

Forschungsbericht BWPLUS

**Nachhaltige Bioethanolerzeugung durch
Vorbehandlungsoptimierung hochdiverser
Blühpflanzenmischungen
Akronym: sustain fuel**

von

Daniel Einfalt

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Fachgebiet Hefegenetik und Gärungstechnologie (150f)

Förderkennzeichen: BWBÖ 17001

Die Arbeiten des Baden-Württemberg-Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre
Sicherung (BWPLUS) werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2018



Inhalt

1.	Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse	3
2.	Motivation und Hintergründe des Vorhabens	3
3.	Aufgabenstellung	4
4.	Gegenwärtiger Stand der Kenntnisse	4
5.	Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Forstschritte auf diesem Gebiet bei anderen Stellen	5
6.	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
7.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	6
8.	Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms des Zuwendungsgebers	6
9.	Material und Methoden	6
9.1	Substratcharakterisierung	6
9.2	Vorbehandlungsmethoden	7
9.3	Enzymatische Hydrolyse	7
10.	Ergebnisse	9
10.1	AP 1 Substrathomogenisierung und -charakterisierung	9
10.2	AP 2 Etablierung der substratspezifischen Vorbehandlungsmethodik	10
10.3	AP 3 Vorbehandlung diverser Blühpflanzenmischungen	14
10.4	AP 4 Optimierte enzymatische Hydrolyse für Blühpflanzenmischungen	17
10.5	Bioökonomische Betrachtung des Gesamtversuchs	20
11.	Nutzen, insbesondere praktische Verwertbarkeit der Ergebnisse u Erfahrungen;	23
12.	Handlungsempfehlung	23
13.	Konzept zum Ergebnis- und Forschungstransfer auch in projektfremde Anwendungen und Branchen	23
14.	Erfolgte oder geplante VÖ der Ergebnisse	23



1. Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse

Ziel der Kurzstudie bestand in der Untersuchung der Umsetzbarkeit von Blühpflanzenmischungen zur technischen Bioethanolgewinnung. Um lignocellulosehaltige Substrate für die Bioethanolgewinnung vorzubereiten, sind zwei essentielle Prozessschritte nötig. Diese umfassen eine (i) Vorbehandlungsmethode und (ii) eine enzymatische Hydrolyse um die in Cellulose und Hemicellulose gespeicherten Kohlenhydrate als Mono- bzw. Disaccharide freizulegen und in Lösung zu versetzen. Die Effizienz der Bearbeitungsschritte wurde anhand dieser Konversionsraten ermittelt.

Gegenstand der Untersuchung waren sechs Blühpflanzenmischungen (BM) mit unterschiedlicher Artenzusammensetzung. Die diverseste Blühpflanzenmischung (BM4) *Blühende Landschaft Süd* bestand aus 50 Taxa und wurde zur Bewertung der Konversionseffizienz durch drei Vorbehandlungsmethoden bearbeitet.

Die Vorbehandlungsmethoden umfassten Querstromzerspannung (QZ), steam explosion (SE) und ammonia fibre expansion (AFEX). Alle drei Vorbehandlungsmethoden konnten etabliert werden. Die höchsten Konversionsraten wurden bei Vorbehandlungsmethode AFEX ermittelt (37,62 - 45, %). Im Vergleich zur Vorbehandlungsmethode QZ (Konversion 33,53 - 36,67 %) zeigte die Vorbehandlungsmethode SE mit Konversionsraten von 23,90 - 26,45 % die geringste Effizienz.

Zusätzlich wurden alle sechs Blühpflanzenmischungen mit den drei Vorbehandlungsmethoden bearbeitet und mit drei unterschiedlichen Enzymen hydrolysiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Vorbehandlungsmethoden. Daraus wird ersichtlich, dass die Vorbehandlungsmethoden ähnliche Potentiale besitzen und Optima nur unter Berücksichtigung der spezifischen Blühpflanzenmischung definiert werden können.

Zur Überprüfung der Konversionspotentiale der sechs Blühpflanzenmischungen, wurden alle sechs Blühpflanzenmischungen mit sechs Enzymen hydrolysiert. Der Einsatz der Enzyme erfolgte auf Basis der Enzymaktivität, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei zeigte Blühpflanzenmischung BM 4 die signifikant höchsten Konversionspotentiale (Median = 30,33 %, $p \leq 0,02$). Damit ist Blühpflanzenmischung BM 4 am ehesten für die Bioethanolerzeugung geeignet.

Die Verwendung technischer Enzyme ist ein zusätzlicher Faktor, welcher die Rentabilität des Verfahrens und damit die Bioökonomie beeinflusst. Auf Basis der zugegebenen Enzymmengen lässt sich eine konkrete Aussage zum Kostenaufwand nach Listenpreis treffen. Dabei sind die Enzyme Cellic CTec2 (Novozymes) und 22178 (Merck) mit den geringsten Anschaffungskosten verbunden.

Unter Berücksichtigung bioökonomischer Faktoren lässt sich die Vorbehandlungsmethode QZ mit dem geringsten Prozessierungsaufwand definieren. Vergleicht man die Konversionsraten von Blühpflanzenmischungen mit dem Referenzmaterial Weizenstroh, so zeigt sich, dass Blühpflanzenmischungen mit Vorbehandlungsmethode QZ eine deutlich bessere Konversionsrate gegenüber Weizenstroh besitzen. Dies ist insofern relevant, da Weizenstroh erst mit höherem Prozessierungsaufwand (z.B. Vorbehandlungsmethode SE oder AFEX) vergleichbare Konversionsraten erreicht. Entsprechend unterliegen Blühpflanzenmischungen einfacheren Konversionsbedingungen und können damit positiv zu bioökonomischen Faktoren beitragen.

2. Motivation und Hintergründe des Vorhabens

Bislang beruht die technische Bioethanolerzeugung zum größten Teil auf stärkehaltigen Substraten (z.B. Getreidefrüchte). Bei der Verarbeitung dieser Substrate wird die Stärke zunächst verflüssigt und anschließend verzuckert. Dieses Biokonversionsverfahren von Stärke zu Monosacchariden gilt als sehr gut erforscht. Der Einsatz von stärkehaltigen Ausgangssubstraten zur Herstellung eines Energieträgers steht jedoch häufig in Flächenkonkurrenz zur Erzeugung von Lebensmitteln. Dies gipfelt in der kontrovers geführten ‚Tank-Teller-Debatte‘. Landwirtschaftliche Reststoffe werden schon lange als Alternativen für stärkebasierte Rohstoffe diskutiert und könnten zukünftig entsprechende Rohstoffe in der Bioethanolerzeugung ersetzen. Jedoch bestehen landwirtschaftliche Reststoffe meist aus lignocellulosehaltigen Pflanzenstrukturen (z.B. Stroh, Holz), deren Aufarbeitung aufwendig und damit kostenintensiv ist. Der Aufschluss von Lignocellulose ist nicht trivial und bedarf eines aufwändigen Vorbehandlungsverfahrens. Die Aufwands- und Kostenoptimierung dieser Vorbehandlung bleibt ein elementarer Bestandteil der Prozesskette, welcher die Bioökonomie maßgeblich beeinflusst.

Das bearbeitete Projekt betrachtet die Gewinnung von Bioethanol auf Basis besonders nachhaltiger Biomasse. Die Bezeichnung Bio-Ethanol ist, ähnlich wie im Bio-Gas Sektor, eine Definition, welche darauf fokussiert, dass das Ausgangssubstrat biologischen und nicht mineralischen Ursprungs ist. Im Biogas-Sektor wurden bereits Bestrebungen unternommen, die Begrifflichkeit Biogas in „Agrargas“



abzuändern, um nicht in Konflikt mit der ökologischen Produktionsweise von Lebensmitteln nach EG-Öko-Basisverordnung (EG) Nr. 834/2007 zu geraten. Des Weiteren wurde ein Arbeitspaket verfasst, in welchem angedacht wurde, dass besonders nachhaltig erzeugtes Biogas zu *Sustaingas* umdeklariert werden soll. Dies soll für eine Energieerzeugung auf stark nachhaltiger Basis stehen (Gerlach et al, 2014). Entsprechend soll *Sustaingas* auf dem Markt einen Mehrwert erzielen, welcher dem Erzeuger und der Nachhaltigkeit entgegenkommt. Dies unterstützt dabei auch die Ziele der deutschen Nachhaltigkeitsstrategie (Bundesregierung, 2016).

Ähnliche Bestrebungen könnten durch die Etablierung von besonders nachhaltig erzeugtem Bioethanol unternommen werden. Eine Umdeklarierung von Bioethanol zu „*sustain fuel*“, bei Verwendung besonders nachhaltiger Substrate (z.B. Feldreststoffe, Landschaftspflegematerial, Blühpflanzenmischungen), könnte für einen Treibstoff mit hohem ökologischen Nutzen stehen. Dieser könnte auf Grund der ökologischen Basis zu einem höheren Preis auf dem Treibstoffsektor angeboten werden. Im Rahmen der nachhaltigen Bioökonomie wurde im Forschungsprojekt die Umsetzbarkeit von Blühpflanzenmischungen zur Bioethanolgewinnung untersucht. Dies könnte ein bislang ungenutztes Marktpotenzial aufzeigen.

Bioökonomie spielt bei der Bioethanolerzeugung eine entscheidende Rolle. Bislang wird Bioethanol unabhängig vom Ausgangssubstrat betrachtet und als ein einheitliches Produkt am Markt angeboten. Um gegenüber etablierter Bioethanolproduktion konkurrenzfähig zu sein, muss das Aufschlussverfahren der lignocellulosehaltigen Substrate möglichst effektiv und kostengünstig sein. Bislang zeigt sich jedoch kein Verfahren vorteilhaft gegenüber der stärkebasierten Bioethanolproduktion. Entsprechend wäre die Etablierung eines neuen Marktprodukts interessant, um den ökologischen Nutzen spezifischer Substrate für die Bioethanolproduktion monetär zu honorieren. Dadurch könnte die Substratauswahl hinsichtlich ihrer ökologischen Vorteilhaftigkeit vergütet werden.

3. Aufgabenstellung

Im Projekt wurde die Einsatzmöglichkeit von Rohstoffen mit sehr hohem ökologischem Nutzen für die Bioethanolerzeugung untersucht. Blühpflanzenmischungen bieten hierfür ideale Voraussetzung, da sie auf zahlreichen Ebenen ökologische Dienstleistungen bedienen. Entsprechend wurden sechs verschiedene Blühpflanzenmischungen mit definierter Artzusammensetzung hinsichtlich ihrer Umsetzbarkeit für die Bioethanolproduktion untersucht.

Um die im pflanzlichen Stützgewebe enthaltenen Zuckermoleküle der anschließenden Prozesskette möglichst vollständig zur Verfügung zu stellen, ist es nötig, eine geeignete Vorbehandlungsmethode anzuwenden. Vorbehandlungsmethoden können sich hinsichtlich ihres energetischen und stofflichen Einsatzes stark unterscheiden. Im Projekt wurden die drei Vorbehandlungsmethoden ‚ammonia fibre expansion‘ (AFEX), ‚steam explosion‘ (SE) und Querstromzerspannung (QZ) angewandt und analysiert. Im Projekt sollte zunächst die vielversprechendste Vorbehandlungsmethode anhand der diversesten Blühpflanzenmischung ermittelt werden. Diese Methode wurde anschließend auf alle sechs Blühpflanzenmischungen angewandt, um eine Empfehlung bezüglich der Artzusammensetzung auf die Bioethanolproduktion definieren zu können.

Anschließend erfolgte der definierten Einsatz spezifischer Enzyme. Dies ermöglicht erst eine hohe Ausbeute an vergärbaren Zuckern. Durch die enzymatische Hydrolyse sollte ein möglichst effizienter Umsatz des Ausgangssubstrats zu Monosacchariden erfolgen. Am Ende sollte eine bioökonomische Bewertung der Eignung von Blühpflanzenmischungen für die Ethanolproduktion stehen.

4. Gegenwärtiger Stand der Kenntnisse

Mit Ausnahme von wenigen Untersuchungen (z.B. Camargo & Sene, 2014; Vaithanomsat et al, 2009) wurden Blühpflanzen bislang nur selten für die Verwendung zur Bioethanolproduktion untersucht. Die Verwendung definierter Blühpflanzenmischungen für die Bioethanolproduktion stellt ein Novum in dieser Disziplin dar. Entsprechend sollte in der Konzeptstudie eine geeignete Voraufschlussmethodik für eine erfolgreiche Umsetzung von Blühpflanzenmischungen als Bioethanolsubstrat gefunden werden. Elementar ist dabei der Aufschluss der lignocellulosehaltigen Stützstrukturen der Pflanzen mittels geeigneter Vorbehandlungsmethodik. Diese bestehen hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Durch mechanische, thermische und/oder chemische Vorbehandlungen des Rohstoffs werden die kristalline Cellulosestruktur und der Polymerisationsgrad der komplexen Ligninmoleküle reduziert. Dadurch wird die Zugänglichkeit der Rohstofffraktionen für die anschließende enzymatische Hydrolyse effizient verbessert (Alvira et al., 2010).

Es sind verschiedene Voraufschlussverfahren bekannt. Im Projekt wurden drei hocheffiziente Methoden angewandt und hinsichtlich Aufschlusseffizienz verglichen. Die drei



Vorbehandlungsmethoden AFEX, SE und QZ haben unterschiedliche Vorteile und können zu höheren Aufschlussraten führen. Die AFEX ist eine vielversprechende Voraufschlussmethode für die Anwendung auf lignocellulosehaltige Reststoffe. Dabei wird flüssiges Ammoniak zur Biomasse gegeben, welches durch zusätzlichen Einfluss von Druck und Temperatur über einen definierten Zeitraum auf das Substrat wirken kann. Anschließend wird der Druck schlagartig reduziert, welches zur Lösung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin führt (Bals et al., 2010). SE ist ein vergleichbares Verfahren, welches ohne die Zugabe von Ammoniak wirkt. Hier steht unter anderem die Reduzierung der Prozesskosten im Vordergrund. Deshalb ist SE auch eine der meistverwendeten Vorbehandlungsmethoden. Dabei wird das Substrat unter Zugabe von Wasser in einen dafür konstruierten Dämpfer gegeben, welcher gasdicht verschlossen wird. Das Substrat wird erhitzt und unter Druck konstant gerührt. Durch schlagartigen Druckabfall geht das in den Fasern eingelagerte Wasser in den Dampfzustand über, wobei die Faserstruktur aufgebrochen wird (Schläfle et al., 2017a). Beim QZ wird Biomasse mittels einer drehenden Schlageinrichtung beansprucht. Durch die hohe Drehfrequenz prallt die Schlageinrichtung regelmäßig auf das Substrat und bricht dadurch harte und spröde Pflanzenteile auf. Dies hat eine Auffaserung des Materials zur Folge. Diese Technik wird bereits häufig in kontinuierlich arbeitenden Biogasanlagen eingesetzt und hat viele Vorteile hinsichtlich Prozesskosten, Prozesskontrolle, Zuckerverlustreduzierung, technischer Anpassungsfähigkeit und variabler Durchflussraten (Brückner & Sawatzki 2011). Eine Biogasertragsteigerung um 9,2 - 9,7 % durch den Einsatz eines QZ wurde bei einer Substratkontaktzeit von nur 15 Sekunden festgestellt (Mönch-Tegeeder, et al., 2014). Im Vergleich zu AFEX und SE hat die Vorbehandlungsmethode QZ den gezielten Vorteil, dass keine großen Zusätze an flüssigen Fraktionen zugeführt werden müssen. Dies hat positive Auswirkungen auf die später erfolgende enzymatische Hydrolyse, da eine geringere Enzymzugabe erforderlich ist. Die Vorbehandlungsmethoden ermöglichen zudem eine verbesserte Zugänglichkeit von Enzymen zum Abbau der Cellulose und anderer Derivate.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte auf diesem Gebiet bei anderen Stellen

Der Forschungsstelle sind keine Fortschritte bekannt

6. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur strukturierten Bearbeitung des Vorhabens wurden einzelne Arbeitspakete (AP) definiert. Diese umfassten im Allgemeinen die Substratcharakterisierung, Vorbehandlungsmethodik und enzymatische Hydrolyse.

AP 1 Substrathomogenisierung und -charakterisierung

Das hochdiverse Ausgangsmaterial bedarf einer intensiven Homogenisierung um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Zur Ermittlung eines optimierten spezifischen Enzymeinsatzes für den Hydrolyseprozess war die Charakterisierung der Substrate hinsichtlich Cellulose-, Hemicellulose- und Ligninanteil elementar.

AP 2 Etablierung der substratspezifischen Vorbehandlungsmethodik

Die diverseste Blühpflanzenmischung wurde mittels der drei Vorbehandlungsmethoden AFEX, SE und QZ bearbeitet, um exemplarisch für eine ideale Vorbehandlungsmethodik für Blühpflanzenmischungen zu stehen. Dafür wurde die Querstromzerspannungsmethodik auf optimale Substrataufbereitung modifiziert. Zur Detektion des Aufschlussersfolgs wurde eine umfangreiche Laboranalytik angewandt.

AP 3 Vorbehandlung diverser Blühpflanzenmischungen

Die sechs Blühpflanzenmischungen wurden auf Basis Ihrer Konvertierbarkeit (Aufschlussraten) zur Eignung für die Bioethanolproduktion überprüft. Die in AP 2 etablierte Vorbehandlungsmethodik wurde auf alle Substrate angewandt. Zur Detektion des Aufschlussersfolgs wurde eine umfangreiche Laboranalytik angewandt.

AP 4 Optimierte enzymatische Hydrolyse für Blühpflanzenmischungen

Verschiedene Enzympräparate wurden auf Ihre Funktionalität hin untersucht und Ihre Effizienz bei den vorbehandelten Blühpflanzenmischungen interpretiert. Optimale Einsatzvolumina des effektivsten Enzympräparats wurden hinsichtlich bioökonomischer Parameter interpretiert. Zur Detektion des Aufschlussersfolgs wurde eine umfangreiche Laboranalytik angewandt.



7. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Blühpflanzenmischungen wurden durch die Hohenheimer Gärten (Botanischer Garten der Universität Hohenheim) angepflanzt, betreut und zur Verfügung gestellt.

8. Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms des Zuwendungsgebers

Das Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz definiert Bioökonomie unter den Gesichtspunkten der nachhaltigen und ressourceneffizienten Erzeugung von landwirtschaftlicher Biomasse und deren Einsatzmöglichkeiten. Auch Blühpflanzenmischungen können als landwirtschaftliche Biomasse betrachtet werden, deren biochemisch gespeicherte Energie zur Erzeugung von Bioethanol dienen kann. Gewonnenes Bioethanol kann, unabhängig vom Ausgangsrohstoff, als Kraftstoff dienen. Als Hintergrund dient die Konzeptstudie u.a. dem Umweltministerium, um den Einsatz nachwachsender Rohstoffe zur Erzeugung von Kraftstoff zu nutzen und deren Potentiale abzuschätzen. Im Rahmen dessen dient die Konzeptstudie der Untersuchung nachhaltiger Biomasse mit besonders hohem ökologischen Nutzen dem Mobilitätssektor auf Basis der Bioethanolgewinnung.

9. Material und Methoden

9.1 Substratcharakterisierung

Die sechs unterschiedlichen Blühpflanzenflächen wurden im Frühjahr 2016 durch die Hohenheimer Gärten eingesät. Zur Pflege wurden die Blühpflanzenflächen im September 2016 einmal geschnitten. Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde im zweiten Standjahr im September 2017 nach einmaligem frischem Schnitt gesammelt. Die sechs Blühpflanzenmischungen (BM) wurden homogenisiert, auf 3 cm Länge geschnitten und bei -18°C gelagert. Die BM wurden anschließend umfangreich charakterisiert. Dies umfasste Trockensubstanzgehalt (TS), organischem Trockensubstanzgehalt (oTS), Aschegehalt (Ash), acid insoluble residues (AIR), acid insoluble lignin (AIL) und acid soluble lignin (ASL). Die einzelnen Parameter wurden in Dreifachbestimmungen erfasst. Die Analyse von TS, oTS und Ash erfolgte nach Naumann et al. (1976). Zur Bestimmung der TS wurde eine definierte Menge des frischen Substrats bei $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank (Heraeus, T 5042, Deutschland) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Bestimmung von oTS und Ash erfolgte anhand einer definierten Einwaage an getrockneter Probe ($2,0 \pm 0,5$ g), welche anschließend in einem Muffelofen bei $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 70 Minuten verascht wurden. Die Substrate wurden in einem Exsikkator transportiert und abgekühlt. Die Wägung erfolgte an Hand einer Feinwaage (Kern & Sohn GmbH, ABJ 320-4NM, Deutschland).

Die Analyse von Cellulose, Hemicellulose und Lignin erfolgte nach NREL (2012). Dafür wurden die Substrate im Trockenschrank bei 105°C getrocknet. Anschließend wurden die Substrate bei regelmäßiger Durchmischung mit 72% H_2SO_4 über 60 Minuten behandelt. Die Substrate wurden daraufhin mit destilliertem Wasser auf eine Säurekonzentration von 4% H_2SO_4 verdünnt. Im Anschluss erfolgte ein Autoklavierungsschritt der Lösungen bei 121°C für 60 Minuten. Daraufhin wurde die Filtration durch Filtertiegel durchgeführt. Die Filtrerrückstände wurden getrocknet und dienten der gravimetrischen Bestimmung der AIR. Nach anschließendem Veraschen der Filtrerrückstände wurde die AIL gravimetrisch bestimmt. Das Filtrat wurde photometrisch bei 320 nm gemessen und daraus die ASL-Werte bestimmt. Der gesamte Ligninanteil (Lignin total) ergibt sich aus der Summe aus AIL und ASL.

Zur Bestimmung des Anteils an Cellulose und Hemicellulose im Ausgangssubstrat wurden die in den Filtraten auftretenden monomeren Kohlenhydratkonzentrationen an Glucose, Cellobiose, Xylose und Arabinose bestimmt. Die Ermittlung des Anteils an Cellulose erfolgt auf Basis der Bestandteile an Glucose und Cellobiose. Auf den Substratanteil an Hemicellulose wird durch die Monosaccharide Xylose und Arabinose rückgeschlossen. Dies erfolgt durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors auf Basis eines vorab definierten ‚sugar recovery standard‘, welcher dieselbe Behandlung wie die Substrate erfährt.

Für die Ergebnisanalysen wurden die Gesamtzuckerkonzentrationen der Lösungen dargestellt, welche sich aus den Summen der Hexosen (Xylose und Arabinose) und Pentosen (Glucose und Cellobiose) zusammensetzen. Die Umsetzung beider Zuckerarten anhand gentechnisch veränderter Hefestämme ist eine gängige, in der Cellulose-Bioethanolherzeugung etablierte Methode.



9.2 Vorbehandlungsmethoden

9.2.1 Querstromzerspanung (QZ)

Zur Durchführung der Laborversuche zur Querstromzerspanung, wurde ein geeignetes Laborgerät zur Substratbehandlung angeschafft. Querstromzerspaner werden in der Regel auf faserhaltige Substrate angewandt und sind technisch mit einer drehenden Kette ausgerüstet. Durch konstante Schlagwirkungen wird das Substrat aufgefasert und zum Teil zerkleinert. Da solche Gerätschaften nicht für den Laborbedarf verfügbar sind, wurde auf eine Zerspanungstechnik mit drehendem, stumpfen Rotorblatt zurückgegriffen. Dafür stellt das Gerät Thermomix TM5 (Vorwerk, France) eine geeignete Option dar, da neben Rotordrehzahl die Substratauffaserung (stumpfe Rotorseite im Linkslauf) und die Substratzerkleinerung (schneidende Rotorseite im Rechtslauf) einstellbare Parameter darstellen. Im Rahmen der Konzeptstudie wurden eine Vielzahl an Einstellungsparameter untersucht und die bevorzugte Zerspanungsbearbeitung optisch ermittelt. Dabei wurden die folgenden Parameter berücksichtigt:

- Substrat trocken / frisch / gefroren
- Substratzerkleinerung (Schnitt im Rechtslauf)
- Substratauffaserung (Schlag im Linkslauf)
- Rotordrehzahl

9.2.2 Steam explosion (SE)

Die SE wurde in einem druckfesten, doppelwandigen Dämpfer (H & K GmbH Behälter und Edelstahltechnik, Kehl, Germany) durchgeführt. Dazu wurde das jeweilige Substrat mit Wasser zu einer definierten Lösung von 10% TS verdünnt und in den Dämpfer gegeben. Der Dämpfer wurde anschließend druckdicht verschlossen und eine konstant agierende Durchmischungseinrichtung (22 U/Min) aktiviert. Mittels indirekter Dampfzirkulation in die Heizschlangen im Doppelmantel wurde das im Behälter befindliche Substrat erhitzt. Das Substrat wurde für 45 Minuten auf 160°C bei einem Innendruck von $5,0 \pm 0,7$ bar erhitzt. Anschließend wurde der Druck durch Öffnung eines Ventils schlagartig auf Umgebungsdruck verringert. Dies bewirkt ein schlagartiges Lösen der Faseranteile. Das behandelte Substrat wurde anschließend gemeinsam mit dem flüssigen Anteil bei -18 °C gelagert.

9.2.3 Ammonia fibre expansion (AFEX)

Zur Vorbehandlung der Substrate mit AFEX wurde der unter 9.2.2 beschriebene Dämpfer verwendet. Dem jeweiligen Substrat wurde Ammoniak (NH_3) im Verhältnis 1:1 (w/w) [g/g TS] sowie Wasser im Verhältnis 3:1 [g/g TS] zugegeben. Die Mischung wurde dem Dämpfer zugeführt, welcher druckfest verschlossen wurde. Durch indirekte Beheizung mit Dampf wurde das Substrat für 45 Minuten auf 160°C aufgeheizt, wobei ein Innendruck von $5,0 \pm 0,7$ bar entstand. Im Anschluss wurde ein Ventil am Boden des Dämpfers geöffnet und der Überdruck entwich schlagartig. Dieser rasche Druckverlust bewirkt ein zusätzliches Auffasern des Substrats. Das Substrat wurde anschließend abfiltriert und im Trockenschrank bei 95°C getrocknet. Nach der Trocknung wurde das vorbehandelte Substrat bei -18°C gelagert.

9.3 Enzymatische Hydrolyse

Zur strukturierten Bearbeitung der enzymatischen Hydrolyse werden Versuchsdesign, Versuchsdurchführung sowie Versuchsauswertung eigenständig betrachtet.

9.3.1 Versuchsdesign

Im Rahmen der Konzeptstudie stehen die prinzipiell zu unterscheidenden Teilaspekte der Bewertung der (i) Voraufschlussmethodik, der (ii) Substratpotentialbewertung sowie der (iii) Enzyymbewertung.



(i) Voraufschlussmethodik

Zur Bewertung der Voraufschlussmethodik wurde BM4 mit den unterschiedlichen Methoden QZ, SE und AFEX vorbehandelt. Das Versuchsdesign beinhaltete

- BM4 vorbehandelt mit Querstromzerspannung
- BM4 vorbehandelt mit steam explosion
- BM4 vorbehandelt mit ammonia fibre expansion
- BM4 unbehandelt, Kontrolle

Die Bewertung erfolgte an Hand zweier Enzympräparate

- Enzym 1 (Biopract Cellulase 1)
- Enzym 2 (Cellic CTec2)

Um eine bessere Aussagekraft der einzelnen Voraufschlussmethoden zu erreichen, wurden die Enzyme in zwei verschiedenen Konzentrationsstufen eingesetzt und der Aufschlussverfolg entsprechend bewertet. Zur Bewertung der Voraufschlussmethodik wurden der enzymatischen Hydrolyse Enzymmengen anteilig zur TS der Substrate zugesetzt (1% TS, 10 % TS) (w/w).

(ii) Substratpotentialbewertung

Zur Bewertung der Substratpotentiale wurden alle BM mit dem aus (i) als effizienteste Vorbehandlungsmethode definierten Aufschlussverfahren behandelt. Zur Bewertung der Substratpotentialbewertung wurden der enzymatischen Hydrolyse Enzymmengen anteilig zur TS der Substrate zugesetzt (1% TS, 10 % TS) (w/w).

(iii) Enzymbewertung

Verschiedene Enzyme werden spezifisch ihrer cellulolytischen Potentiale auf die BM angewandt. Zur Bewertung der Enzymaktivität wurden die Enzymmengen anteilig zur im Substrat vorhandenen Cellulose zugegeben (3% Cellulose) (w/w).

- Enzym 1 Biopract Cellulase 1
- Enzym 2 Cellic CTec2
- Enzym 3 Biopract Cellulase 2
- Enzym 4 SigmaAldrich C1794-5KU
- Enzym 5 SigmaAldrich C0615-1G
- Enzym 6 SigmaAldrich 22178-1006

In AP 4 wurden die Enzyme entsprechend ihrer spezifischen Aktivität eingesetzt. Dafür wurde in Vorversuchen die enzymatische Aktivität bestimmt. Als Grundlage dient die Betrachtung der aus standardisierter Cellulose frei gewordenen Glucose über einen definierten Zeitraum. Die Einheit U steht für eine definierte Enzymmenge, welche benötigt wird, um ein μmol Cellulose in einem Zeitraum von 60 Sekunden zu Glucose umzuwandeln (37°C , pH 5,0).

Zur bioökonomischen Betrachtung wurde der Anschaffungspreis nach handelsüblichem Listenpreis berücksichtigt. Auf Grund der firmeninternen Herstellung von Enzym 1 und Enzym 3, war kein handelsüblicher Listenpreis definierbar. Entsprechend wurde hier der Listenpreis von Enzym 2 als Basis angenommen.

9.3.2 Versuchsdurchführung

Die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse erfolgte in getrennten Versuchsreaktoren, welche mittels beheizbarer Wasserbäder (esnatec, R8-Monitoring, Deutschland) konstant auf $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ temperiert wurden. Jedem Versuchsreaktor wurde eine Substratmenge von 10 g TS zugegeben. Unter Berücksichtigung der individuellen BM wurde destilliertes Wasser (H_2O bidest) zugegeben, um eine gesamte TS von 10,0 % zu erhalten. Dem Versuchsreaktor wurde anschließend Enzym zugesetzt im Mengenverhältnis von (w/w) 1 % TS, 10 % TS (ii), 3 % Cellulose (iii) oder auf die spezifische Enzymaktivität von 2,5 U / g Cellulose.

Zur Gewährleistung der optimalen Enzymaktivität wurde der pH-Wert in den Reaktoren auf $5,0 \pm 0,05$ eingestellt durch Zugabe von H_2SO_4 (50%). Anschließend wurde das Gesamtgewicht der im Reaktor befindlichen Substanzen ermittelt.

Die Reaktoren wurden mit einer PVC-Abdeckung versehen und über den gesamten Versuchszeitraum konstant durchmischt (100 U/Min). Zur Probenahme wurden die Reaktoren aus dem Wasserbad genommen und der Inhalt erneut gravimetrisch bestimmt. Wasserverluste wurden mit H_2O bidest



aufgefüllt und der Inhalt erneut durchmischt. Die Probenahmezeitpunkte lagen bei 24h, 48h, 72h und (optional) 96h. Bei jeder Probennahme wurden 2 ml des flüssigen Reaktorinhalts entnommen und mittels eines Spritzenfilters filtriert. 0,5 ml des gefilterten Reaktorinhalts wurden zur anschließenden Versuchsauswertung in HPLC-vials gefüllt, verschlossen und bis zur Analyse bei -18°C gelagert.

9.3.3 Versuchsauswertung

Zur Bewertung der Aufschlussraten wurden die gefilterten Reaktorinhalte mittels HPLC (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex, Torrance, USA) auf die entstandenen Mono- bzw. Disaccharide hin analysiert. Dafür wurden Standardlösungen der zu bestimmenden Komponenten eingesetzt und die Saccharidkonzentrationen von Arabinose, Cellobiose, Glucose und Xylose detektiert. Zusätzlich wurde Essigsäure und Ethanolkonzentrationen in den Reaktorhydrolysaten überprüft, um Aussagen über mögliche Kontaminationen treffen zu können.

Zur Bestimmung der Konversionsraten wurden die in der Probe gelösten Anteile an Cellobiose und Glucose auf die anfänglich vorhandene Menge an Cellulose sowie die gelösten Anteile an Arabinose und Xylose auf die anfänglich vorhandene Menge an Hemicellulose bezogen. Dafür wurde folgende Formel verwendet

$$\text{Konversion}_{\text{Cellulose}} = \frac{(c_{\text{Glucose}} + c_{\text{Cellobiose}})}{c_{\text{Cellulose start}}} \times 100 \text{ [%]}$$

$$\text{Konversion}_{\text{Hemicellulose}} = \frac{(c_{\text{Xylose}} + c_{\text{Arabinose}})}{c_{\text{Hemicellulose start}}} \times 100 \text{ [%]}$$

$$\text{Konversion}_{\text{Gesamt}} = \frac{(c_{\text{Glucose}} + c_{\text{Cellobiose}} + c_{\text{Xylose}} + c_{\text{Arabinose}})}{(c_{\text{Cellulose start}} + c_{\text{Hemicellulose start}})} \times 100 \text{ [%]}$$

c = Konzentration in g/L

9.3.4 Statistische Bewertung

Zur Bewertung statistischer Unterschiede wurde eine einfaktorier ANOVA, unter Berücksichtigung der Parameter Normalverteilung (Shapiro-Wilk) und Varianzhomogenität (Levene), mit Post-Hoc Test Tukey-HSD verwendet. Das Konfidenzintervall wurde mit 95% festgelegt. Statistik und Boxplot Diagramme wurden mit dem Softwareprogramm SPSS (IBM, SPSS Statistics, Version 24.0.0.0) erstellt.

10. Ergebnisse

10.1 AP 1 Substrathomogenisierung und -charakterisierung

Die sechs Blühpflanzenmischungen zeigten unterschiedliche Zusammensetzungen anhand der analysierten Parametern der Substratcharakterisierung (Tabelle 1). Die TS-Werte der Blühpflanzenmischungen variierten von 24,43 – 37,06 %. Der auf die TS bezogene oTS-Anteil lag dabei zwischen 86,97 – 92,55 %. Die Analyse von Cellulose, Hemicellulose und Lignin deutete auf eine unterschiedliche Faserzusammensetzung der einzelnen Blühpflanzenmischungen hin. Der Celluloseanteil der TS zeigte Werte zwischen 20,11 – 28,24 %. Der Hemicelluloseanteil variierte zwischen 11,54 – 16,59 %. Der Gesamtligninanteil lag zwischen 25,52 – 32,17 %.

Tabelle 1 Substratcharakterisierung

		BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6
TS	[%FM]	28,98 ± 0,77	33,09 ± 3,70	24,43 ± 0,58	29,14 ± 0,50	23,51 ± 1,19	37,06 ± 2,70
oTS	[%TS]	89,44 ± 1,59	92,33 ± 0,70	88,02 ± 1,14	90,14 ± 0,31	86,97 ± 2,31	92,55 ± 0,20
Ash	[%TS]	10,56 ± 1,59	7,67 ± 0,70	11,98 ± 1,14	9,86 ± 0,31	13,03 ± 2,31	7,45 ± 0,20
AIR	[%TS]	22,26 ± 0,98	24,63 ± 0,47	21,76 ± 0,30	27,60 ± 1,02	24,38 ± 0,65	31,48 ± 7,34
AIL	[%TS]	23,99 ± 0,87	25,64 ± 0,50	23,01 ± 0,70	29,34 ± 0,89	26,20 ± 0,75	30,68 ± 4,23
ASL	[%TS]	1,52 ± 0,08	1,84 ± 0,46	2,52 ± 0,02	2,04 ± 0,16	1,83 ± 0,04	1,49 ± 0,11
Lignin total	[%TS]	25,52 ± 0,79	27,48 ± 0,17	25,53 ± 0,72	31,38 ± 0,73	28,03 ± 0,78	32,17 ± 4,34
Cellulose	[%TS]	27,01 ± 1,84	26,33 ± 2,14	23,85 ± 2,94	20,11 ± 1,08	25,91 ± 0,72	28,24 ± 2,94
Hemicellulose	[%TS]	15,04 ± 0,76	14,60 ± 0,85	16,16 ± 2,34	11,54 ± 0,55	16,50 ± 1,17	16,59 ± 2,61

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung, AIL = acid insoluble lignin, AIR = acid insoluble residues, ASL = acid soluble lignin, BM = Blühpflanzenmischung, FM = Frischmasse, Lignin total = AIL + ASL, oTS = organische Trockensubstanz, TS = Trockensubstanz

10.2 AP 2 Etablierung der substratspezifischen Vorbehandlungsmethodik

Die Blühpflanzenmischung BM4 bestand aus einer Zusammensetzung von 50 Taxa und wurde als diverseste Blühpflanzenmischung definiert (Artenzusammensetzung siehe Anhang Tabelle A1). BM 4 wurde mittels der drei Vorbehandlungsmethoden QZ, SE und AFEX bearbeitet um exemplarisch für eine ideale Vorbehandlungsmethodik für Blühpflanzenmischungen zu stehen. Zur Detektion des Aufschlussersfolgs wurde eine umfangreiche HPLC-Analyse angewandt. Durch den direkten Vergleich der Vorbehandlungsmethoden, wurde die höchste Aufschlussrate ermittelt und daraus eine vorzügliche Variante abgeleitet.

(i) Querstromzerspannung (QZ)

Um die Querstromzerspannung auf ein optimales Aufschlussverfahren auszurichten, wurde BM 4 entsprechend der verschiedenen Parametern bearbeitet. Nach den Voruntersuchungen ergab sich als optimale Einstellung eine Bearbeitung der Substrate im gefrorenen Zustand mit Rotorgeschwindigkeit 6 (ca. 6.000 U/Min) für zehn Sekunden im Rechtslauf (Schnitt), 40 Sekunden im Linkslauf (Schlag) und erneut 20 Sekunden im Rechtslauf (Schnitt) (Abbildung 1). Zur Bewertung der Effektivität der Vorbehandlungsmethode QZ wurden verschiedene Versuchsansätze enzymatisch hydrolysiert und mittels HPLC analysiert. Die vergleichende Darstellung erfolgt in (ii) und (iii).

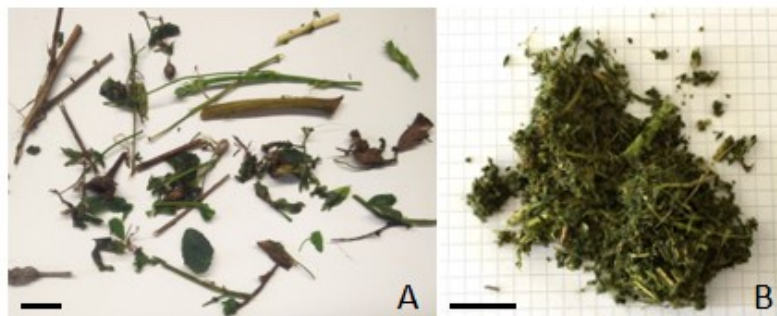


Abbildung 1 Blühpflanzenmischung BM4 vor (A) und nach (B) der durchgeführten Querstromzerspannung unter optimalen Parametern, Maßbalken 20 mm.

(ii) steam explosion (SE)

Zur Bewertung der Effektivität der Vorbehandlungsmethode SE wurden verschiedene Versuchsansätze enzymatisch hydrolysiert und mittels HPLC analysiert. In diesem Versuchslauf wurde BM4 als unbehandelter Variante (control), mit Vorbehandlungsmethode QZ, sowie Vorbehandlungsmethoden SE eingesetzt. Da sich die Querstromzerspannung als Vorteilhaft erwies, wurde diese ergänzend zur steam explosion durchgeführt. Entsprechend wird die



Vorbehandlungsmethodik SE durch QZ ergänzt. Weizenstroh (Stroh) wurde zusätzlich als methodische Referenz verwendet. Den Einzelansätzen wurden zwei verschiedene Enzym (Enzym 1, Enzym 2) in unterschiedlichen Konzentrationen (1%TS, 10%TS; w/w) zugegeben. Die Ergebnisdarstellung zeigt den Zeitpunkt nach 24h enzymatischer Hydrolyse.

Nach 24h Versuchslaufzeit zeigte sich ein differenziertes Bild zwischen den beiden eingesetzten Substraten Stroh und BM4 (Abbildung 1). Bei Stroh zeigte die Vorbehandlungsmethode SE eine deutliche Steigerung der gelösten Kohlenhydrate gegenüber dem Versuchsansatz QZ ohne steam explosion. Während in der Vorbehandlungsvariante QZ die Gesamtmenge an Kohlenhydraten bei Variante Enzym 1 10%TS einen Wert von 0,31 g/L erreichte, lag die höchste Gesamtmenge an Kohlenhydraten der Vorbehandlungsvariante SE bei 30,94 g/l (Enzym 2 10%TS). Für das Substrat Stroh zeigte sich dadurch die Vorteilhaftigkeit der Vorbehandlungsmethodik steam explosion uneingeschränkt.

Bei Betrachtung der einzelnen Vorbehandlungsmethoden des Substrats BM4 zeigt sich bei der Kontrollvariante control eine vorhandene Gesamtmenge an Kohlenhydraten von 5,76 g/L (Enzym 1, 1%TS) und 4,91 g/L (Enzym 2, 1%TS) während bei Zugabe der zehnfachen Dosis an Enzymmenge eine Gesamtmenge an Kohlenhydraten von 14,60 g/L (Enzym 1) und 11,91 g/L (Enzym 2) erreicht wurde. Dies belegt, dass gegenüber dem Referenzmaterial Stroh ein einfacheres Lösen der in Cellulose und Hemicellulose vorhandenen Kohlenhydrate in BM4 stattfand.

Im Vergleich der control Variante mit Variante QZ, zeigt sich eine Steigerung der gesamt gelösten Kohlenhydrate von 2,53 % (Enzym 1, 10%TS) bis 162,90 % (Enzym 2, 1%TS). Entsprechend konnte durch die Vorbehandlungsmethode QZ in allen Variationen eine Steigerung erreicht werden. Die Steigerungen waren v.a. bei der Enzymzugabe von 1% TS mit 104,69 % (Enzym 1) und 162,90 % (Enzym 2) feststellbar. Entsprechend dieses Ergebnisses wurden für die folgenden Vorbehandlungsmethoden die Vorbehandlungsmethode QZ standardmäßig zusätzlich zu AFEX und SE eingeführt.

Beim Vergleich der Vorbehandlungsvariante SE mit der Kontrollvariante control zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der Gesamtmengen an Kohlenhydraten in den Varianten mit 1% TS Enzymzugabe. Dabei lagen die Gesamtwerte um 45,92% (Enzym 1) bzw. 89,60% (Enzym 2) höher gegenüber der Variante control. Somit konnte durch die Vorbehandlungsmethode steam explosion eine Steigerung der gelösten Kohlenhydrate erreicht werden. Da die Gesamtmenge an Kohlenhydraten jedoch um 22,89 – 28,71% geringer ausfielen gegenüber der Vorbehandlungsmethode QZ, zeigte sich eine Nachteilhaftigkeit der Vorbehandlungsmethode steam explosion bei der Blühpflanzenmischung BM4. Entsprechend ließ sich an Hand der Versuchsauswertung keine Empfehlung des Einsatzes einer steam explosion für Blühpflanzenmischungen ableiten.

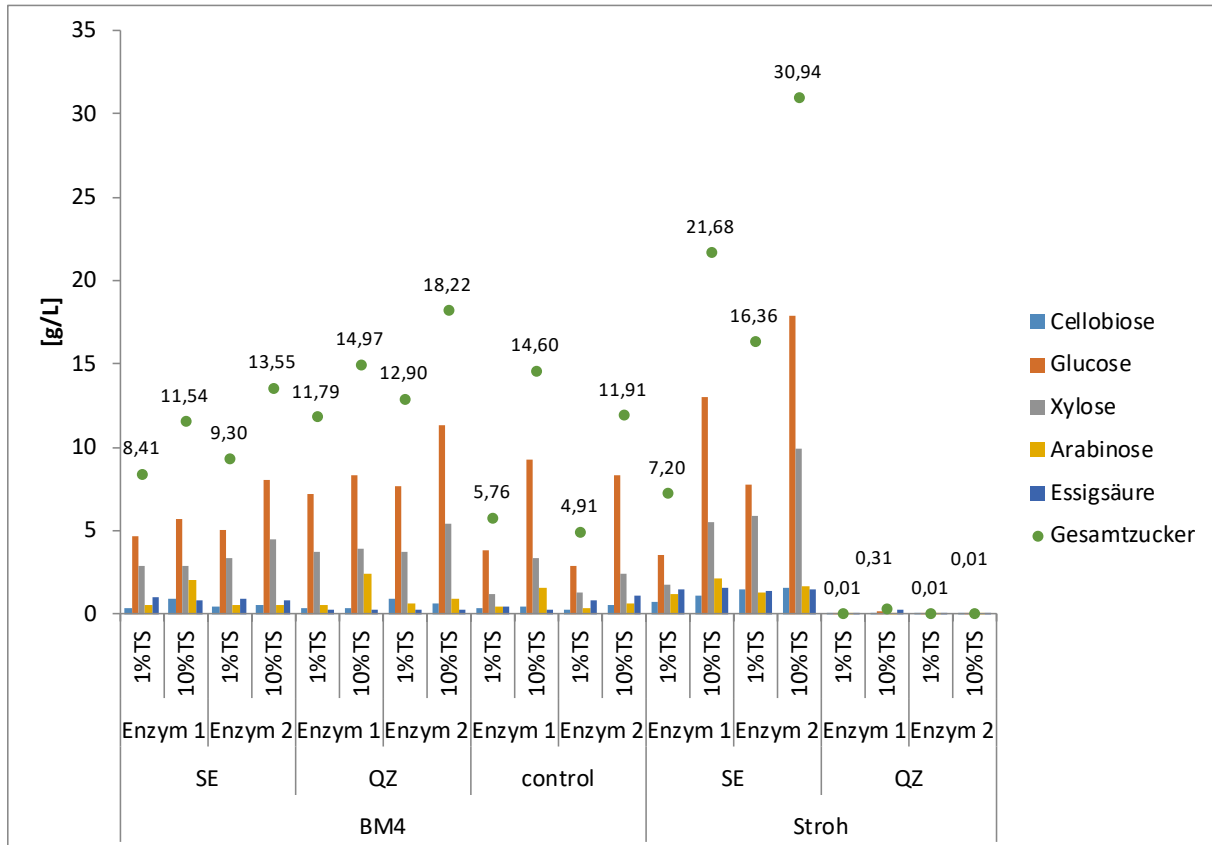


Abbildung 2 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse nach 24h von unbehandelter (control), mit Querstromzerspanung vorbehandelter (QZ) und mit steam explosion (SE) vorbehandelter Blühpflanzenmischung BM4 und Weizenstroh unter Verwendung zweier unterschiedlicher Enzymkonzentrationen (w/w)

(iii) ammonia fibre expansion (AFEX)

Zur Bewertung der Effektivität der Vorbehandlungsmethode AFEX wurden verschiedene Versuchsansätze enzymatisch hydrolysiert und mittels HPLC analysiert. In diesem Versuchslauf wurde die Blühpflanzenmischung BM4 mit der Vorbehandlungsmethode AFEX bearbeitet und vergleichend mit den Vorbehandlungsmethoden QZ und SE untersucht und dargestellt (Abbildung 3). Den Einzelansätzen wurden zwei verschiedene Enzym (Enzym 1, Enzym 2) in unterschiedlichen Konzentrationen (1%TS, 10%TS; w/w) zugegeben. Durch Ermittlung der Gesamtzuckerkonzentrationen, konnte die Effektivität der drei Vorbehandlungsmethoden direkt miteinander verglichen werden.

Nach 24h Versuchslaufzeit zeigte sich die höchste Gesamtzuckerkonzentration bei Vorbehandlungsmethode AFEX (Enzym 2, 10% TS) mit 32,24 g/L. Dieser Wert lag um je 77,0% und 137,9% höher gegenüber den Vorbehandlungsmethoden QZ und SE mit gleichem Enzymeinsatz. Auch die Gesamtzuckerkonzentration der Vorbehandlungsmethode AFEX (Enzym 1, 10% TS) lag mit 23,83 g/L um je 59,2% und 106,5% höher gegenüber der erreichten Gesamtzuckerkonzentration der Vorbehandlungsmethoden QZ und SE. Bei Verwendung der Enzymkonzentration 1% TS zeigten sich bei Enzym 1 und Enzym 2 Gesamtzuckergerhalte von je 13,23 g/L und 16,13 g/L. Diese waren um je 12,2 % und 25,1 % höher gegenüber der Vorbehandlungsmethode QZ sowie um 57,4 % und 73,4% höher gegenüber der Vorbehandlungsmethode SE.

Somit wurden höhere Gesamtzuckergerhalte in allen Versuchsansätzen mit Vorbehandlungsmethode AFEX bei BM4 im Vergleich zu den Vorbehandlungsmethoden QZ und SE festgestellt. Es zeigte sich zudem, dass bei zehnfacher Enzymzugabe ein erhöhter Gesamtzuckergerhalt vorlag, dieser jedoch nicht der zehnfachen Menge der Gesamtzuckergerhalte bei 1% TS (w/w) Enzymdosage entsprach.

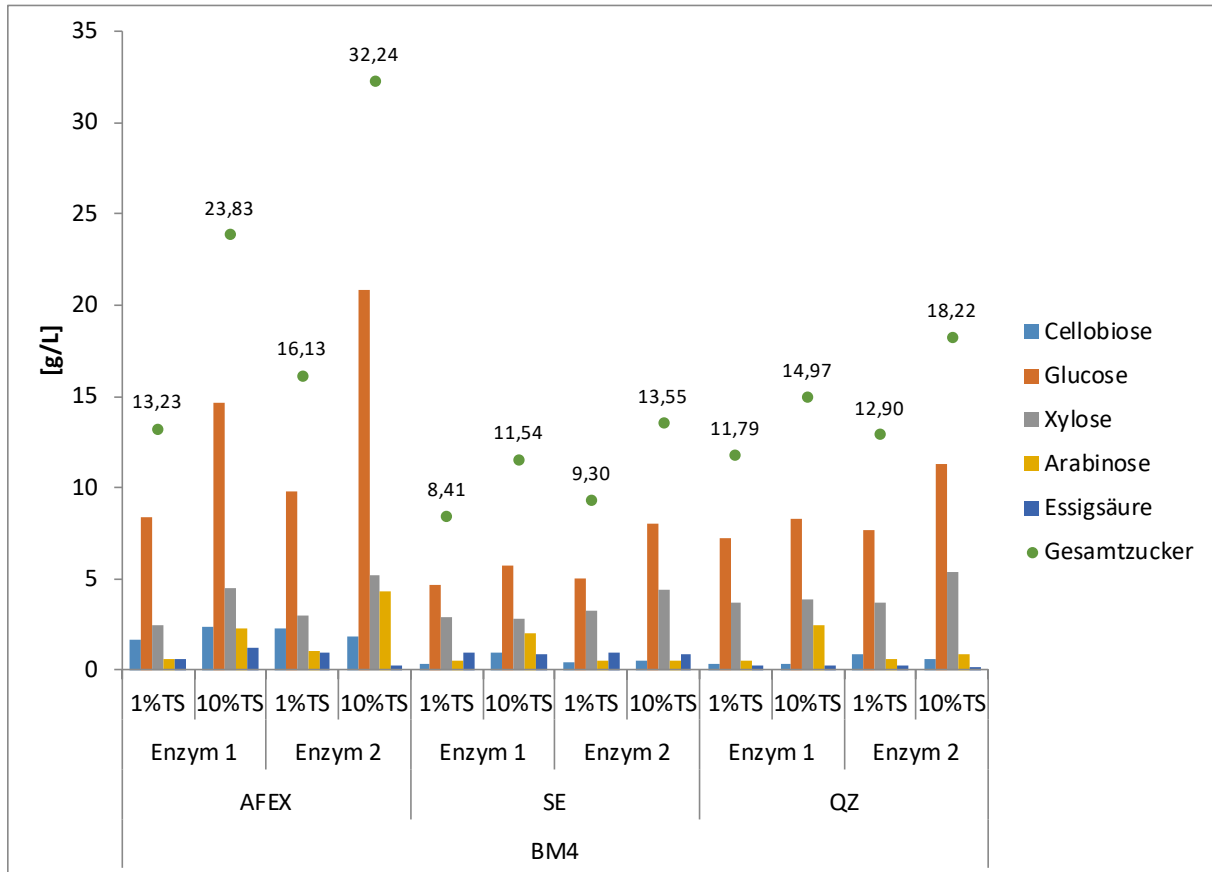


Abbildung 3 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von Blühpflanzenmischung BM4 nach 24h mit den Vorbehandlungsmethoden Querstromzerspannung (QZ), steam explosion (SE) und ammonia fibre expansion (AFEX) unter Verwendung zweier unterschiedlicher Enzymkonzentrationen (w/w)

Konversionsraten

Bei der Betrachtung der Gesamtkonversionsraten der in AP2 untersuchten Substrate, unter substratspezifischer Verwendung von 1% TS (w/w) Enzym, zeigte die Vorbehandlungsmethode AFEX die höchsten Gesamtkonversionsraten von 37, % (Enzym 1) und 45,87 % (Enzym 2) (Tabelle 2) im Vergleich zu allen weiteren Vorbehandlungsmethoden. Die Vorbehandlungsmethode SE zeigte zudem geringere Konversionsraten im Vergleich zur Vorbehandlungsmethode QZ. Dies deutet darauf hin, dass die Vorbehandlungsmethode SE zu Ausbeuteverlusten führt. Die Kontrollvariante control zeigte mit 13,95 % (Enzym 2) und 16,38 % (Enzym 1) die geringsten Gesamtkonversionsraten innerhalb der Blühpflanzenmischung BM4.

Im Vergleich von vorbehandelter Blühpflanzenmischung BM4 mit dem Referenzmaterial Stroh wird ersichtlich, dass nach 24 h Versuchslaufzeit, eine höhere Konversionsrate mit der Blühpflanzenmischung BM4 erzielt werden konnte. Innerhalb des Referenzmaterials Stroh ist die Vorbehandlungsmethode SE, auf Grund der höheren Gesamtkonversionsraten, zu empfehlen.

Damit zeigte sich die Vorbehandlungsmethode AFEX als die effizienteste Aufschlussmethode bezüglich der Blühpflanzenmischung BM4.

Tabelle 2 Konversionsraten der Blühpflanzenmischung BM4 und Referenzmaterial Weizenstroh (Stroh) nach Bearbeitung durch drei Vorbehandlungsmethoden Querstromzerspanung (QZ), steam explosion (SE) und ammonia fibre expansion (AFEX). Die Kontrollvariante (control) wurde nicht vorbehandelt. Dargestellt sind die Ergebnisse der substratspezifischen Enzymzugabe von 1 TS (w/w) nach 24 h Versuchslaufzeit

Substrat	Vorbehandlungsmethode	Enzym	Konversion	Konversion	Konversion Gesamt [%]
			Cellulose [%]	Hemicellulose [%]	
BM4	control	Enzym 1	18,57	12,56	16,38
BM4	control	Enzym 2	14,37	13,22	13,95
BM4	QZ	Enzym 1	33,88	32,91	33,53
BM4	QZ	Enzym 2	38,24	33,93	36,67
BM4	SE	Enzym 1	22,49	26,36	23,90
BM4	SE	Enzym 2	24,57	29,71	26,45
BM4	AFEX	Enzym 1	45,16	24,49	37,62
BM4	AFEX	Enzym 2	54,09	31,55	45,87
Stroh	QZ	Enzym 1	0,01	0,01	0,01
Stroh	QZ	Enzym 2	0,01	0,01	0,01
Stroh	SE	Enzym 1	12,04	12,74	12,31
Stroh	SE	Enzym 2	25,89	31,26	27,98

10.3 AP 3 Vorbehandlung diverser Blühpflanzenmischungen

Zur Bestimmung der höchsten Konversionsraten der sechse Blühpflanzenmischungen BM1 – BM6, wurde zunächst die Vorbehandlungsmethode QZ untersucht (Abbildung 4). Jeder Blühpflanzenmischung wurde eine Enzymmenge von 3% (w/w) des substratspezifischen Celluloseanteils im Versuch zugegeben. In diesem Versuchslauf wurden die nach 24h entstandenen Kohlenhydrate mittels HPLC analysiert. Der Gesamtzuckeranteil wurde aus der Summe der einzelnen Kohlenhydrate ermittelt.

Bei Vorbehandlungsmethode QZ wurde die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen beim Einsatz von Enzym 1 bei BM3 mit 12,84 g/L festgestellt. Beim Einsatz von Enzym 2 zeigte sich erneut der höchste Gesamtzuckeranteil bei Blühpflanzenmischung BM3 mit 15,46 g/L. Beim Einsatz von Enzym 3 zeigte sich die höchste Gesamtzuckerkonzentration von 21,06 g/L ebenfalls bei Blühpflanzenmischung BM3. Im Vergleich der Gesamtzuckerkonzentrationen zwischen BM3 und BM4 zeigt sich, dass die Gesamtzuckerkonzentrationen von BM3 um 25,83% (Enzym1), 31,46% (Enzym2) und 67,28%(Enzym3) höhere Werte erreichten. Entsprechend zeigte sich bei der Vorbehandlungsmethode QZ die Blühpflanzenmischung BM3 mit den höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen.

Zur weiteren Bestimmung des einzusetzenden Enzyms für weitere Vorbehandlungsbestimmungen, wurde mittels statistischer Auswertung auf signifikante Unterschiede zwischen den eingesetzten Enzymen getestet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,18$) bezüglich der Gesamtzuckerkonzentrationen durch den Einsatz unterschiedlicher Enzyme (Abbildung 5). Für die weiteren Bewertungen der Vorbehandlungsmethoden wurde Enzym 2 als Referenzenzym bestimmt und verwendet.

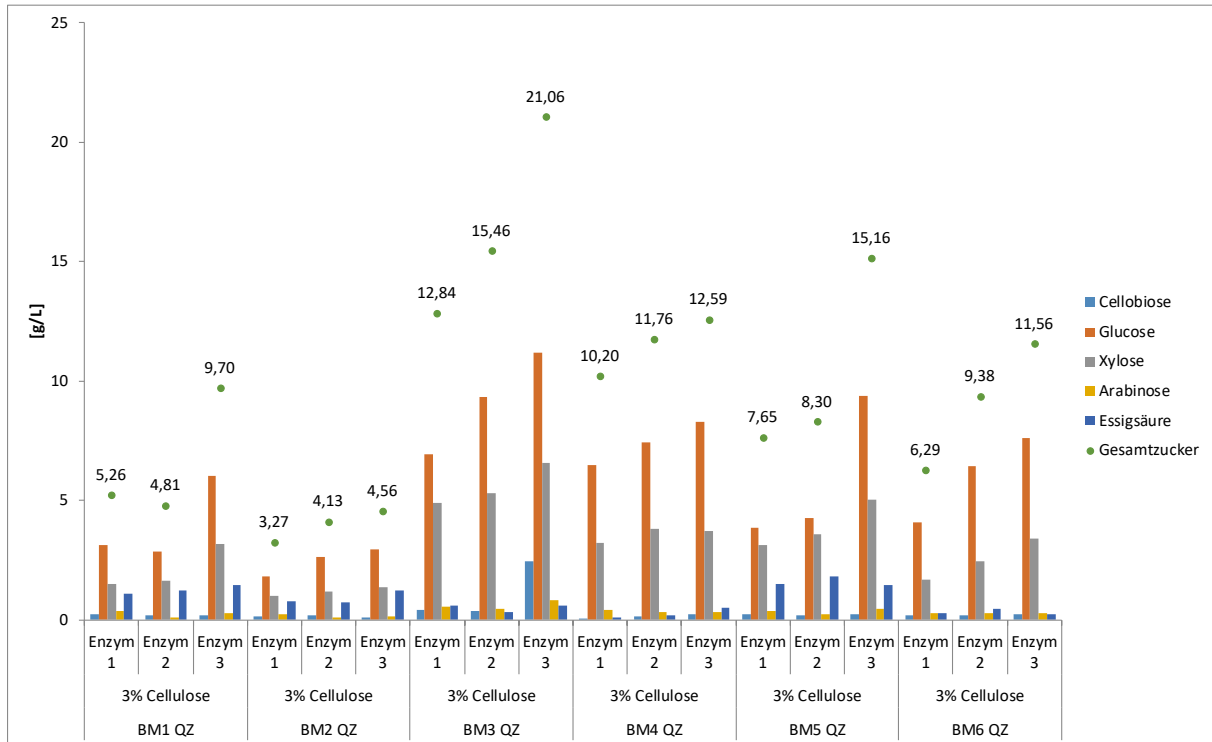


Abbildung 4 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse nach 24h von sechs unterschiedlichen Blühpflanzenmischungen BM1 – BM6. Jede Blühpflanzenmischung wurde mit der Vorbehandlungsmethodik QZ bearbeitet und je drei unterschiedlichen Enzyme 1 – 3 angewendet (w/w).

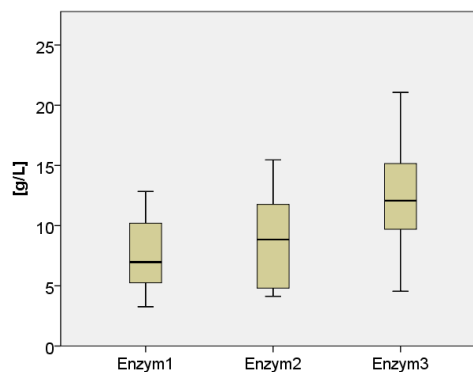


Abbildung 5 Boxplotdarstellung der Gesamtzuckerkonzentrationen nach 24h enzymatischer Hydrolyse bei Verwendung von Enzym1 – Enzym 3 in sechs Blühpflanzenmischungen (BM1 – BM6) nach AP 3.

Die Blühpflanzenmischungen BM1 - BM6 wurden zusätzlich mit den Vorbehandlungsmethoden SE und AFEX bearbeitet (Abbildung 6). Zur enzymatischen Hydrolyse wurde Enzym 2 verwendet. Bei der Vorbehandlungsmethode SE zeigten sich die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen bei BM3 mit 8,87 g/L. Darauf folgend wurden Gesamtzuckerkonzentrationen von 7,78 g/L bei BM5, 6,39 g/L bei BM1 sowie 5,05 g/L bei BM4 ermittelt. Die Blühpflanzenmischungen BM2 und BM6 zeigten mit je 2,92 g/L und 4,51 g/L die geringsten Gesamtzuckerkonzentrationen.

Beim Einsatz der Vorbehandlungsmethode AFEX wurde neben den sechs Blühpflanzenmischungen auch Stroh als Referenzmaterial verwendet. Die höchste Gesamtzuckerkonzentration wurde bei BM3 mit 13,86 g/L ermittelt. In weiterer absteigender Reihenfolge wurden Gesamtzuckerkonzentrationen von 10,65 g/L bei BM5, 10,19 g/L bei BM6, 10,13 g/L bei BM4, 8,69 g/L bei BM2 und 7,27 g/L bei BM1 festgestellt. Das Referenzmaterial Stroh zeigte Gesamtzuckerkonzentrationen von 10,95 g/L. Damit wurde bei der Vorbehandlungsmethode AFEX auf Blühpflanzenmischung BM3 eine höhere Gesamtzuckerkonzentration gegenüber dem Referenzmaterial erreicht.

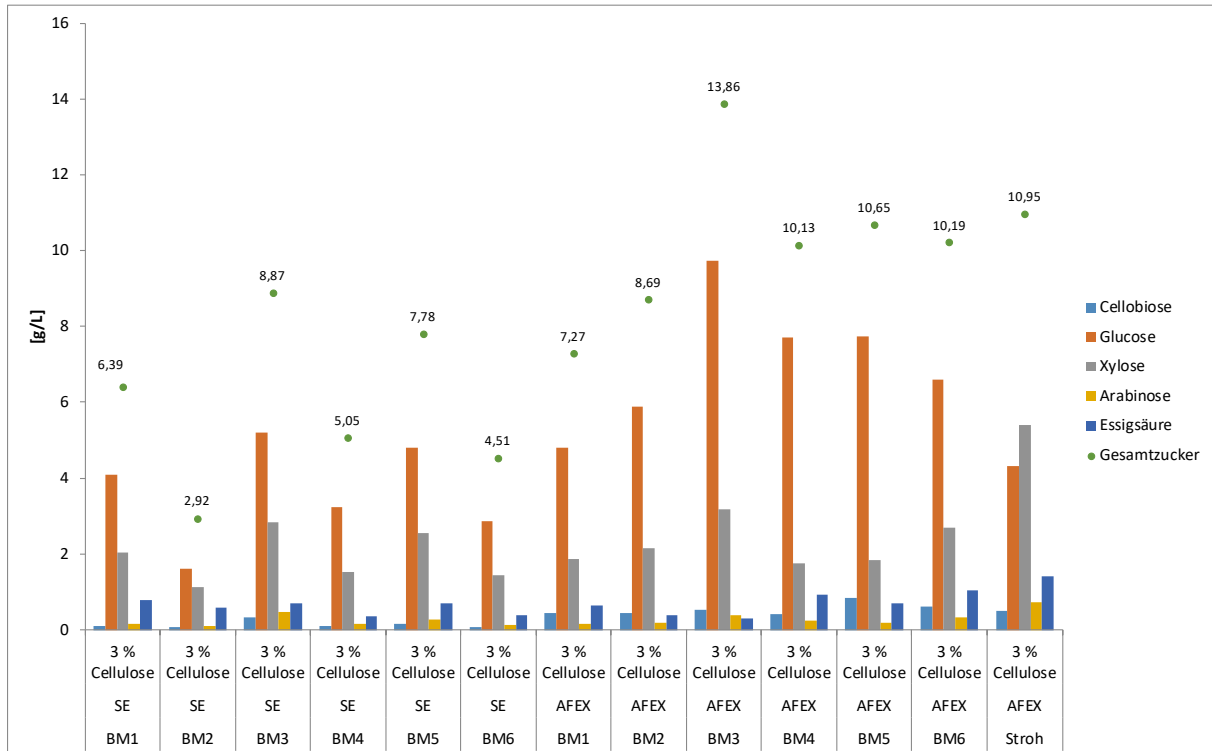


Abbildung 6 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse nach 24h von sechs unterschiedlichen Blühpflanzenmischungen BM1 – BM6. Jede Blühpflanzenmischung wurde mit der Vorbehandlungsmethodik SE und AFEX bearbeitet und Enzym 2 im Verhältnis von 3 % Substratcellulose (w/w) angewendet.

Betrachtet man die erhaltenen Gesamtzuckerkonzentrationen über alle drei Vorbehandlungsmethoden gemittelt, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied ($p \geq 0,07$) zwischen den einzelnen Vorbehandlungsmethoden beim Einsatz von Enzym 2 (Abbildung 7). Bei der Betrachtung der erhaltenen Gesamtzuckerkonzentrationen innerhalb der sechs Blühpflanzenmischungen nach Anwendung der drei Vorbehandlungsmethoden, zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,06$) (Abbildung 8).

Daraus wird ersichtlich, dass eine Pauschalaussage über die Vorzüglichkeit einer spezifischen Vorbehandlungsmethodik auf Blühpflanzenmischungen bei der gravimetrischen Verwendung von Enzymen auf Basis des Celluloseanteils (3% w/w) nicht erfolgen kann. Ebenfalls kann keine Blühpflanzenmischung, ohne Berücksichtigung der spezifischen Vorbehandlungsmethodik, als pauschal vorteilhaft genannt werden. Nur die kombinierte Berücksichtigung der Blühpflanzenmischung in Kombination mit einer vorteilhaften Vorbehandlungsmethodik führt zur substratspezifisch höchsten Gesamtzuckerkonzentration.

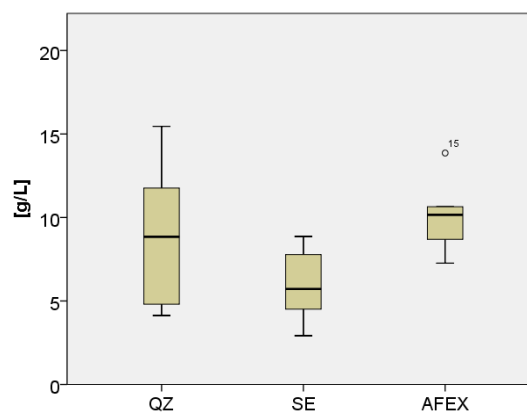


Abbildung 7 Boxplotdarstellung der erhaltenen Gesamtzuckerkonzentrationen von drei Vorbehandlungsmethoden (QZ, SE, AFEX), angewendet auf sechs Blühpflanzenmischungen (BM1 – BM6), nach 24h enzymatischer Hydrolyse unter Verwendung von Enzym 2

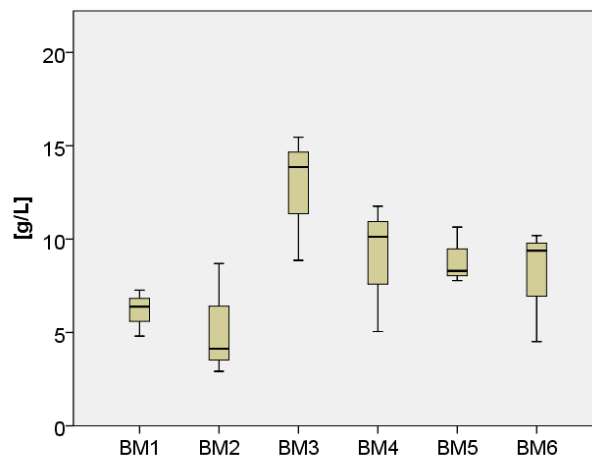


Abbildung 8 Boxplotdarstellung der erhaltenen Gesamtzuckerkonzentrationen von sechs Blühpflanzenmischungen (BM1 – BM6) nach Bearbeitung durch drei verschiedene Vorbehandlungsmethoden (QZ, SE, AFEX) mit 24h enzymatischer Hydrolysezeit unter Verwendung von Enzym 2

10.4 AP 4 Optimierte enzymatische Hydrolyse für Blühpflanzenmischungen

Der Einsatz von sechs unterschiedlichen Cellulasen (Enzym 1 – Enzym 6) wurde auf deren Aufschlusseffizienz bei allen sechs Blühpflanzenmischungen untersucht. Da Enzyme mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten vorlagen, wurde in Vorversuchen die Enzymaktivität detektiert und anschließend Enzymmengen mit gleicher Enzymaktivität eingesetzt. Für die Versuchsdurchführung wurde eine Enzymmenge mit Aktivität von 2,5 U/g Cellulose gewählt.

Bei der Verwendung von Enzym 1 (Abbildung 9) zeigte sich nach 24h Versuchslaufzeit eine Gesamtzuckerkonzentration zwischen 3,63 – 13,31 g/L. Die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen zeigten sich bei Blühpflanzenmischung BM3 mit 13,31g/L, BM4 mit 10,91 g/L, BM6 mit 9,97 g/L, BM1 mit 9,15 g/L und BM5 mit 8,68 g/L. Damit wurde durch den Einsatz von Enzym 1 eine mittlere Gesamtzuckerkonzentration von $9,27 \pm 3,21$ g/L (Mittelwert mit Standardabweichung) erreicht.

Beim Einsatz des cellulolytischen Enzyms 2 lag die Gesamtzuckerkonzentration nach 24h Versuchslaufzeit zwischen 3,84 – 12,56 g/L. Die höchste Gesamtzuckerkonzentration wurde bei Blühpflanzenmischung BM3 erreicht. Die nächst höheren Gesamtzuckerkonzentrationen lagen bei 11,39 g/L (BM5), 10,42 g/L (BM4), 8,62 g/L (BM6) und 5,67 g/L (BM1). Es wurde eine mittlere Gesamtzuckerkonzentration von $8,75 \pm 3,40$ g/L erfasst.

Im Versuchslauf mit Enzym 3 zeigte sich eine Gesamtzuckerkonzentration zwischen 4,28 - 10,31 g/L. Die höchste Gesamtzuckerkonzentration wurde bei Blühpflanzenmischung BM4 erreicht. Die nächst höheren Gesamtzuckerkonzentrationen lagen bei 9,95 g/L (BM3), 8,19 g/L (BM5), 6,23 g/L (BM6) und 5,81 g/L (BM1). Die mittlere Gesamtzuckerkonzentration lag bei $7,46 \pm 2,42$ g/L.

Bei der Verwendung von Enzym 4 (Abbildung 10) zeigten sich nach 24h Versuchslaufzeit Gesamtzuckerkonzentrationen zwischen 5,06 – 11,95 g/L. Die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen wurden erreicht bei BM4 mit 11,95 g/L, BM5 mit 10,46 g/L, BM3 mit 10,13 g/L, BM1 mit 9,33 g/L und BM6 mit 6,97 g/L. Die mittlere Gesamtzuckerkonzentration lag bei $8,98 \pm 2,53$ g/L.

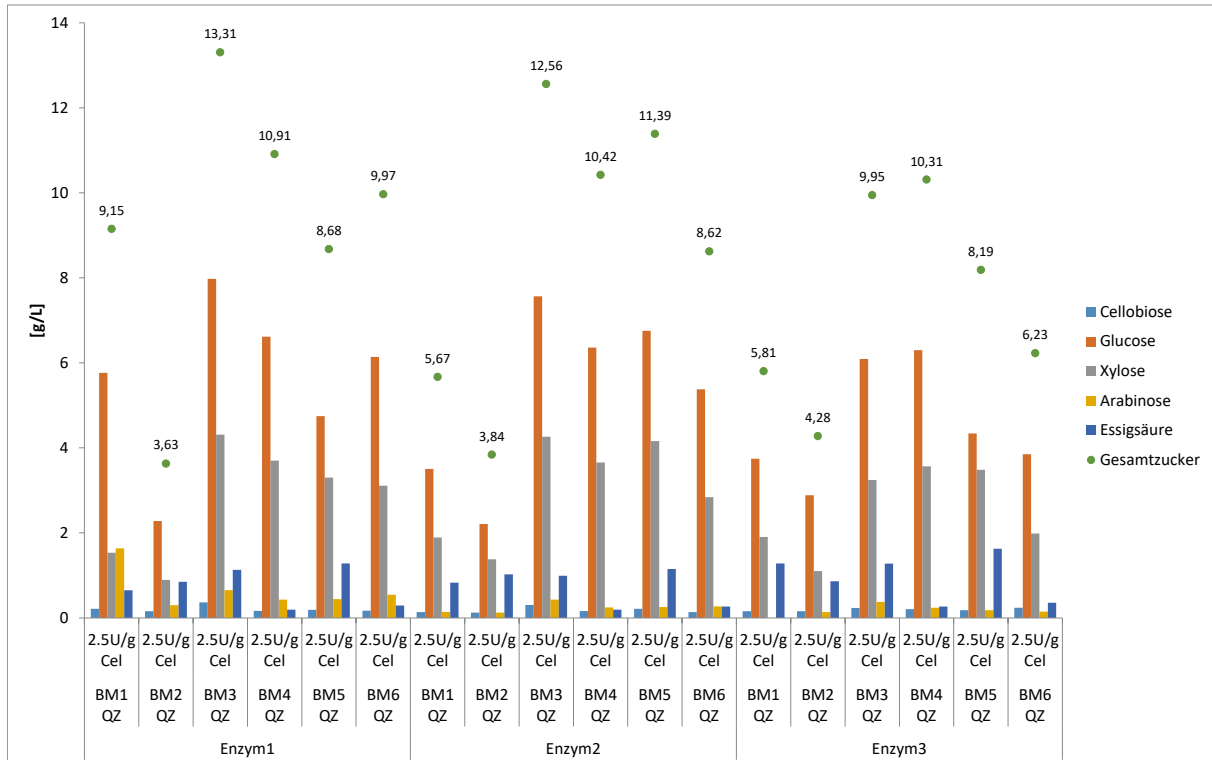


Abbildung 9 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse nach 24h durch cellulolytische Enzyme Enzym 1 – Enzym 3 der sechs unterschiedlichen Blühpflanzenmischungen BM1 – BM6. Die zugesetzte Enzymmenge entsprach der Aktivität 2,5 U/g Cellulose (2.5 U/g Cel). Jede Blühpflanzenmischung wurde mit der Vorbehandlungsmethodik QZ bearbeitet.

Beim Einsatz von Enzym 5 zeigte sich eine Gesamtzuckerkonzentration zwischen 4,85 – 11,61 g/L. Dabei wurde der höchste Wert bei Blühpflanzenmischung BM 5 erreicht. Die nächst höheren Werte wurden erreicht bei BM4 mit 11,10 g/L, BM6 mit 8,83 g/L, BM1 mit 6,93 g/L und BM2 mit 5,14 g/L. Die mittlere Gesamtzuckerkonzentration lag bei $8,07 \pm 2,92$ g/L.

Bei der Betrachtung des Einsatzes von Enzym 6 zeigte sich eine Gesamtzuckerkonzentration zwischen 2,21 – 10,91 g/L. In absteigender Reihenfolge lagen die Gesamtzuckerkonzentrationen bei 10,91 g/L (BM3), 10,28 g/L (BM4), 8,31 g/L (BM5), 6,37 g/L (BM1), 5,60 g/L (BM6) und 2,21 g/L (BM2). Es wurde eine mittlere Gesamtzuckerkonzentration von $7,28 \pm 3,24$ g/L ermittelt.

Durch die Betrachtung der Gesamtzuckerkonzentrationen wurde festgestellt, dass der Einsatz spezifischer Enzyme auf eine spezifische Blühpflanzenmischung zuträglich ist. So konnte die höchste Gesamtzuckerkonzentration bei Blühpflanzenmischung BM1 durch enzymatische Hydrolyse mit Enzym 4 erreicht werden. Blühpflanzenmischung BM2 zeigte die höchste Gesamtzuckerkonzentration beim Einsatz von Enzym 5. Allerdings zeigte sich bei Blühpflanzenmischung BM2 bei fünf der sechs Versuchsläufe die geringsten Gesamtzuckerkonzentrationen im jeweiligen Versuch. Die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen bei Blühpflanzenmischung BM3 wurden beim Einsatz von Enzym 1 erreicht. Deutlich geringer lag hier die erreichte Gesamtzuckerkonzentration bei der Verwendung von Enzym 5. Bei Betrachtung der Blühpflanzenmischung BM4 wurden die höchsten Gesamtzuckerkonzentrationen beim Einsatz von Enzym 4 erreicht. Blühpflanzenmischung BM5 erreicht durch enzymatische Hydrolyse mit Enzym 5 die höchste Gesamtzuckerkonzentration. Die höchste Gesamtzuckerkonzentration bei Blühpflanzenmischung BM6 wurde durch den Einsatz von Enzym 1 erreicht.

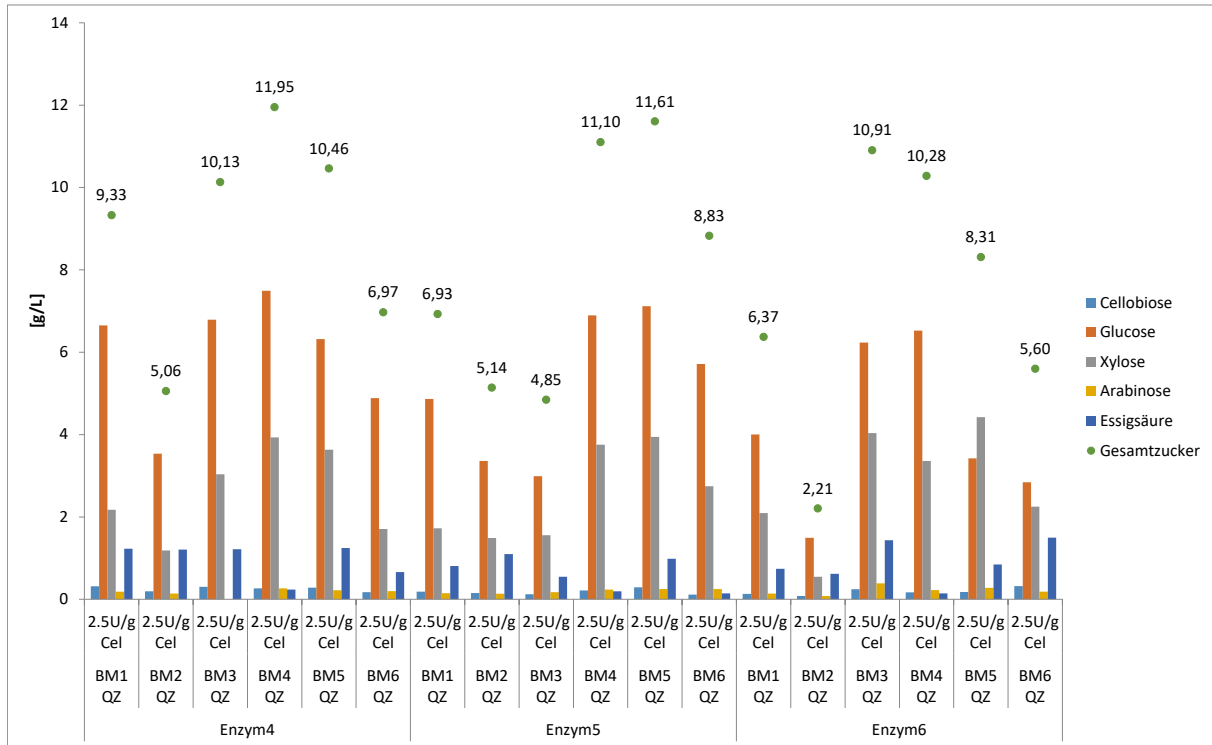


Abbildung 10 Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse nach 24h durch cellulolytische Enzyme Enzym 4 – Enzym 6 der sechs unterschiedlichen Blühpflanzenmischungen BM1 – BM6. Die zugesetzte Enzymmenge entsprach der Aktivität 2,5 U/g Cellulose (2.5 U/g Cel). Jede Blühpflanzenmischung wurde mit der Vorbehandlungsmethodik QZ bearbeitet.

Konversionsraten

Bei der Betrachtung der Gesamtkonversionsraten der in AP 4 untersuchten Blühpflanzenmischungen, zeigten sich unter Berücksichtigung aller sechs Enzyme signifikante Unterschiede (Abbildung 11) nach 24 h Versuchslaufzeit. Die Blühpflanzenmischung BM4 zeigte die signifikant höchsten Gesamtkonversionsraten gegenüber allen fünf weiteren Blühpflanzenmischungen (Median = 30,33 %, $p \leq 0,02$). Die Blühpflanzenmischung BM3 zeigte eine Gesamtkonversionsrate von 23,66 % (Median). Diese zeigte sich signifikant höher gegenüber den Blühpflanzenmischungen BM1, BM2 und BM6 ($p \leq 0,02$). Blühpflanzenmischung BM1, BM2 und BM6 zeigten die geringste Gesamtkonversionsraten.

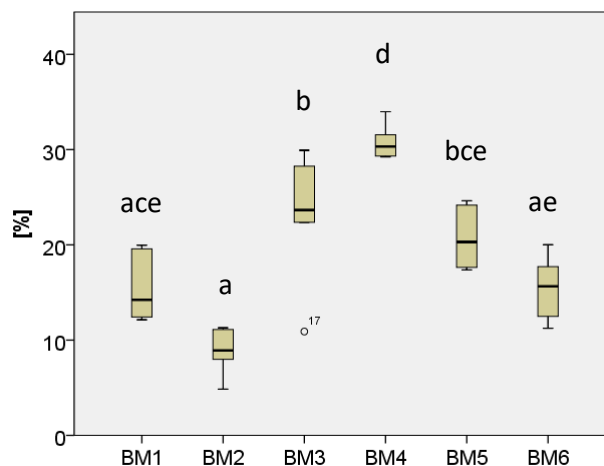


Abbildung 11 Boxplotdarstellung der Gesamtkonversionsraten von sechs Blühpflanzenmischungen (BM1 – BM6) nach 24 h enzymatischer Hydrolyse mit sechs unterschiedlichen Enzymen. Unterschiede in der Buchstabenzuordnung zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$)

10.5 Bioökonomische Betrachtung des Gesamtversuchs

Zur bioökonomischen Betrachtung des Versuchs wurden der Prozessierungsaufwand, die Blühpflanzenmischungen und die Enzymaufwendungen berücksichtigt. In vereinfachter Form lässt sich der Prozessierungsaufwand durch den Einsatz von Geräten und Chemikalien abschätzen (Abbildung 12). Für die Substratvorbehandlung durch die Methode Querstromzerspanung (QZ) wird ein Gerät zur Auffaserung des Substrats benötigt. Die Methode steam explosion (SE) umfasst ein Gerät, welches druckstabil, hitzebeständig, mit Rührvorrichtung und entsprechendem Ablassventil ausgestattet ist. Zusätzlich wird eine hohe Menge an Erwärmungsenergie benötigt. Die Methode ammonia fibre expansion (AFEX) benötigt neben den in der Methode SE aufgelisteten Aufwendungen zusätzlich Chemikalien, welche den Prozessierungsaufwand zusätzlich erhöhen. Betrachtet man den gesamten Prozessierungsaufwand, so ergibt sich eine Zunahme hinsichtlich der Komplexität von Geräteeigenschaften, Energieaufwand und Additiveinsatz von QZ zu SE und weiter zu AFEX.

Unter Berücksichtigung der in AP 3 gewonnenen Erkenntnisse, lässt sich der Einsatz der Methode SE auf Blühpflanzenmischungen aus bioökonomischer Sicht nicht empfehlen. Dies beruht darauf, dass diese Methode gegenüber der Methode QZ geringere Konversionsraten zeigte und zeitlich mit einem erhöhten Prozessierungsaufwand gekoppelt ist. Auch der Einsatz der Methode AFEX führte zu keiner signifikant höheren Konversionsrate gegenüber der Behandlungsmethode QZ. Auf Grund des geringen Prozessierungsaufwands, ist demnach die Vorbehandlungsmethode QZ auf bioökonomischer Basis zu empfehlen.

Vorbehandlungsmethode Prozessierungsaufwand



Abbildung 12 Vereinfachte Darstellung des Prozessierungsaufwands der Vorbehandlungsmethoden. Die Kontrollvariante control umfasst nur eine geringfügige Zerkleinerung des Substrats. Die Methoden Querstromzerspanung (QZ), steam explosion (SE) und ammonia fibre expansion (AFEX) sind mit einem zunehmenden Prozessierungsaufwand verbunden

Aus bioökonomischer Sicht ist der Einsatz einer Blühpflanzenmischung mit hoher Konvertierbarkeit empfehlenswert. Erst so wird eine möglichst hohe Bereitstellung von Kohlenhydraten für eine anschließende Fermentation gewährleistet. Aus den Erkenntnissen aus AP 4 wurde die Vorzüglichkeit der Blühpflanzenmischung BM 4 ersichtlich. Diese zeigte bei der Verwendung aller Enzyme die durchschnittlich höchsten Konversionsraten. Des Weiteren wurden hohe Konversionsraten bei einzelnen Blühpflanzenmischungen erreicht, wenn spezifische Enzyme verwendet wurden z.B. BM 3 mit Enzym 1 und BM 5 mit Enzym 5.

Berücksichtigt man zusätzlich die Aufwendungen, welche für die enzymatische Hydrolyse benötigt werden, so zeigt sich eine gestaffelte Reihe der einzelnen Enzyme. Bewertet man die in AP 4 verwendeten Enzymmengen, welche auf Basis der zuvor definierten Enzymaktivität beruht, so staffelt sich deren Anschaffungspreis wie folgt

Enzym 3 * > Enzym 2 > Enzym 1 * > Enzym 6 > Enzym 5 > Enzym 4

* angenommene Listenpreise

Die verwendeten Enzymmengen Enzym 1, Enzym 2, Enzym 3 und Enzym 6 lagen bei Anschaffungspreisen von max. 3,14 € / g Enzym. Entscheidend höher lagen die Anschaffungspreise von Enzym 5 und Enzym 4 (≥ 224 € / g Enzym). Entsprechend ist der Einsatz der Enzyme Enzym 5 und Enzym 4 mit deutlich höheren Kosten verbunden. Aus bioökonomischer Sicht sind der Einsatz von Enzym 3, Enzym 2, Enzym 1 und Enzym 6 zu empfehlen.



Quellenangaben

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. J., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861
- Bals, B., Rogers, C., Jin, M., Balan, V., & Dale, B. (2010). Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 1.
- Brückner, C., & Sawatzki, T. (2011) Effizienzsteigerung in Biogasanlagen. Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie LfULG.
- Bundesregierung (2016). Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie. Neuauflage 2016 (Stand: 01.10. 2016, Kabinettsbeschluss 11.01. 2017).
- Camargo, D., & Sene, L. (2014). Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(2), 87-93.
- Gerlach, F., Grieb, B., & Zerger, U. (2014). Nachhaltige Biogaserzeugung Sustaingas - Ein Handbuch für Biolandwirte. Forschung im Biologischen Landbau FiBL
- Naumann, C., Bassler, R., Seibold, R. & Barth, C., 1976. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln - Methodenbuch. Band III. Darmstadt: VDLUFA.
- NREL, 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden Colorado USA: NREL (National Renewable Energy Laboratory).
- Schläfle, S., Tervahartiala, T., Senn, T., & Kölling-Paternoga, R. (2017a). Quantitative and visual analysis of enzymatic lignocellulose degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 42-49.
- Vaithanomsat, P., Chuichulcherm, S., & Apiwatanapiwat, W. (2009, January). Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment. In *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology* (Vol. 37, pp. 140-143).

Anhang

Tabelle A1 Artensatzumsetzung der Blühpflanzenmischungen (BM)

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6
Balkenblumenmischung	Tübinger Mischung	Blumenwiese süddeutsches Bergland	Blühende Landschaft Süd	Velbschächterer Blumenwiese	Waldblumenmischung
1. <i>Agrostemma githago</i> L.	<i>Aethnum graveolens</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Centaurea cyanus</i> L.
2. <i>Antennaria arvensis</i> L.	<i>Barago officinalis</i> L.	<i>Campanula glomerata</i> L.	<i>Centaurea cyanus</i> L.	<i>Centaurea cyanus</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
3. <i>Calendula officinalis</i> L. 'Single Orange Wild'	<i>Calendula officinalis</i> L. 'Pacific Beauty mixed'	<i>Campanula patula</i> L.	<i>Campanula patula</i> L.	<i>Campanula patula</i> L.	<i>Campanula patula</i> L.
4. <i>Cyanus segetum</i> (syn. <i>Centaurea cyanus hillii</i>)	<i>Cyanus segetum</i> (syn. <i>Centaurea cyanus hillii</i>)	<i>Carum carvi</i> L.	<i>Cyanus segetum hillii</i> (syn. <i>Centaurea cyanus</i> L.)	<i>Cyanus segetum hillii</i> (syn. <i>Centaurea cyanus</i> L.)	<i>Cyanus segetum hillii</i> (syn. <i>Centaurea cyanus</i> L.)
5. <i>Cleobianis segetum</i> (L.) Hahn. (syn. <i>Chrysanthemum segetum</i> L.)	<i>Corandrum sativum</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
6. <i>Consolida regalis</i> Gray	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
7. <i>Echium punctatum</i> L.	<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
8. <i>Echium vulgare</i> L.	<i>Nigella arvensis</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
9. <i>Lechydactylus</i> Gdn.	<i>Nigella arvensis</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
10. <i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Raphanus sativus</i> L. 'Dazopp'	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
11. <i>Matricaria chamomilla</i> L. (syn. <i>Matricaria recutita</i> L.)	<i>Snapis arvensis</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
12. <i>Mysarris arvensis</i> (L.) Hill		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
13. <i>Papaver rhoeas</i> L.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
14. <i>Papaver rhoeas</i> L.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
15. <i>Reseda lutea</i> L.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
16. <i>Silene armeria</i> L.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
17. <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Gortke		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
18. <i>Trifolium campestre</i> Schreb.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
19. <i>Trifolium pratense</i> L.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
20. <i>Viola arvensis</i> Murray		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
21.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
22.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
23.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
24.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
25.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
26.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
27.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
28.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
29.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
30.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
31.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
32.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
33.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
34.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
35.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
36.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
37.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
38.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
39.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
40.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
41.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
42.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
43.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
44.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
45.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
46.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
47.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
48.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
49.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
50.		<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.



11. Nutzen, insbesondere praktische Verwertbarkeit der Ergebnisse u Erfahrungen;

Die Konzeptstudie zielte darauf ab, die Umsetzbarkeit von hochdiversen Blühpflanzenmischungen für die Gewinnung von technischem Bioethanol zu untersuchen. Die Erkenntnisse zeigen, dass Blühpflanzenmischungen bei 24 h enzymatischer Hydrolyse eine Konversionsrate im Verhältnis zu Stroh erreichen können. Dabei spielt der geringere Aufwand der Vorbehandlungsmethode QZ bei Blühpflanzenmischungen eine große Bedeutung. Bei Stroh kann im Vergleich nur durch die Vorbehandlungsmethode SE eine ähnliche Konversion von Cellulose bzw. Hemicellulose zu Kohlenhydraten erreicht werden. Diese Erkenntnisse können von besonderer Bedeutung sein für ein Weiterdenken der Etablierung eines Bioethanolsektors, welcher die Nachhaltigkeit der verwendeten Ausgangssubstrate berücksichtigt (*sustain fuel*).

12. Handlungsempfehlung

Der Einsatz von Blühpflanzenmischungen mit hoher Konvertierbarkeit ist aus bioökonomischer Sicht empfehlenswert, da Konversionsraten ähnlich Weizenstroh erreichbar sind bei zeitgleich geringerem Vorbehandlungsaufwand.

13. Konzept zum Ergebnis- und Forschungstransfer auch in projektfremde Anwendungen und Branchen

Die in der Konzeptstudie gewonnen Erkenntnisse werden als Erweiterung der bereits vorhandenen Expertise zur Bioethanolerzeugung im Fachgebiet Hefegenetik und Gärungstechnologie gesehen. Darüber hinaus werden die Inhalte der Konzeptstudie für studentische Lehreinheiten aufbereitet und an Studierende aus verschiedenen Fachdisziplinen (Agrarwissenschaften, Naturwissenschaften) vermittelt. Dies betrifft u.a. das Mastermodul *Bioethanol and Distilled Spirits*, in welchem Studierenden die biotechnologischen Arbeitsweisen zu Bioethanolerzeugung nahegebracht werden. Zusätzlich werden Inhalte in die halbjährlich stattfindenden industriellen Lehrangebote der Forschungs- und Lehrbrennerei integriert. In den angebotenen Brennerkursen wird neben dem Fokus auf Spirituoserzeugung auch auf die technische Bioethanolerzeugung eingegangen. Im Ausschuss der AGF (Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung) treffen sich jährlich ExpertInnen des Bereichs Getreidestärke und Bioethanolerzeugung. Dabei werden aktuelle wissenschaftliche Forschungen näher betrachtet und interessante Themenfelder für die jährlich stattfindende Tagung *Bioethanol and Bioconversion Technology Meeting* gesammelt. In dieser Zusammenkunft sollen die in der Konzeptstudie gewonnen Erkenntnisse vorgestellt werden. Des Weiteren werden die Erkenntnisse an die Hohenheimer Gärten zurückgeliefert. Diese sollen in themenrelevante botanischen Führungsangeboten eingebunden werden.

14. Erfolgte oder geplante VÖ der Ergebnisse

Es ist geplant, die in der Konzeptstudie gewonnen Erkenntnisse zu einer wissenschaftlichen Veröffentlichung in einem themenspezifischen Journal (peer-reviewed) zu führen.