

Biokraftstoffalternative

Butanolfermentation von mit wässrigem AFEX vorbehandelten Reststoffen

PETRA SCHÖNICKE¹, ANNA BARBARA LABUS², BIRGIT KAMM¹

¹ FORSCHUNGSINSTITUT BIOAKTIVE POLYMERSYSTEME E. V., TELTOW

² BIOREFINERY.DE GMBH, TELTOW

Butanol as a fuel has many advantages over ethanol. However, the fermentative production and the use of lignocellulose-containing residues is still a great challenge. Aceton-butanol-ethanol (ABE) fermentation was investigated by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 of ammonia fiber expansion (AFEX)-pretreated bagasse hydrolysate. Fermentation was carried out in two anaerobic fermentation systems: in a batch culture using 100-milliliters tight closed serum flasks and one-liter anaerobic fermenter.

DOI: 10.1007/s12268-018-0922-9

© Springer-Verlag 2018

■ Bei der aktuellen Diskussion um die zukünftige Mobilität möchte dieser Beitrag den Blick auf Butanol als alternativen Kraftstoff lenken. Durch die Nutzung von lignocellulosehaltigen Reststoffen der Landwirtschaft für die Herstellung von Butanol könnten Verbrennungsmotoren im Idealfall klimaneutral betrieben werden. Biobutanol hat

gegenüber Bioethanol eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften:

- Butanol hat eine höhere Energiedichte.
- Butanol ist nicht hygroskopisch und verursacht deshalb auch keine Probleme mit Korrosion.
- Butanol ist schwerer entflammbar, das heißt die Explosionsgefahr ist geringer.

– Butanol ist sowohl mit Benzin als auch mit Diesel in jedem Verhältnis mischbar.

Die Motoren müssen nicht verändert werden, wenn Butanol zugesetzt oder als alleiniger Kraftstoff verwendet wird, und die Tankstellenlogistik kann problemlos mitbenutzt werden [1]. Das heißt, bei einem Wechsel zu Butanol sind weder neue Motoren noch eine neue Infrastruktur erforderlich. Butanol ist deshalb ein echter *drop-in*-Kraftstoff.

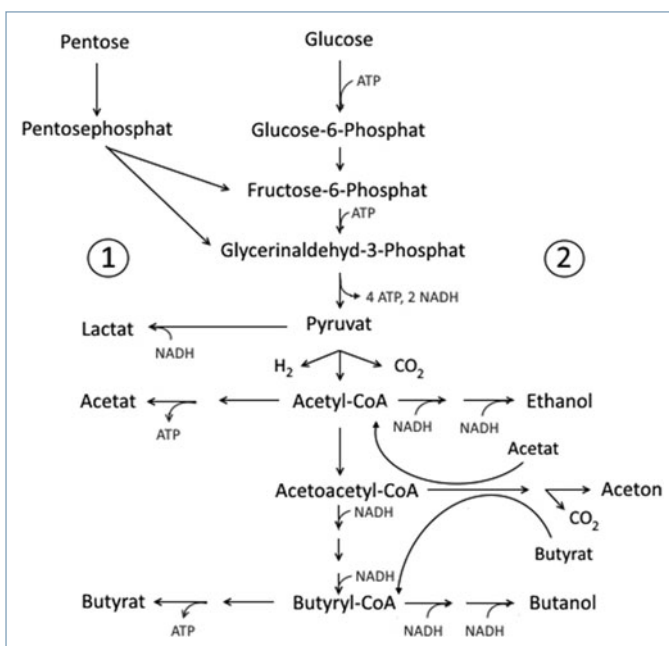
Während Butanol bei den Eigenschaften gegenüber Ethanol klar punkten kann, ergibt sich beim Schwierigkeitsgrad und der Entwicklungsreife der Prozesse im größeren Maßstab ein anderes Bild.

Herausforderungen auf dem Weg zum Biobutanol

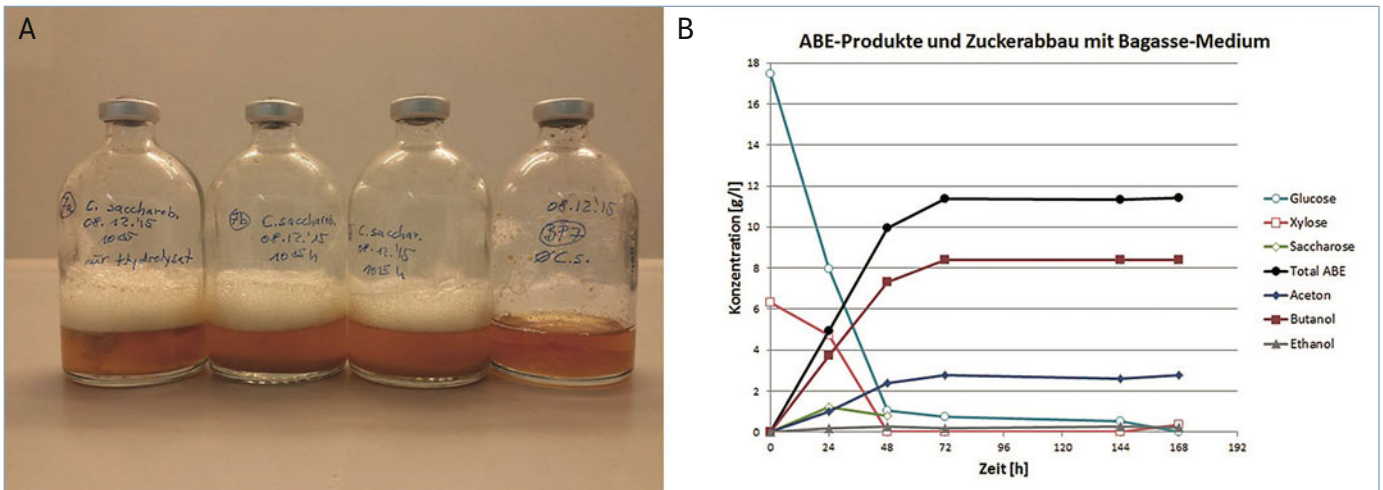
Lignocellulosehaltige Reststoffe sind sehr komplex und stehen erst nach einer entsprechenden Vorbehandlung den Produktionsmikroorganismen als Substrate zur Verfügung. Für die Fermentationen wurde Zuckerrohrbagasse als Reststoff der Rohrzuckergewinnung eingesetzt und mit einem wässrigem AFEX (*ammonia fiber expansion*)-Verfahren vorbehandelt [2]. AFEX bietet einige Vorteile gegenüber anderen Vorbehandlungen [3]. Dazu zählen die Möglichkeit der nahezu vollständigen Rückgewinnung der Vorbehandlungschemikalien (Ammoniak), die Unterdrückung der Bildung von Inhibitoren und der Effekt der Nährstoffzugabe für das mikrobielle Wachstum durch den verbleibenden Ammoniak in der vorbehandelten Biomasse [4]. Nach einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse stehen Hexosen und Pentosen in einer Zuckerlösung für Fermentationen zur Verfügung. Zur Anwendung kamen Enzyme (Cellulosic Ethanol Enzyme Kit) der Firma Novozymes A/S (Dänemark).

Neben einem effizienten Aufschluss der lignocellulosehaltigen Reststoffe sind für eine wirtschaftliche Aceton-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation weitere Hürden zu überwinden:

- Clostridien erfordern anaerobe Lebensbedingungen. Alle Medien werden unter Ausschluss von Sauerstoff hergestellt, anaerob beimpft und kultiviert.



◀ **Abb. 1:** Biphasischer Stoffwechsel von Clostridien: (1) acidogene Phase, (2) solventogene Phase (modifiziert aus [7]).



▲ **Abb. 2:** Aceton-Butanol-Ethanol(ABE)-Fermentation mit Bagassehydrolysat in Serumflaschen mit *Clostridium saccharobutylicum*, DSM 13864. **A,** Versuchsaufbau. **B,** Verlauf der Bagassehydrolysatfermentation mit Zuckerabbau und Endproduktbildung.

- Clostridien haben einen biphasischen Stoffwechsel (**Abb. 1**): In der ersten Phase findet das Wachstum, die Säurebildung und entsprechend eine starke Gasbildung (H_2 und CO_2) statt. Sie wird die acidogene Phase genannt (pH-Wert-Absenkung). Sind die Zucker verbraucht oder ist der pH-Wert zu stark abgesunken, stellt die Zelle ihren Stoffwechsel um. Sie hört auf zu wachsen, nimmt nun die Säuren aus dem Medium auf und wandelt diese in Butanol, Aceton und Ethanol um. Zugleich werden Speicherstoffe eingelagert und später Sporen gebildet. Diese solventogene Phase wird begleitet durch einen leichten Anstieg des pH-Wertes und eine geringe Gasbildung. Aufgrund dieses biphasischen Stoffwechsels werden ABE-Fermentationen häufig als Batch- oder Fed-Batch-Prozesse betrieben. Ein kontinuierlicher Prozess ist nur mithilfe von Immobilisierung und/oder Zellrückführung oder eines separaten Fermenters für das Zellwachstum über einen längeren Zeitraum stabil.
- Die maximalen Produktkonzentrationen einer ABE-Fermentation liegen etwa bei einem Zehntel der mit einer Ethanolfermentation erreichbaren Werte. Die Ursache liegt in der hohen toxischen Wirkung des Butanols auf die Zellen. Mit einer Entfernung von Butanol direkt aus der Fermentationsbrühe bereits während der Fermentation kann die starke Endprodukt-hemmung verhindert werden [5].
- Die Produktabtrennung aus der ABE-Fermentationsbrühe ist ein energieintensiver Prozess, der zusätzlich durch die geringen Produktkonzentrationen erschwert wird.

Die Erhöhung der Butanolausbeuten und eine vereinfachte Produktabtrennung sind die größten Herausforderungen auf dem Weg zu einem wirtschaftlichen Verfahren.

Auswahl des Fermentationsstamms

Zur Erzeugung von Butanol als Hauptprodukt der ABE-Fermentation durch Bakterien stehen vier Clostridien-Spezies zur Verfügung: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* und *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Wir haben nach einem Stamm gesucht, der kommerziell erhältlich ist, bereits ohne genetische Veränderung eine überdurchschnittlich hohe Butanolkonzentration bilden und zugleich Lignocellulosehydrolysate gut verwerten kann. Zusätzlich besitzt der ausgewählte Stamm von *C. saccharobutylicum* die Fähigkeit, Xylose simultan zur Glukose und nicht erst nachrangig umzusetzen [6]. Diese Fähigkeit verkürzt die Dauer der Fermentation und kann zugleich die Ausbeute erhöhen, sie fehlt jedoch den meisten anderen Clostridien.

Butanolfermentation mit Bagassehydrolysat in Serumflaschen

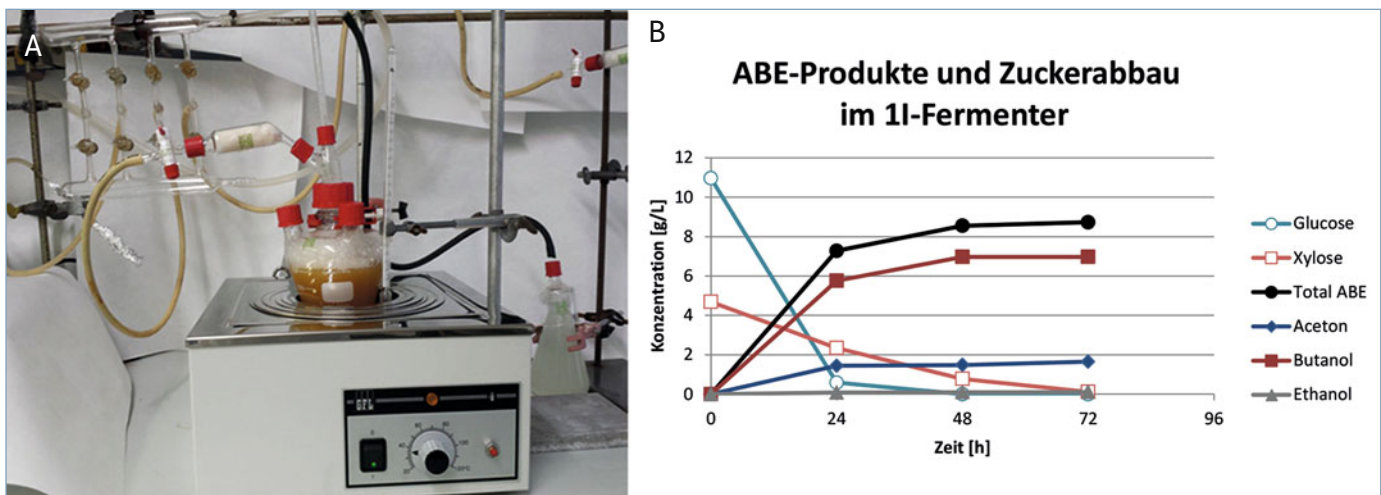
Die Butanolfermentation bestand aus drei parallelen Ansätzen (**Abb. 2A**, mit Schaumbildung) und einer Kontrollflasche. Sie diente zur Kontrolle des verwendeten Mediums, wurde nicht beimpft und zusammen mit den anaerob beimpften Serumflaschen für sieben Tage bei 35 °C in den Wärmeschrank gestellt. Das Volumen des Mediums betrug bei den Bagassehydrolysatfermentationen 27,5 Milliliter.

Die Proben vom Fermentationsverlauf wurden mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) bestimmt. Der Zuckerabbau und die Endproduktbildung sind in **Abbildung 2B** dargestellt.

Die Bagassehydrolysatfermentation produzierte innerhalb von 72 Stunden aus 24,8 Gramm pro Liter Zucker (17,44 Gramm pro Liter Glukose, 6,32 Gramm pro Liter Xylose und 1,05 Gramm pro Liter weitere Zucker) 8,41 Gramm pro Liter Butanol, was einer Ausbeute von 78,27 Prozent entspricht. Gleichzeitig wurden noch 2,54 Gramm pro Liter Aceton und 0,54 Gramm pro Liter Ethanol gebildet und somit eine ABE-Gesamtkonzentration von 11,49 Gramm pro Liter erreicht.

Butanolfermentation im Ein-Liter-Fermenter

Ein weiteres anaerobes Fermentationssystem ist der Ein-Liter-Fermenter (**Abb. 3A**). Hier wurden 700 Milliliter Medium eingesetzt. Der wesentliche Unterschied zur Serumflasche (27,5 Milliliter Medium) ist neben der 25-fachen Maßstabsvergrößerung, dass mit diesem System ein sofortiger anaerober Druckausgleich möglich ist (**Abb. 3A**, rechts unten im Bild). Die Gasbildung und damit die Bildung der Säuren als Zwischenprodukte wurden nicht durch einen Druckaufbau behindert, wie er in der verschlossenen Serumflasche stattfand. Nach einer Vortemperaturung des anaeroben Mediums erfolgte die Beimpfung unter Stickstoffbegasung. Danach wurde der Fermenter für drei Tage in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 35 °C gestellt. Nach der Beimpfung erfolgten auch die Probenahmen unter Stickstoffbegasung, um die



▲ **Abb. 3:** Aceton-Butanol-Ethanol(ABE)-Fermentation im anaeroben Ein-Liter-Fermenter mit *Clostridium saccharobutylicum*, DSM 13864. **A,** Versuchsaufbau mit Wasserbad, Druckausgleich und Möglichkeit zur Stickstoffspülung während der Probenahme. **B,** Verlauf der Bagassehydrolysatfermentation mit Zuckerabbau und Endproduktbildung.

anaerobe Atmosphäre zu erhalten. Die Proben wurden wie bei den Serumflaschen sofort gasdicht verschlossen, auf 85 bis 90 °C erhitzt, autoklaviert und bis zur HPLC-Bestimmung kühl aufbewahrt.

Die Ergebnisse bei den Serumflaschen haben gezeigt, dass eine Verkürzung der Fermentationszeit auf drei Tage (72 Stunden) unter den gewählten Bedingungen ohne Einfluss auf das Endergebnis möglich ist. Im Vergleich der Fermentation in Serumflaschen mit der Ein-Liter-Fermenteranlage konnte Letztere mit vergleichbaren Medien jeweils eine um bis zu zehn Prozent höhere Ausbeute an Butanol liefern. Gleichzeitig ist eine Verkürzung der Fermentationsdauer auf 48 Stunden möglich. Beides kann auf den positiven Effekt des kontinuierlichen Druckausgleichs zurückgeführt werden. Dies ist neben der erfolgreichen simultanen Fermentation von Glukose und Xylose im Bagassehydrolysat als agrarischem Reststoff eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Untersuchungen.

Danksagung

Die Arbeiten wurden im Rahmen eines INNO-KOM-OST-Projektes vom BMWi im Modul „Marktorientierte Forschung und Entwicklung“ (FKZ MF150131) unterstützt. ■

Literatur

- [1] Ni Y, Xia Z, Wang Y et al. (2013) Continuous butanol fermentation from inexpensive sugar-based feedstocks by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *Bioresour Technol* 129:680–685
- [2] Kamm B, Leiß S, Schönicke P et al. (2017) Biorefining of lignocellulosic feedstock by modified AFEX pretreatment and enzymatic hydrolysis for production of fermentable sugar. *ChemSusChem* 10:48–52
- [3] Arshadi M, Attard A, Lukasik RM et al. (2016) Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain. *Green Chem* 18:6160–6204
- [4] Balan V, Bals B, Chundawat SP et al. (2009) Lignocellulosic biomass pretreatment using AFEX. *Methods Mol Biol* 581:61–77
- [5] Outram V, Lalander C-A, Lee JGM et al. (2017) Applied *in situ* product recovery in ABE fermentation. *Biotechnol Prog* 33:563–579
- [6] Gao K, Rehmann L (2014) ABE fermentation from enzymatic hydrolysate of NaOH-pretreated corncobs. *Biomass Bioenergy* 66:110–115
- [7] Patakova P, Linhova M, Rychtera M et al. (2013) Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnol Adv* 31:58–67



Petra Schönicke, Birgit Kamm und Anna Barbara Labus (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Birgit Kamm
WOOD KPLUS Kompetenzzentrum Holz GmbH
Geschäftsbereich Holzchemie und Biotechnologie
Science Park 2
Altenberger Straße 69
A-4040 Linz
Tel.: +43-(0)732-2468-6773
Fax: +43-(0)732-24686755
b.kamm@kplus-wood.at
<http://www.kplus-wood.at>