Grundlage einer nachhaltigen Entwicklung, Dresden.
- NRG-consultants (2013): Strohpellets; online verfügbar unter <http://www.bhkw-anlagen.com/100kwbiomassebhkw/strohballenvergaser/strohpellets/index.html>; zuletzt abgerufen am 21.05.2013
- Nuhn, H. & M. Hesse 2006: *Verkehrsgeographie*; Ferdinand Schöningh, Paderborn
- Schamp, E. W. (2000): *Vernetzte Produktion – Industriegeographie aus institutioneller Perspektive*; Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt
- Scholwin, F. et al. (2011): Nachhaltige Biogaserzeugung in Deutschland – Bewertung der Wirkungen des EEG; DBFZ, Leipzig; <http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/berichte/22003410.pdf>; zuletzt abgerufen am 10.01.2014
- Streit, B. et al. (2011): Spreu ist mehr wert; in: SHL Info HESA Nr. 10/2011, S. 14-15; Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft, Bern; [http://www.hafl.bfh.ch/fileadmin/docs/Home/ueberShl/Magazin\\_Taetigkeitsbericht/SHL-Magazin\\_Nr10-2011.pdf](http://www.hafl.bfh.ch/fileadmin/docs/Home/ueberShl/Magazin_Taetigkeitsbericht/SHL-Magazin_Nr10-2011.pdf), zuletzt abgerufen am 22.05.2013