



TUG

Technische Universität Graz
Erzherzog-Johann-Universität

Institut für Biotechnologie
Petersgasse 12, A-8010 Graz

Direkte fermentative Verwertung von Mais-Ernterückständen

Diplomarbeit
von
Selina Tölderer

Betreuer: Ao.Univ.Prof. Braunegg Gerhart

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern danken,
die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Inhalt

I. Einleitung

1.Aufgabenstellung	1
2.Die Maispflanze	2
2.1 Inhaltsstoffe der Maispflanze	4
2.1.1 Zellulose	4
2.1.2 Hemizellulose	6
2.1.3 Lignin	7
3. Beispiel für eine Verwertung der Maispflanze in Zhaodong County	9
4. Grundlagen der Feststofffermentation	10
4.1 Wassergehalt und Wasseraktivität	11
4.2 Fermentorbauweisen in der Feststofffermentation	12

II. Produkte aus Mais-Ernterückständen durch direkte Fermentation

1. Zellulase	17
1.1 Allgemeines	17
1.2 Anwendungsmöglichkeiten für Zellulase	19
1.3 Herstellung von Zellulase mittels Submerskultur	23
1.3.1 Organismus und Medium	23
1.3.2 Vorbehandlung	24
1.3.3 Fermentationsbedingungen	25
1.4 Herstellung von Zellulase mittels Feststofffermentation	28
1.4.1 Organismus und Medium	28
1.4.2 Vorbehandlung	29
1.4.3 Sterilisation und Inokulum	31
1.4.4 Fermentationsbedingungen	31

2. Xylanase	36
2.1 Allgemeines	36
2.2 Anwendungsmöglichkeiten für Xylanasen	39
2.3 Vorbehandlung des Substrats	43
2.4 Herstellung von Xylanase mittels Submerskultur	44
2.4.1 Medium	44
2.4.2 Fermentationsbedingungen	46
2.5 Herstellung von Xylanase mittels Feststofffermentation	53
3. Lignin abbauende Enzyme	56
3.1 Laccase	56
3.1.1 Anwendungsmöglichkeiten für Laccase	56
3.1.2 Herstellung von Laccase mit Maisstroh als Substrat	59
3.1.3 Eigenschaften des Enzyms	61
3.2 Andere Lignin abbauende Enzyme	61
3.2.1 Medium und Fermentationsbedingungen	62
4. 2,3-Butandiol	63
4.1 Allgemeines	63
4.2 Anwendungsmöglichkeiten von 2,3-Butandiol	64
4.3 Produktion von 2,3-Butandiol mit Maisstroh und -kolben als Substrat	65
4.3.1 Organismus	65
4.3.2 Vorbehandlung	65
4.3.3 Fermentationsbedingungen	67
4.3.4 Produktgewinnung	68
5. Milchsäure	70
5.1 Allgemeines	70
5.2 Anwendungsmöglichkeiten von Milchsäure	71
5.3 Produktion von Milchsäure mit Maisstroh und -kolben als Substrat	73
5.3.1 Vorbehandlung	73
5.3.2 Organismus und Fermentationsbedingungen	73
5.3.3 Getrennte Hydrolyse und Fermentation zu Milchsäure	74
5.3.4 Simultane Hydrolyse und Fermentation	75

6. Kurzkettige organische Säuren	77
6.1 Allgemeines und Verwendung kurzkettiger org. Säuren	77
6.2 Produktion von org. Säuren mit Maisstroh als Substrat	79
6.2.1 Organismus	79
6.2.2 Vorbehandlung	80
6.2.3 Medium und Fermentationsbedingungen	80
6.2.4 Aufarbeitung	81
7. Protein	82
7.1 Organismus und Vorbehandlung	83
7.2 Medium und Fermentationsbedingungen	83
8. Zusammenfassung und Diskussion	85
III. Anhang	
Literaturliste	91

I. Einleitung

1. Aufgabenstellung

In der Steiermark und vielen anderen Regionen Österreichs wird auf einem großen Teil der Ackerfläche Mais angebaut. Dies geschieht allein in der Steiermark auf einer Fläche von mehr als 70.000 ha. Aufgrund des hohen Ertrages (zwischen 10.000 und 13.000 kg Körnermais pro Hektar) wird der Maisanbau auch in Zukunft ein wichtiges Standbein der Landwirtschaft darstellen.

Die bei der Produktion von Maiskörnern zurückbleibenden Ernterückstände werden derzeit kaum genutzt. Die etwa 500.000t die pro Jahr in der Steiermark anfallen werden zum Großteil auf dem Feld zurückgelassen, haben aber aufgrund ihres geringen Stickstoffgehalts eine schlechte Düngewirkung.

Aufgrund der großen anfallenden Mengen und auch in Hinsicht auf die Inhaltsstoffe stellen diese Ernterückstände des Maisanbaus ein ungenütztes Rohstoffpotential dar. Maisstroh, wie dieser Ernterückstand genannt wird, fällt dezentral an und muß, da in diesem Fall die Transportkosten sehr hoch wären, auch direkt in der Region verwertet werden. Eine Nutzung dieses Potentials würde also nicht nur ein zusätzliches Einkommen für die Landwirtschaft bedeuten, sondern eine umfassende Belebung der regionalen Wirtschaft darstellen.

Diese Diplomarbeit soll die Möglichkeiten der direkten Verwertung dieses Rohstoffs in biotechnologischen Prozessen sammeln und Wege der möglichst vollständigen Verwertung des Materials aufzeigen.

Informationen zur Verwertung von Maisstroh wurden in der Literatur (Science Citation Index, Chemical Abstracts), im Internet und im Informationssystem des Patentamts (<http://at.espacenet.com>) gesucht.

2. Die Maispflanze, *Zea mays*[1]



Abb.1 Aufbau der Maispflanze, C Maissproß mit männlichen Blüten in terminaler Rispe und weiblichen in achselständigen Kolben; D Maiskorn; E Maiskolben längs

Unter den Getreidearten nimmt der Mais bezüglich der weltweiten Produktionsmenge derzeit den zweiten Rang ein. Seine Heimat liegt vermutlich zwischen Mexiko und Peru, doch ist eine Wildform nicht gefunden worden. Sicher ist der Mais schon sehr früh von den Indianern kultiviert worden, und er hat bei ihnen in Mythologie und Religion eine vielfach bezeugte Rolle gespielt. Die Bewohner der karibischen Inseln nannten ihn "mahiz", und die Spanier übernahmen diesen Namen. Sie brachten den Mais schon kurz nach 1500 nach Europa, wo er als Besonderheit zunächst bestaunt, aber erst im 17. Jahrhundert angebaut wurde. Über Italien, den Balkan und Rußland gelangte er schließlich bis nach Indien und China. Seit dem zweiten Weltkrieg wird er auf der ganzen Welt kultiviert, dient aber vor allem in den USA und anderen Industrieländern größtenteils als Viehfutter.

Der Aufbau der Maispflanze ist in Abbildung 1 dargestellt.

Botanisch gesehen weicht der Mais von allen Getreidearten durch einhäusige Getrenntgeschlechtlichkeit ab, dies bedeutet, daß sich auf einer Pflanze sowohl männliche als auch weibliche Blüten befinden. Mais ist ein einjähriges Gras, dessen markerfüllter Halm bis 2,5 m hoch und bis 5 cm dick wird. Entlang der Achse finden sich 8-40 bandartige 4-10 cm breite und 30-150cm lange Blätter. Terminal endet der Halm in der männlichen Blüte, einer Rispe, die mit paarweise angeordneten Ähren zu je zwei Blüten besetzt ist. Die weiblichen Blütenstände dagegen entspringen den Blattachsen als Seitentriebe. Sie stellen kurz gestielte Kolben dar, die von einigen Hüllblättern, den Lieschen, umgeben sind und in 8-16 Längszeilen Ährchen tragen. Jedes Ährchen birgt zwei weibliche Blüten, von denen jedoch nur eine fruchtbar ist. Diese obere Blüte hat einen 2-3 mm langen Fruchtknoten mit einem 20-40cm langen Griffel an der Spitze. Die Gesamtheit der Griffel ragt als Bündel an der Spitze des Kolbens zwischen den Lieschenblättern heraus. Da die männlichen Blüten in der Regel vor den weiblichen reifen, kommt es zur Fremdbestäubung durch Wind. Die Fruchtknoten wachsen heran bilden die Körner, die weiß, goldgelb, rot oder schwarzviolett gefärbt sein können.

Der Sortenreichtum ist durch die lange Kultur groß und die Inhaltsstoffe der verschiedenen Sorten können beträchtlich variieren. Deshalb sind die in den folgenden Kapiteln angegebenen Konzentrationen auch als Mittelwerte gängiger Sorten zu verstehen.

2.1 Inhaltstoffe der Maispflanze

Die Maispflanze(ohne Körner) besteht wie alle Pflanzen aus drei polymeren Hauptbestandteilen:

- Zellulose
- Hemizellulose
- Lignin

Aus Tabelle ist ersichtlich, daß die Zusammensetzung abhängig vom Teil der Pflanze stark verschieden ist. Das deutet darauf hin, daß eine getrennte Verwertung von Kolben und Stengel mit Blättern sinnvoll wäre.

Tab.1 Ungefähre Zusammensetzung des Maisstrohs und des Kolbens (ohne Körner)

	Maisstroh	Kolben
Zellulose[%]	33	42
Hemizellulose[%]	38	33
Lignin[%]	15	10

2.1.1 Zellulose [2]

Zellulose ist ein aus 3500 bis 10000 unverzweigten 1,4- β -Glucose-Einheiten aufgebautes wasserunlösliches Polysaccharid (siehe Abbildung 2).

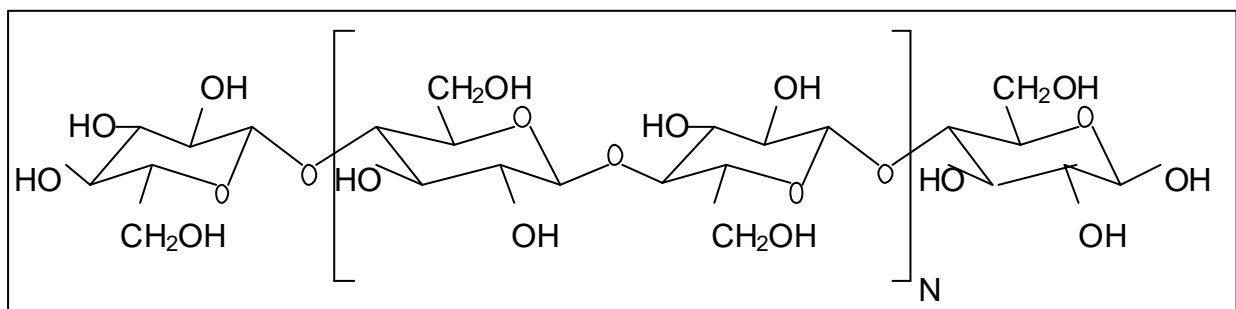


Abb.2 Zellulosestruktur

Die linearen Polymerketten sind parallel und zueinander versetzt angeordnet, wodurch Zellulosefasern entstehen. Durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken innerhalb einer Kette und zwischen den Hydroxygruppen der Nachbarketten ergibt sich die Festigkeit der Zellulose. Innerhalb der Fasern existieren kristalline und amorphe Bereiche. Diese Kristallinität erschwert einen Angriff durch Mikroorganismen bzw. durch Enzyme. Dieser Effekt wird außerdem durch die Anwesenheit von Hemizellulose und Lignin verstärkt.

Abbildung 3 zeigt die Struktur nativer Zellulose mit intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen (entlang der Achse c sind parallele Ketten gelagert; intermolekulare Wasserstoffbrücken verbinden die Kette in Richtung a).

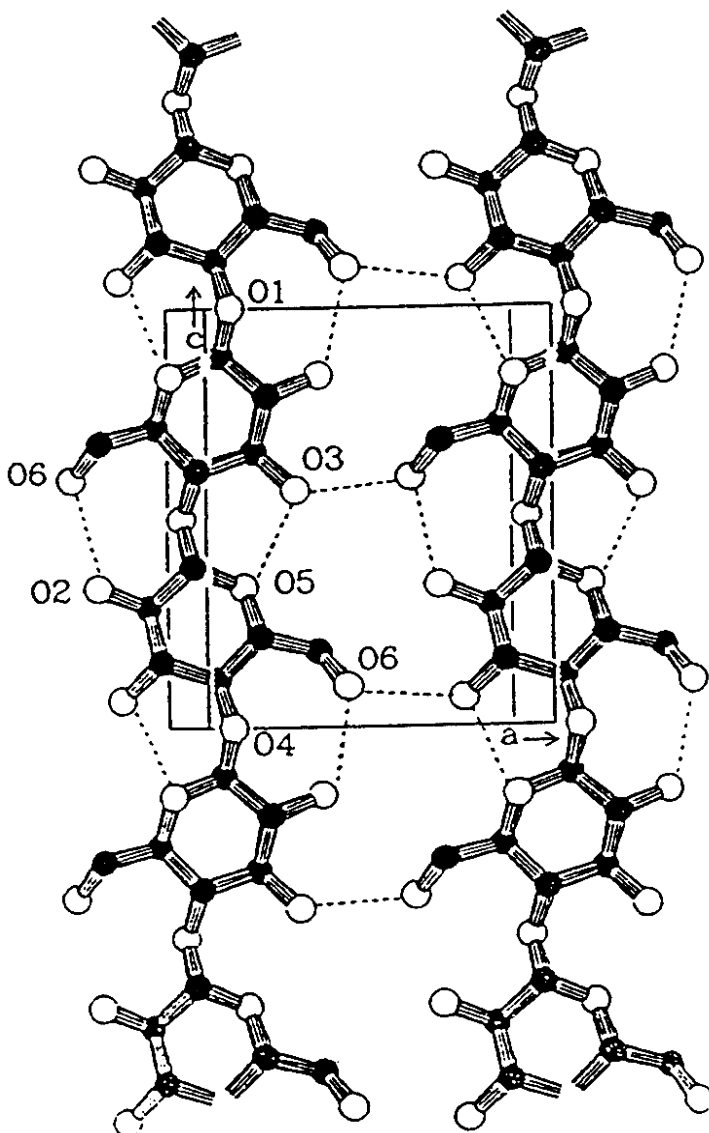


Abb.3 Struktur nativer Zellulose

2.1.2 Hemizellulose

33% des Maisstrohs und ein etwas größerer Anteil des Maiskolbens bestehen aus Hemizellulose. Diese ist nach der Zellulose das zweithäufigste erneuerbare Polysaccharid in der Natur. Hemizellulosen sind Heteropolysaccharide bestehend aus verschiedenen Polymeren, die sich in ihrer Monosaccharidzusammensetzung, als auch im Substitutions- und Polymerisationsgrad unterscheiden. Sie sind oft verbunden mit anderen Polysacchariden (z.B.: Zellulose), Proteinen oder Lignin.

Hemizellulosen werden normalerweise nach dem hauptsächlich vorkommenden Zucker benannt. So besteht die Hemizellulose der Maispflanze zum Großteil aus Xylan, ein Polymer der Xylose.

Xylan ist eine β -1,4 verknüpfte Polyxylose mit verschiedenen Seitenketten. Die Art und Häufigkeit der Seitenketten sind abhängig vom Organismus der die Hemizellulose bildet. Der prinzipielle Aufbau des Xylans im Maiskolben ist in Abbildung 4 dargestellt.

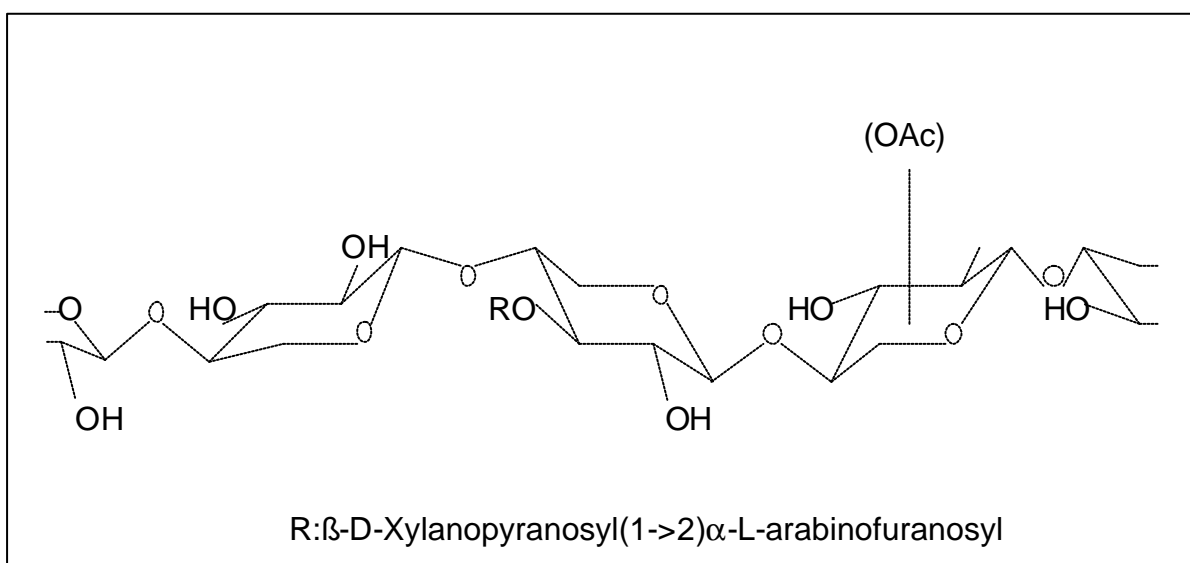


Abb.4 Prinzipieller Aufbau des Xylans im Maiskolben[3]

2.1.3 Lignin[4,5]

Lignine sind komplexe phenolische Polymere mit hohem Molekulargewicht die zusammen mit Zellulose in den hölzernen Teilen von Pflanzen vorkommen. So enthält auch die Maispflanze zu etwa 15% Lignin. In seiner Struktur ist Lignin als höhermolekularer Abkömmling des Phenylpropane aufzufassen. Je nach Pflanzenart ist der Phenylring mit ein bis zwei Methoxygruppen und die Propaneinheit mit Hydroxygruppen substituiert (siehe Abbildung 5).

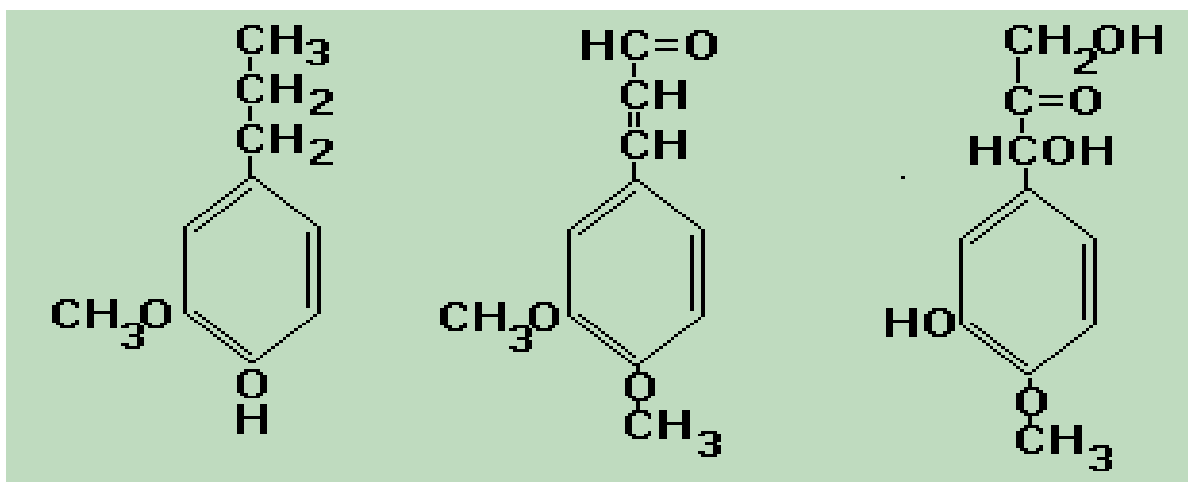


Abb. 5 Einige typische Monomere im Lignin

Die Hydroxygruppen dieser Monomere reagieren bei der Polymerisation mit anderen Hydroxy- aber auch Aldehyd- und Ketongruppen und bilden so Ether, Hemiacetal und Acetalbrücken zwischen den Monomeren. Ein mögliches Oligomer ist in Abb. 6 gezeigt. Durch Weiterreaktion der freien reaktiven Gruppen bildet sich die komplexe Struktur des Lignins, die unregelmäßig aufgebaut ist.

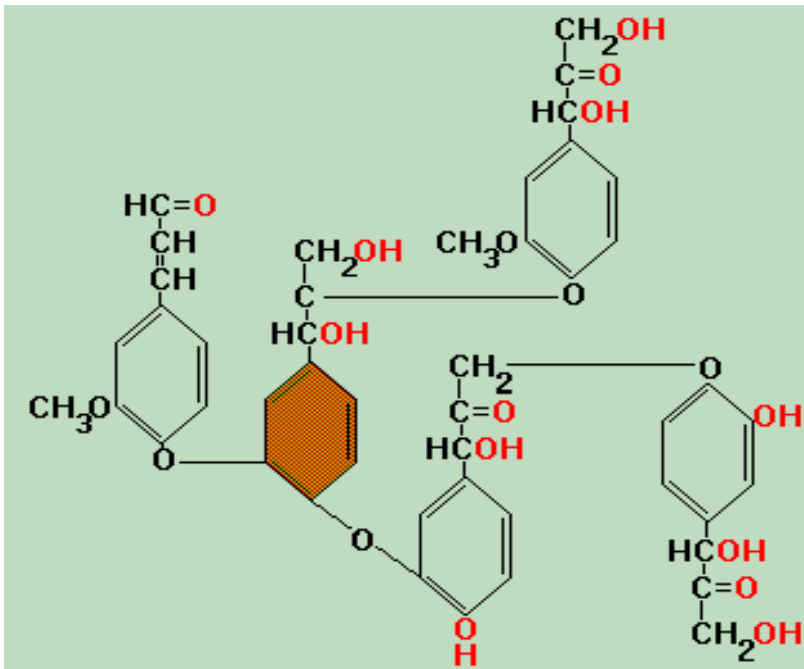


Abb. 6 Mögliches Oligomer bei der Bildung von Lignin

Die Benzolringe können aber durch oxidative Kondensation (durch eine Oxidase) zweier Phenole auch über eine C-C-Bindung miteinander verbunden sein. (siehe Abb. 7)

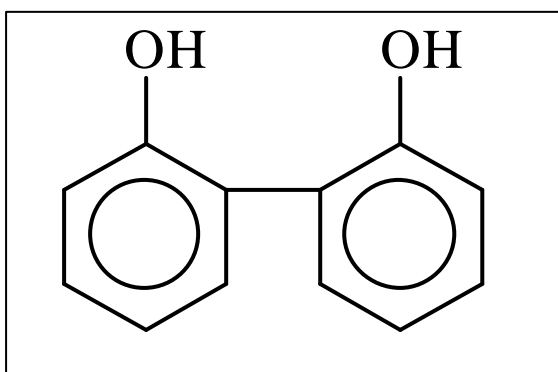


Abb. 7 Kondensierte Phenole

3. Beispiel für eine umfassende Verwertung der Maispflanze in Zhaodong County (China) [6]

Auch in China gehört der Mais zu den bedeutendsten Getreiden. Zhaodong County liegt in der Provinz Heilongjiang im Nordosten Chinas. Hier werden im Jahr etwa eine Tonne Maiskörner geerntet. Seit 1994 wird versucht sowohl die Körner als auch die Ernterückstände nach ökologischen Gesichtspunkten umfassender zu verwerten. Eine mehrstufige Produktgewinnung wurde angestrebt.

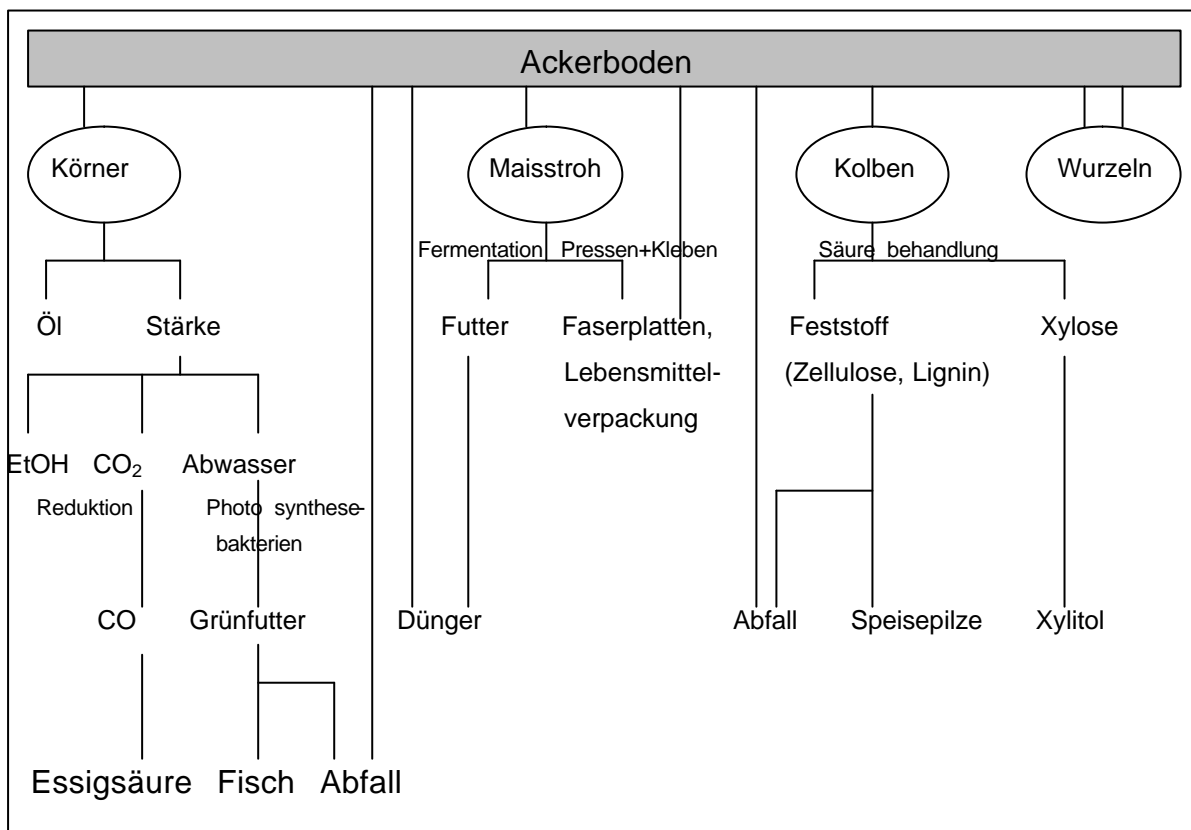


Abb.8 Übersicht über die Verwertung der Maispflanze in Zhaodong County

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist wurde nicht nur versucht einen komplexen Produktstammbaum zu erreichen, sondern die Abfälle wenn möglich wieder dem Boden zurückzuführen. Mit besonderem Erfolg wird in China Xylitol hergestellt. Dabei handelt es sich um einen Zuckeraustauschstoff, der vor allem für Diabetiker besonders gut geeignet ist.

Natürlich kann dieses Modell nicht direkt für die Steiermark übernommen werden, aber es zeigt die Möglichkeiten einer komplexen Verwertung des "Abfallprodukts" Maisstroh.

4. Grundlagen der Feststofffermentation[7]

Unter Feststofffermentation versteht man eine Fermentation bei der das Substrat nicht gelöst in einer Flüssigkeit, sondern als Feststoff vorliegt. Das für mikrobielles Wachstum notwendige Wasser liegt gebunden an die feste Matrix des Substrats vor.

Historisch wurden solche Fermentationen schon um 3000 v.Chr. in Ägypten in der Lebensmittelherstellung (z.B.: Broterzeugung) durchgeführt. Erst im 20. Jahrhundert begann man die Feststofffermentation für die industrielle Herstellung von Enzymen und organischen Säuren zu verwenden.

Vorteile der Feststofffermentation gegenüber der Submerskultur sind:

- Das Medium ist einfacher und günstiger.
- Der Energieaufwand für Rühren ist geringer und es wird weniger Wasser benötigt.
- Die Produktivität bezogen auf das Reaktorvolumen ist sehr hoch.
- Das Equipment ist relativ einfach und deshalb billiger.

Neben diesen Vorteilen ist jedoch anzuführen, daß viele Probleme der Feststofffermentation noch nicht gelöst sind und vor allem auf dem Gebiet des Reaktordesigns noch viel Entwicklungsarbeit notwendig ist. Außerdem ist die Feststofffermentation relativ arbeitsintensiv und schwerer zu kontrollieren. Auch ist die Reproduzierbarkeit zwischen zwei Batchansätzen relativ gering und es ist schwer eine Kontamination durch Fremdorganismen zu verhindern.

4.1 Wassergehalt und Wasseraktivität

Der Gehalt an Feuchtigkeit ist entscheidend für eine erfolgreiche Feststofffermentation. Ein gewisser Wassergehalt ist für das Wachstum von Mikroorganismen absolut notwendig, zu viel Wasser kann aber durch Verringerung des Freiraums zwischen den Partikeln den Transport von Kohlendioxid und Sauerstoff erschweren.

Ein wichtiger Faktor für das Wachstum und den Stoffwechsel der Mikroorganismen ist die Wasseraktivität. Sie gibt die Menge an ungebundenem Wasser, das in der unmittelbaren Umgebung des Mikroorganismus verfügbar ist an. Sie hängt stark mit dem Wassergehalt zusammen ist aber nicht vollständig mit ihm gleichzusetzen. Obwohl die Wasseraktivität als Parameter bedeutend wichtiger wäre als der Wassergehalt finden sich in der Literatur kaum diesbezügliche Angaben, weshalb in den folgenden Kapiteln meist nur der optimale Wassergehalt angegeben wird.

Die Wasseraktivität(a_w) ist definiert als:

$$a_w = P_s / P_0 \text{ mit}$$

P_s ...Gleichgewichtsdampfdruck des Wasser im festen Substrat

P_0 ...Dampfdruck von reinem Wasser

Normalerweise liegt die optimale Wasseraktivität von Eukarionten bei 0,7 und von Prokaryonten bei 0,9, allerdings mit vielen Ausnahmen (z.B.: $a_{w,opt}$ (*T.reesei*) = 0,99 für Wachstum und 0,98 für Sporenbildung)

Um die Wasseraktivität konstant zu halten muß die Feuchtigkeit der eingeblasenen Luft kontrolliert werden, oder es muß ein Befeuchter in den Fermentor eingebaut werden.

Das Verhältnis zwischen Wasseraktivität im festen Substrat und der relativen Gleichgewichtsfeuchte der umgebenden Luft lautet:

$$a_w = m_w / (m_w + m_i) = ERH/100 \text{ mit}$$

m_w , ...Anzahl der Mole Wasser

m_i , ...Anzahl der Mole aller gelösten Substanzen

ERH equilibrium relative humidity

4.2 Zerkleinerung

Um die Teilchengröße können verschiedene Mühlen verwendet werden, wie zum Beispiel:

- Kompressionsmühlen,
- Kugelmühlen,
- Extruder,
- Walzenmühlen,
- Scheibenmühlen,

Nachteile des feinen Mahlens des Substrats sind die hohen Kosten, vor allem weil die Verfahren alle sehr energieintensiv sind. Außerdem kann es bei zu geringen Teilchengrößen Probleme beim Sauerstoffeintrag geben. Einfaches Zerkleinern ist deshalb besser als allzu feines Mahlen des Maiskolbens bzw. Maisstrohs.

4.3 Fermentorbauweisen in der Feststofffermentation

Wie bereits erwähnt, ist die Feststofffermentation allgemein arbeitsintensiv und schwer zu kontrollieren. Um diese und andere Schwachstellen der Feststoff-fermentation verbessern zu können, ist vor allem der Entwurf eines geeigneten Reaktors entscheidend. Allerdings hinkt die Entwicklung auf diesem Gebiet der Technologie für die Submerskultur weit nach. Ein guter Fermentor sollte:

- gute Kontrollsysteme für Temperatur, Belüftung und Feuchtigkeit haben
- Kontaminationen verhindern
- homogen in Bezug auf Wasseraktivität, Temperatur und Mediums -zusammensetzung sein, um ein gleichmäßiges Wachstum der Mikroorganismen zu ermöglichen
- störende Gase wie CO₂ rasch entweichen lassen
- arbeitssparend sein
- eine Maßstabsvergrößerung leicht machen.

Die momentan verwendete Fermentoren können noch nicht allen diesen Kriterien entsprechen.

a.) Shallow -Tray Fermentor

Das sind flache Behälter aus Holz, Bambus, Metall oder Plastik. Der Boden besteht aus einer Siebplatte oder einem Maschengitter um eine Belüftung zu ermöglichen und das feste Substrat zu tragen. Die Behälter haben meist eine Höhe zwischen 30 und 50 mm. Es werden mehrere Behälter auf einem Träger in einem sterilisierbaren Raum neben und übereinander angebracht. Sterilisierte Luft, deren Temperatur und Feuchtigkeit konstant gehalten wird, wird eingeblasen.

Die Vorteile dieser Fermentorbauweise sind die Einfachheit und die dadurch geringen Investitionskosten. Der Sauerstofftransport im Substratbett geschieht zum Großteil durch Diffusion weshalb die Dicke der Substratschicht stark limitiert ist. Außerdem ist der Flächenbedarf sehr hoch, die Produktivität gering und der Arbeitsaufwand sehr hoch.

b.) Säulenfermentor

Bei diesen Säulenreaktor handelt es sich um einen Festbettreaktor, in den das feste Substrat eingefüllt wird. An beiden Enden sind Eingänge zur Belüftung vorhanden. Die Temperatur wird über einen mit Kühlwasser gefüllten Mantel geregelt. Die Feuchtigkeit wird über befeuchtete Luft aufrechterhalten. Der Sauerstoff- und CO₂-Transport wird durch verstärkte Konvektion beschleunigt. Trotzdem ist die Regulation von Feuchtigkeit und Temperatur problematisch und auch bei der Maßstabsvergrößerung gibt es erhebliche Schwierigkeiten.

c.) Deep-Trough Fermentor

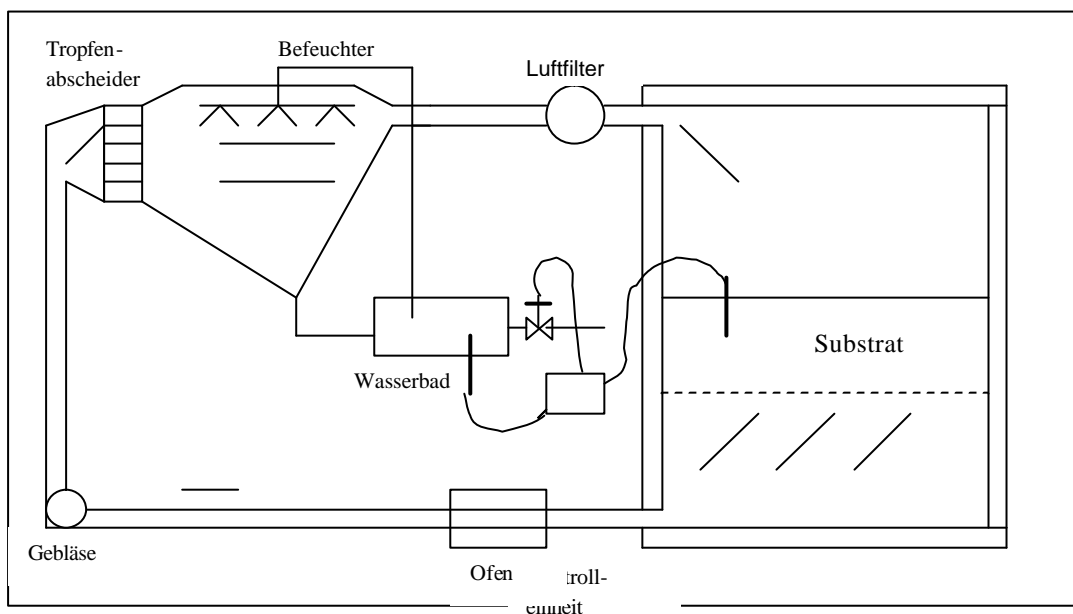


Abb.9 Deep-Through Fermentor

In Abb. 9 ist das Schema dieses Reaktors dargestellt. Die typische Größe einer Kultivierungskammer liegt bei 4 x 2 x 1,5 m mit einer Substratschicht auf der löchrigen Platte von etwa 20-40 cm. Temperatur und Feuchtigkeit werden über eine zentrale Kontrolleinheit geregelt.

Dieser Reaktortyp ist geeignet Enzyme im großen Maßstab und mit hoher Produktivität herzustellen, deren Qualität gleichbleibend ist. Problematisch ist nur das Zusammensinken des Substrats mit fortschreitendem Wachstum des Pilzes, was die Porosität des Materials verringert und damit den Sauerstofftransport erschwert.

d.) Rotating Drum Fermentor

Diese Fermentor besteht im Prinzip aus einer sich drehenden Trommel, in der das Substrat nach oben befördert wird und dann nach weiterer Drehung wieder herunter fällt. Durch ein mit Löchern versehenes Rohr wird Luft eingeblasen, dieses kann parallel zum Boden oder auch verzweigt in der Trommel verlaufen. Es gibt verschiedene Typen dieses Fermentors, wie zum Beispiel das Drei-Kammer-Modell. In die erste Kammer wird das inokulierte Substrat eingebracht, durch langsame Drehung wird das Material in axialer Richtung weiter transportiert und in der dritten Kammer wird dann das bewachsene Substrat geerntet. Dieser Fermentor wird kontinuierlich betrieben. Die Sauerstoffversorgung und der Abtransport der durch das Wachstum gebildeten Wärme ist bei dieser Bauweise gut gewährleistet. Auch ist die Heterogenität viel geringer als bei den zuvor beschriebenen Bauweisen. Durch den kontinuierlichen Betrieb kann die Produktivität erhöht und der Arbeitsaufwand reduziert werden.

Nachteile des Systems sind das mögliche Zerstören des Mycels und ein Zusammenballen des Substrates. Außerdem ist die Volumensproduktivität relativ gering, da nur 30% des Trommelvolumens nutzbar sind.

e.) Rührkessel

Eine Box oder ein Tank mit einem Rührer (batch oder kontinuierliche Rührung) enthält eine etwa einen Meter dicke Substratschicht. Durch den löchrigen Boden wird befeuchtete Luft eingeblasen. Da ein ständiges Rühren das Mycel sehr stark zerstört wurden Modelle entwickelt, bei denen die Rührung nur bei Überschreiten einer gewissen Temperatur im Reaktor aktiviert wird, gleichzeitig wird mit Wasser besprüht. Die Vorteile dieses Systems sind die leichte Bedienung und ein effizientes Verhindern der Verklumpung des Substrats. Nachteile des Rührkessels sind sein relativ hoher Energiebedarf und die große Kontaminationsgefahr.

f.) Drehscheibenreaktor

Eine sich drehende Runde Scheibe die mit Löchern versehen ist um die Luftzufuhr zu ermöglichen sorgt durch die horizontale Drehbewegung für eine Bewegung des Substrates. Dieses kommt so besser mit der eingeblasenen Luft in Kontakt.

g.) Gerüttelter Trommelreaktor

Der Aufbau dieses Fermentors ähnelt dem Trommelreaktor, aber zusätzlich wird die Trommel leicht gerüttelt. Dies ermöglicht eine gleichmäßig gute Versorgung mit Luft. Außerdem regelt ein Computerkontrollsystem Temperatur und Feuchte. Die Luft mit kontrolliertem Feuchtigkeitsgehalt wird in der Mitte der Trommel eingeblasen, strömt durch das Substrat und verläßt den Reaktor durch die luftdurchlässige Wand. Es kann kaltes Wasser eingesprüht werden um die Wasseraktivität und die Temperatur konstant zu halten. Die Produktivität des Systems ist hoch, aber die Kosten für Installation und Betrieb dieses Reaktors sind sehr hoch.

h.) Wirbelschichtreaktor

Hier liegt das Substrat zuerst auf einer poröser Platte oder einem Metallnetz, dann wird Luft eingeblasen, so daß die Partikel aufschweben. Vorteile sind unter anderem:

- Eine gute Sauerstoffversorgung durch eine gute Durchmischung von Luft und Substratpartikeln
- Schonung des Mycels, da kein mechanisches Rühren notwendig ist
- Gleichmäßige Temperatur und Feuchtigkeit
- Hohe Produktivität durch verkürzte Fermentationszeit
- Kontaminationen können gut verhindert werden

II. Produkte aus Mais-Ernterückständen durch direkte Fermentation

1. Zellulase

1.1 Allgemeines

Zum biologischen Abbau von Zellulose ist ein komplexes Enzymsystem (genannt Zellulase) notwendig, das in drei Hauptgruppen unterteilt werden kann [8] :

1. Endo-1,4- β -D-Glukanase (EC 3.2.1.4) bewirkt die interne hydrolytische Spaltung der Zellulosekette, was die geordnete Struktur der Zellulose zerstört.

2. Exoglukanasen, die am nicht reduzierenden Ende der durch die Endoglukanasen gebildeten Oligosaccharide Zuckereinheiten abspalten. Es werden Zellobioseeinheiten (Zellobiose ist das entsprechende Dimer der Glukose) vom Enzym 1,4- β -D-Glukanzellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) bzw. Glukoseeinheiten vom Enzym 1,4- β -D-Glukanglucohydrolase (EC 3.2.1.74) gebildet.

3. β -Glukosidase (EC 3.2.1.21) hydrolysiert Zellobiose und andere Zellooligosaccharide zu Glucose.[8,9]

Um die Zellulaseaktivität zu bestimmen gibt es verschiedene Methoden. Die zwei am häufigsten verwendeten Methoden sind die Bestimmung der Filterpapieraktivität (FPase) und der Carboxymethylzellulase (CMCase). Beim Filterpapier-Assay wird die Fähigkeit der Enzyme bestimmt, reduzierende Zucker aus Filterpapier (besteht aus Zellulose) freizusetzen. Dabei wird die gesamte Zellulaseaktivität gemessen. Bei der Ermittlung der CMCase Aktivität bestimmt man die Fähigkeit der Enzyme reduzierende Zucker aus löslicher Carboxymethylzellulose zu bilden. Hier werden eher die Endoglukanasen bestimmt.

Außerdem kann auch die β -Glukosidaseaktivität bestimmt werden indem die aus p-Nitrophenyl- β -D-glukosid freigesetzte Menge an p-Nitrophenol gemessen wird. [8,10,11]

Weltweit werden etwa 23000 Tonnen Zellulase pro Jahr in Submerskultur hergestellt. Das Marktvolumen beträgt etwa 125 Millionen \$, was einem Zehntel aller verkauften industriellen Enzyme entspricht.[10]

In den vergangenen 50 Jahren wurden verschiedene Mikroorganismen isoliert welche die Fähigkeit besitzen Zellulasen zu produzieren. Darunter verschiedene Bakterien und Pilze, die in Tab.2 zusammengefaßt sind

Tab.2 Die am besten untersuchten Mikroorganismen mit der Fähigkeit Zellulasen zu bilden.[10]

Pilze	Bakterien
Weiß-Fäule Pilze: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Coriolus versicolor</i>	aerobe Bakterien: <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Braun-Fäule Pilze: <i>Poria placenta</i> <i>Lanzitus trabeum</i>	<i>Bacilluls subtilis</i> <i>Cellvibrio gilvus</i> <i>Cytophaga hutchinsonii</i>
Weich-Fäule Pilze: <i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Aspergillus niger</i>	anaerobe Bakterien: <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> <i>Ruminococcus albus</i>

Anaerobe Pilze: Neocalimastix frontalis	Actinomycceten Thermoactinomyces curvata Streptomyces flavogriseus
--	--

Zellulase ist ein induzierbares Enzym, wobei die Induktion durch Zellulose selbst am besten ist. Also übernimmt Maisstroh bzw. Maiskolben nicht nur die Funktion der Kohlenstoff- und Energiequelle für die Mikroorganismen, sondern stellt auch Zellulose als induzierendes Material zur Verfügung.[7]

1.2 Anwendungsmöglichkeiten für Zellulase[10]

a.) „Stonewashing“

In den 70er Jahren wurde eine neue Art der Vorbehandlung von Jeans üblich, wobei fertigen Hosen in Anwesenheit von Bimssteinen für etwa sechzig Minuten gewaschen wurden. Der Stoff der Jeans wurde dadurch weicher und schon beim Kauf bequem zu tragen, wohingegen die herkömmlichen Jeans erst nach langem Tragen weicher wurden. Nachteile dieser Methode waren vor allem die starke Beanspruchung der Maschinen in denen die Jeans zusammen mit den Steinen gewaschen wurden.

In den späten 1980er Jahren entdeckte man Zellulase als Alternative zum herkömmlichen „Stonewashing“. Die Verwendung von Zellulase faßte bald Fuß, da auch sie die Weichheit und das Aussehen der original „stone-washed“ Jeans bewirkte, ohne aber ähnliche Nachteile zu haben. Seit etwa 1990 wird Zellulase weltweit auf diese Art eingesetzt.

Die verwendeten Zellulasen sollten ihr pH-Optimum nicht im basischen Bereich haben.

b.) Waschpulver

Der Zusatz von Zellulase zu im Haushalt verwendeten Waschpulvern begann im Jahre 1993. Die Zellulase wirkt der „Fusselbildung“ entgegen, wie sie vor allem auf Baumwollkleidungsstücken nach wiederholtem Tragen und Waschen zu beobachten ist. Zellulase entfernt die vorhandenen Fussel und läßt die Kleidungsstücke in bezug auf Farbe und Glätte des Stoffes neuer aussehen. Außerdem erhöht Zellulase die Weichheit und verbessert die Schmutzentfernung.

So kann der Einsatz von Zellulase die sonst notwendigen kationischen Weichmacher ersetzen.

Der pH Wert beim Waschen beträgt etwa 8 bis 9,5, weshalb sie Zellulase in diesem Bereich aktiv sein muß. Außerdem müssen die verwendeten Enzyme auch relativ stabil gegen Proteasen, Bleichmittel und waschaktiven Substanzen sein, die ebenfalls im Waschmittel vorhanden sind.

c.) Viehfutter

Als erstes wurden Zellulasen im Futter für Hühner und Schweine, das vor allem Gerste und Weizen enthält, eingesetzt. Diese Getreide enthalten lösliche β -Glukane, welche die Viskosität des Futters im Magen der Tiere erhöhen. Das wiederum bewirkt einen hohen Wassergehalt, was klebrigen Stuhlgang und Krankheiten verursacht. Der Zusatz von Zellulase zum Tierfutter hilft diese Probleme zu überwinden.

Für diese Anwendung können auch nicht gereinigte Enzymlösungen (abzentrifugierte Fermentationsbrühen) eingesetzt werden. Durch die Verwendung von Zellulasen konnte eine Verbesserung der Futtermittelnutzung (Verhältnis von Futtermenge zur Gewichtszunahme des Viehs) von 1% auf 8% erreicht werden. Die Zellulasen werden direkt vor der Verfütterung dem Getreide zugemischt. Verwendet wird Zellulase vor allem in Westeuropa. In den USA wird vor allem Mais und Soja verfüttert und bei dieser Ernährung der Tiere brachte der Zusatz von Zellulase kaum Verbesserung.

d.) Enzymatische Entfernung von Fusseln auf unverarbeitetem Gewebe

Diese Anwendung ist analog zur Verwendung von Zellulasen in Haushaltswaschmitteln. Auch hier werden Fusseln entfernt und ein erneutes Verfusseln soll verhindert werden. Vor allem bei Gemischen aus Baumwolle und anderen Fasern kann das „Haaren“ des Stoffes während der Verarbeitung zu großen Problemen führen. Vor allem bei der Herstellung von Lyocell, einer Mischung aus Baumwoll- und Holzfasern, ist dieses Problem akut.

Deshalb wird das Gewebe mit Zellulase behandelt. Dies geschieht in einer zylindrischen Trommel, in der sich das Gewebe befindet. Diese Trommel taucht zum

Teil in eine Flüssigkeit ein, die Zellulase enthält. Die Trommel dreht sich mit 50 bis Hundert Umdrehungen pro Minute, was die zur Unterstützung der Wirkung der Zellulase notwendige Reibung erzeugt. Diese Behandlung dauert etwa 15 bis 30 Minuten und wird bei 40°C bis 50°C und einem pH Wert von etwa 5 durchgeführt.

Der saure pH-Wert ist notwendig da die meisten auf Lyocell verwendeten Farbstoffe bei diesem pH Wert am stabilsten sind. Deshalb wird für diese Anwendung Zellulase mit einem pH-Optimum in diesem Bereich benötigt.

e.) Entfärben und Entwässern von Papier

Das sogenannte „Deinking“ ein Prozeß bei dem die Druckfarben vom Altpapier entfernt werden um eine Wiederverwertung von Altpapier zu ermöglichen. Zellulase spielt nur bei der Aufbereitung von Qualitätspapier, wie Kopierpapier, nicht aber bei der Entfärbung von Zeitungspapier eine Rolle. Normalerweise geschieht dieses Entfärben durch Flotation. Dabei wird das Papier eingeweicht und der Zellstoffschlamm wird in ein Becken gepumpt, in das am Boden Luft eingeblasen wird. Die Farbpartikel wandern an die Luft/Wasser Phasengrenze und schwimmen so im Becken oben auf und werden durch eine Skimmeranlage entfernt. Anschließend wird der Zellstoff gebleicht.

Zellulase wird nun während des Einweichens oder während der Flotation zugesetzt. Dadurch wird die Menge der entfernten Druckfarbe erhöht, was die Sauberkeit des Zellstoffs erhöht. Das führt zu einem helleren Recyclingpapier oder zu einer Einsparung von bleichenden Chemikalien.

Der Mechanismus der Wirkung des Enzyms in diesem Prozeß ist nicht restlos geklärt. Der pH Wert bei der Flotation liegt etwa zwischen 7 und 8 weshalb die hierfür verwendete Zellulase in diesem Bereich aktiv sein sollte.

Beim Entwässern von Papier in der Papiermaschine wird ein wäßriges Gemisch aus Zellstoff und verschiedenen Zusätzen zu Papier gepreßt. Das Wasser wird durch eine Kombination von Pressen, Vakuum und Hitze entfernt. Eine Papiermaschine arbeitet umso wirtschaftlicher je schneller sie trockenes Papier erzeugt.

Zellulase erhöht die Geschwindigkeit der Entwässerung, was ein schnelleres Laufen der Papiermaschine möglich macht. Die Zellulase löst einen Teil der kleinen Partikel, genannt „fines“, die sehr viel Wasser zurückhalten. Das Ausmaß der Entwässerung wird durch die Bestimmung des CSF(Canadian Standard Freeness) ermittelt. Der Einsatz von Zellulase erhöht diesen Parameter von 20 auf 40 Punkte. Der Zusatz von Zellulase erfolgt in einem Tank direkt vor der Papiermaschine und die Behandlung dauert etwa eine Stunde.

f.) Herstellung von Fruchtsaft.

In der Herstellung von Fruchtsäften, aber auch Wein oder Bier, liegt der Saft zuerst als Brei zusammen mit dem Fruchtfleisch vor. Feststoffe werden dann durch eine Kombination von Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Dieser Prozeß ist sehr kostenintensiv, vor allem da sehr viel Waschwasser verwendet werden muß um eine hohe Saftausbeute zu erhalten.

Zellulase spaltet Zellulose und β Glukane die an die Zellwand gebunden sind und verringert so die Viskosität des Früchtebreis. Das wiederum erleichtert das Abtrennen des Saftes. Durch das Lösen kleiner Partikel wird auch die Klarheit des erhaltenen Safts erhöht. Der Geschmack des Produktes wird verstärkt, da viele Geschmacksstoffe besser extrahiert werden, wenn Zellulase zugesetzt wurde. Die Verwendung des Enzyms verringert außerdem die Menge an Restfeststoff was zu geringeren Entsorgungskosten führt.

Zellulase wird vor allem bei der Herstellung von Apfel-, Erdbeer-, Orangen- und Grapefruitsaft eingesetzt. Das pH Optimum der Zellulase sollte aufgrund des sauren pH der Fruchtsäfte möglichst niedrig sein.

f.) Backen

Hier werden vor allem Zellulasen aus Feststofffermentationen eingesetzt. Die Wirkung der eingesetzten Enzyme soll möglichst mild sein. Zellulase wird verwendet um ein besseres Aufgehen des Teiges und eine verbesserte Geschmacksentfaltung zu bewirken. Zu starke Behandlung mit Zellulase kann aber zur Zerstörung der Teigstruktur führen.

g.) Enzymatische Hydrolyse von lignozellulosehaltigen Abfällen aus der Landwirtschaft.

Nicht nur Maisstroh kann mit Hilfe von Enzymen wie Zellulasen zu fermentierbaren Zuckern umgewandelt werden sondern auch viele andere lignozelluläre Materialien.

1.3 Herstellung von Zellulase mittels Submerskultur

Für die Produktion von Zellulase werden eigentlich nur aerob wachsende Pilze verwendet. In einem Rührkessel mit Temperatur-, pH-, und Sauerstoffkontrolle wird meist im Batchbetrieb Zellulase hergestellt. Vorteile der Submersproduktion sind die gleichbleibende Aktivität der gewonnen Enzymlösung, leichte Kontaminationskontrolle und geringer Arbeitsaufwand.

1.3.1 Organismus und Medium

Kommerziell wird Zellulase in Submerskultur wird vor allen mit Stämmen der Pilze Trichoderma, Humicola, Aspergillus und Penicillium produziert. Bei Verwendung der Zellulase in der Lebensmittelherstellung ist die mögliche Produktion von Toxinen wie sie von einigen Stämmen von Trichoderma reesei[8] und Trichoderma viride[11] bekannt ist. Deshalb wird in einer Arbeit[8] die Verwendung von Neurospora sitophila für diese Bereiche empfohlen da dieser Organismus in Asien seit langem zur Herstellung diverser Lebensmittel verwendet wird.

Als komplexe Stickstoffquelle können natürlich Hefeextrakt oder Pepton verwendet werden, aber sie sind sehr teuer und es wird deshalb versucht alternative Stickstoffverbindungen zu finden. Möglich ist die Verwendung von Maisquellwasser oder Molkepulver. Die Produktion von Zellulase ist auch ohne komplexe Stickstoffquellen nur unter Zusatz von Harnstoff und Ammoniumsulfat möglich, sie kann aber durch eine geeignete komplexe Stickstoffquellen stark verbessert werden.

1.3.2 Vorbehandlung des Substrats

In den meisten Arbeiten die sich mit Zellulaseproduktion aus Maisstroh befassen, wird eine Vorbehandlung des Materials empfohlen. Für die Submerskultur scheint die Verwendung von unbehandeltem Substrat nicht möglich, da die kristalline Struktur der Zellulose und die Anwesenheit von Hemizellulose und Lignin das Wachstum der Pilze behindert. Häufig wird das Material mit Säure oder Base behandelt.

Der Einfluß verschiedener Vorbehandlungen dieser Art bei Raumtemperatur auf die Zellulaseproduktion in Submerskultur wurde untersucht[12]. Die Versuche wurden mit dem Organismus *Aspergillus terreus* NRRL 265 durchgeführt. Für diesen brachten Vorbehandlungen sowohl mit Schwefel- als auch mit Salzsäure und Natronlauge bei verschiedenen Konzentrationen bei Raumtemperatur keinerlei Verbesserung der Zellulaseaktivität im Vergleich zu unbehandeltem Maisstroh, das nur gemahlen wurde.[12]

Zwei andere Arbeiten[8,13] behandeln Maiskolben und Maisstroh vor der Fermentation mit Natronlauge im Autoklaven für etwa 30 bis 60 Minuten. Durch die Behandlung des Maiskolbens mit 20mL 4%iger Natronlauge pro Gramm Kolben konnte eine Entfernung der Hemizellulose zu 93,1% und des Lignins zu 97,2 % erreicht werden. Gleichzeitig führte diese Vorbehandlung aber auch zu einem 20%igem Verlust der Zellulose. Für die Produktion von Zellulase stellte sich eine optimale Natronlaugekonzentration von 2% heraus, bei der 78,9% der Hemizellulose und 96,8% des Lignins entfernt werden konnten. Bei dieser Konzentration betrug der Verlust an Zellulose 15,8%.

Behandelt man Maiskolbengranulat mit Säure kann der Hemizelluloseanteil hydrolysiert und somit in Lösung gebracht werden. Diese Lösung enthält vor allem Xylose, die durch Reduktion in Xylitol, einen Zuckeraustauschstoff, umgewandelt werden kann. Der zurückbleibende Feststoff besteht zu 69% aus Zellulose, 12% Hemizellulose und 20% Lignin.[14] Diese Vorbehandlung ist nicht nur in bezug auf die Ausbeute von Zellulase bei der anschließenden Fermentation sehr effektiv, sondern macht auch die Herstellung eines zusätzlichen Produktes möglich. Die anfallende Menge an Abfall kann außerdem stark reduziert werden.[15]

1.3.3 Fermentationsbedingungen für die Herstellung von Zellulase mittels Submerskultur

a.) Temperatur und pH

Die Temperatur und der pH-Wert sollten während der Fermentation überwacht und kontrolliert werden. Für *Trichoderma* sind die optimalen Bedingungen eine Temperatur zwischen 28 und 30°C und ein pH-Wert zwischen 4 und 5. Für die anderen zur Produktion von Zellulase verwendeten Pilze bei circa 37°C und einem pH zwischen 6,2 und 7.[10]

b.) Sauerstoffversorgung

Aufgrund des relativ langsamen Wachstums ist der Sauerstoff selten limitierend. Die Rührung sollte aber trotzdem nicht zu gering sein, weil es sonst zur Klumpenbildung und damit zu einer geringeren Produktion von Zellulase kommt.[16]

In Tabelle 3 sind die Veröffentlichungen zur Herstellung von Zellulase in Submerskultur mit Maisstroh oder Maiskolben als Substrat. Der maximal erreichte Ertrag liegt in einer Größenordnung von etwa 10^5 U Zellulase/kg Substrat.

Tab. 3 Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Zellulaseproduktion mit Maisstroh bzw. Maiskolben als Substrat mittels Submerskultur

Organismus	Substrat	Medium [g/kg Substrat]	Maßstab	Vorbe- handlung	Temp. [°C]	pH	FPase[U/kg Substrat]	CMCase	β-Glukosidase	Literatur
Aspergillus terreus	Maisstroh 10g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ 140	Schüttel- kolben	mahlen 200 mesh	25	5,3 ¹	4,3 * 10 ³	4,3 * 10 ⁴	1,2 * 10 ⁵	12
Penicillium pinophilum		Harnstoff 30					4,2 * 10 ³	4,2 * 10 ⁴	1,5 * 10 ⁵	
P. chryso- sporium		CaCl ₂ 30					4,2 * 10 ³	4,7 * 10 ⁴	4,8 * 10 ⁴	
		MgSO ₄ .7H ₂ O 30								
Trichoderma viride		KH ₂ PO ₄ 200					3,6 * 10 ³	4,2 * 10 ⁴	6,0 * 10 ⁴	
	Pepton 100									
	glucose 50									
	Trypton 20									
	Casein 20									

Neurospora sitophila	Maisstroh 10g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	170	75 L	gemahlen 30 1mm mit 10% NaOH 30min im Autoklav	5,5 ²	2,0 * 10 ⁴	2,9 * 10 ⁵	5,8 * 10 ³	8
		Harnstoff	51							
		KH ₂ PO ₄	200							
		MgSO ₄	20							
		CaCl ₂	20							
		FeCl ₃ ,	16							
		ZnSO ₄	22							
		H ₃ BO ₃ ,	0,6							
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2,4							
		CuSO ₄	3,9							
MnCl ₂	0,7									

¹Start-pH, nicht reguliert,
²regulierter pH-Wert,

Tab.3 Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Zellulaseproduktion mit Maisstroh bzw. Maiskolben als Substrat mittels Submerskultur,

Fortsetzung

Organismus	Substrat	Medium [g/kg Substrat]	Maßstab	Vorbe- handlung	Temp. [°C]	pH	FPase[U/kg Substrat]	CMCase	β-Glukosidase	Literatur
Aspergillus niger	Kolben 10g/L ³⁾	(NH ₄) ₂ SO ₄ 90	Schüttel- kolben	gemahlen 20mm , 2% NaOH 1h im Autoklav	28	5,0 ¹⁾	4,4 * 10 ³	3,0 * 10 ⁴	3,7 * 10 ⁴	13
		Hefeextrakt 21								
		KH ₂ PO ₄ 86								
		MgSO ₄ .7H ₂ O 13								
		MnSO ₄ .5H ₂ O 67								
		CaCl ₂ 13								
		CoCl ₃ .6H ₂ O 114								
ZnSO ₄ .7H ₂ O 60										
T.reesei NRRL11236	Kolben 10g/L	NH ₄ -Salze ⁴⁾ 200	Schüttel- kolben	gemahlen 1mm	23 bzw. 30	6,0 ¹⁾		9,6 * 10 ³	2,0 * 10 ⁴	11
Myrothecium verrucaria ATCC 9095		Hefe Extrakt 100						CaCl ₂ .2H ₂ O 5,5	MgSO ₄ .7H ₂ O 50	

T.viride ATCC32098	MnSO ₄	0,5						1,4 * 10 ⁴	2,2 * 10 ⁴	
	KH ₂ PO ₄	60								
	K ₂ HPO ₄	40								
	Eisencitrat	1								
	ZnSO ₄	0,44								
	CoCl ₂	0,1								
	Thiamin-	10								
	hydrochlorid									

¹⁾Start-pH-Wert, nicht reguliert,

²⁾regulierter pH-Wert,

³⁾10 g/L nach Vorbehandlung, entspricht 23,3 g vor Nachbehandlung

⁴⁾für T.reesei und M.verrucaria wurde Ammoniumchlorid, für T.viride Ammoniumphosphat verwendet

1.4 Herstellung von Zellulase mittels Feststofffermentation

Wird Zellulase in Submerskultur hergestellt, sind die Produktionskosten relativ hoch, da sehr viel Energie benötigt wird, das Medium sehr teuer ist und auf Grund der geringen Enzymkonzentrationen in der Fermentationsbrühe meist auch eine Aufkonzentrierung notwendig ist.

Als Alternative zur Submerskultur können Zellulase produzierende Mikroorganismen auch mittels Feststofffermentation gezüchtet werden. Dies würde neben den allgemeinen Vorteilen der Feststofffermentation auch zu einer Vereinfachung der Produktaufarbeitung bewirken, da die aus der Feststofffermentation erhaltenen Enzymlösungen in ihrer Konzentration für die meisten Anwendungen genügen. Die Fermentationsbrühe einer Submerskultur müsste im Gegensatz dazu aufwendig aufkonzentriert werden.

1.4.1 Organismus und Medium

Für die Produktion von Zellulase mittels Feststofffermentation werden vor allem Stämme von *Trichoderma* (z.B.: *Trichoderma reesei*) und *Aspergillus* verwendet.

Als Stickstoff- Quellen werden Verbindungen wie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder Harnstoff, aber auch natürliche Materialien wie Kleie verwendet. Komplexe Stickstoff- Verbindungen dienen auch zur pH- Kontrolle des Mediums. Für die Fermentation des Maiskolbenrückstands aus der Xyloseproduktion mit *Trichoderma reesei* wurde eine Konzentration von Weizenkleie im Medium von 30% als optimal befunden.[14]

1.4.2 Vorbehandlung des Substrats [7]

Die kristalline Struktur der Zellulose und die Anwesenheit von Lignin verhindern den effektiven Angriff durch den Pilz, weshalb im unbehandelten Material das Wachstum des Pilzes zu langsam ist. Allerdings ist die Vorbehandlung nicht so wichtig wie bei der Submers-Fermentation.

Dient nur der Kolben ohne Blätter und Stengel als Substrat für die Herstellung von Zellulase reicht einfaches granulieren als Vorbehandlung aus. Trotzdem ist es besser den Hemizelluloseanteil wie in 1.3.2. beschrieben mittels Säure abzutrennen um Xylitol als zusätzliches Produkt zu gewinnen.

Vor allem bei Maisstroh ist aber auch für die Feststofffermentation eine Vorbehandlung meist unvermeidbar, die den amorphen Anteil an Zellulose erhöht und den Ligninanteil möglichst vollständig entfernt.

a.) Zerkleinern

Eine Pulverisierung des Materials ist notwendig um die Kristallinität des Substrats zu verringern, und die Oberfläche und damit die Angriffsfläche für die Mikroorganismen zu vergrößern. Methoden zur Zerkleinerung des Substrats sind in Kapitel 1.4.2 angeführt.

b.) Basische Vorbehandlung

Durch die Behandlung mit Base kann das Lignin sowie ein Teil der Hemizellulose gelöst werden. Außerdem führt die basische Vorbehandlung zum Aufquellen und zerstört so die kristalline Struktur der Zellulose. Als Basen werden z.B.: NaOH, Ca(OH)_2 , CaO in Wasser, aber auch gasförmiger Ammoniak verwendet. Für die Feststofffermentation muß das Material nach der alkalischen Vorbehandlung nicht gewaschen werden. Der pH Wert muß allerdings mit Schwefelsäure auf etwa 6,5 gebracht werden.

c.) Verdünnte Säure

Hier wird ein Großteil der Hemizellulose entfernt. Die Oberfläche wird ebenso vergrößert wie auch das Porenvolumen. Die Kristallinität der Zellulose bleibt allerdings größtenteils erhalten. Bei einer Säurekonzentration von etwa 0,3-1,1% und einer Temperatur von 110-220 °C ist außerdem das Problem der Furfural Bildung aus den Pentosen kaum zu vermeiden. Furfural ist deshalb problematisch, weil es als Inhibitor auf die meisten Mikroorganismen wirkt. Nur bei tieferen Temperaturen kann eine Furfuralbildung verhindert werden.

d.) Steam Explosion

Bei diesem Verfahren wird das Maisstroh mit Dampf auf einer Temperatur von 200-240°C für 30sec-20min behandelt, dann folgt schnelles Entfernen aus dem Reaktor um eine „Explosion“ zu erzeugen. Die Hemizellulose wird in niedermolekulare, wasserlösliche Produkte umgewandelt und auch Lignin wird abgebaut. Die hohen Investitionskosten, der erhebliche Energiebedarf und die Bildung von Furfural sind die Nachteile dieser Vorbehandlung. Statt Dampf kann auch Ammoniakgas oder Kohlendioxid verwendet werden, dann kann der Prozeß bei niedrigerem Druck (15 atm) und tieferer Temperatur (50-80°C) durchgeführt werden. Außerdem ist eine Wiedergewinnung des Ammoniaks bzw. Kohlendioxids möglich.

Von den beschriebenen Möglichkeiten der Vorbehandlung bietet die Verwendung verdünnter Säure den Vorteil, daß der Hemizelluloseanteil beinahe vollständig und außerdem relativ rein abgetrennt werden kann. Dies ermöglicht eine Weiterverarbeitung der Hemizellulose um z.B. Xylitol herzustellen.

Die basische Vorbehandlung hat den Vorteil, daß die verwendeten Chemikalien (wie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder CaO) sehr preisgünstig sind, die Effektivität dieser Vorbehandlung sehr hoch ist und nicht die Gefahr einer Furfuralbildung besteht.

1.4.3 Sterilisation und Inokulum

Die Sterilisation des Substrats für die Feststofffermentation sollte durch direkte Dampfsterilisation bei einer Temperatur von 121°C für 30 bis 60 Minuten durchgeführt werden. Abhängig von Art und Größe des Fermentors kann in situ oder in vitro sterilisiert werden. Das Substrat sollte nicht zu dicht sein um den Wärmetransport zu verbessern.

Das Inokulum kann mittels Submerskultur oder ebenfalls mittels Feststofffermentation hergestellt werden. Bei einer Gewinnung des Inokulums mittels Feststofffermentation sollte das Verhältnis zwischen festen Sporen und Medium etwa bei 1:20 bis 1:50 liegen.

1.4.4 Fermentationsbedingungen

Die optimalen Fermentationsbedingungen für eine Produktion von Zellulase mit Maisstroh- bzw. Kolben als Substrat sind natürlich für die einzelnen Mikroorganismen leicht unterschiedlich. Einige allgemeingültige Werte werden im folgenden beschrieben.

a.) Temperatur[7]

Am häufigsten wird ein Stamm von *Trichoderma reesei* verwendet dessen optimale Wachstumstemperatur zwischen 30 und 32°C liegt. Die optimale Temperatur für die Zellulasebildung liegt aber bei 26 bis 28 °C. Da während der Fermentation aber eine erhebliche Menge an Energie frei wird und der Wärmetransport relativ gering ist, kann es im festen Substrat leicht zu deutlich höheren Temperaturen kommen. Das wirkt sich dann natürlich negativ auf die Enzyymbildung aus. Es kann aufgrund von Überhitzung sogar zum Absterben des Pilzes kommen. Eine ausreichende Temperaturkontrolle ist bei der Feststofffermentation relativ schwer. Die folgenden Bedingungen können verwendet werden um die Temperatur zu regulieren:

1. Die Dicke der Substratschicht sollte möglichst gering gehalten werden um den Wärmetransport zu erleichtern.
2. Die Belüftung sollte so stark sein, daß nicht nur der Sauerstoffeintrag gewährleistet ist sondern auch für ausreichenden Wärmetransport gesorgt ist
3. Das Substrat sollte möglichst schonend gerührt werden.

b.) Wassergehalt und Wasseraktivität[7]

Der Wassergehalt ist einer der wichtigsten Parameter für die erfolgreiche Produktion von Zellulase mittels Feststofffermentation. Ist er zu hoch wirkt sich dies negativ auf den Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid aus. Bei zu geringen Wassergehalt kann das feste Substrat nicht genügend aufquellen was den Angriff durch den Pilz erst möglich macht. Der optimale Wert für den Wassergehalt liegt abhängig vom Stamm für zellulasebildende Pilze zwischen 50 und 80% Wasser im Substrat. Bei der Fermentation des Maiskolbenrückstands aus der Xyloseproduktion liegt der optimale Wassergehalt für *Trichoderma reesei* ZU-02 bei 70%[14]

c.) pH-Wert[7,14]

Im Gegensatz zur Submerskultur ist der pH bei der Feststofffermentation nur schwer zu messen oder zu kontrollieren. Verwendet man Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle so wird der pH-Wert während der Fermentation durch den Verbrauch von Ammoniumionen durch die Mikroorganismen sinken. Durch einen teilweisen Ersatz des Ammoniumsulfats durch Harnstoff bis zu etwa 40 bis 50% kann diese pH-Wert-Verschiebung verhindert werden. Komplexe Stickstoffquellen eignen sich besonders gut den pH Wert während der Fermentation möglichst konstant zu halten da sie eine puffernde Wirkung haben. Aber auch das Maisstroh und der Maiskolben wirken als Puffer, weshalb es eine Regulation des pH-Wertes erleichtert wird. Der pH des Mediums sollte zu Beginn der Fermentation zwischen 4,5 und 6,5 liegen.

Verwendet man den Maiskolbenrückstand aus der Xyloseproduktion muß man diesen von einem pH bei 2,8 ebenfalls auf zumindest 4,5 erhöhen.

d.) Belüftung[7]

Die Produktion von Zellulase auf Maisstroh bzw. Maiskolben mittels Feststofffermentation ist ein aerober Prozeß. Die Belüftung ist aber nicht nur für die Versorgung mit Sauerstoff wichtig sondern auch für das Aufrechterhalten einer gleichbleibenden Feuchtigkeit, zum Abtransport gasförmige Metabolite wie CO₂, sowie auch für den Wärmetransport. Temperatur und Feuchte der Luft müssen kontrolliert sein, Möglichkeit der diskontinuierlichen Belüftung: Literaturbeispiel: einschalten bei 34°C, abschalten bei 29°C, Feuchte : 90%[7]

Meist erfolgt die Feststofffermentation zur Produktion von Zellulase im Batchbetrieb. Für die Produktion von Zellulase mit dem Maiskolbenrest aus der Xyloseproduktion wird eine wiederholte Fermentation des Substrats empfohlen. So kann für drei Fermentationen bei denen das Substrat mit dem Mycel und den Sporen aus der vorangehenden Fermentation weiter verwendet wurde eine annähernd gleichbleibende Zellulaseaktivität erreicht werden. Die notwendige Fermentationszeit wird dabei immer kürzer und bei der zweiten Fermentation liegt die erreichte FPase Aktivität sogar deutlich höher als bei der ersten.[14]

In Tabelle 4 ist ein Versuch zur Herstellung von Zellulase mittels Feststofffermentation mit Maiskolben als Substrat kurz zusammengefaßt. Der Ertrag ist mit $1,3 \cdot 10^5$ U Zellulase /kg Substrat etwa gleich hoch wie bei der Submerskultur. Mit dem selben Substrat können nach Ernten der Zellulase noch zwei weitere Fermentationen mit ähnlichem Ertrag durchgeführt werden, was die Ausbeute pro kg Substrat verdreifacht.

Tab.4 Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Zellulaseproduktion mit Maisstroh bzw. –kolben als Substrat mittels Feststofffermentation

Organismus	Substrat	Medium [% Trockensubst.]	Maßstab	Vorbe- handlung	Temp. [°C]	pH	FPase[U/kg Substrat]	CMCase	β-Glukosidase	Literatur
T.reesei ZU-02	Kolben- rückstand aus Xylose- produktion Feststoff- ferment.	Medium ²⁾ Kolbenrückst. 66% Weizenkleie 30% (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% Harnstoff 0,5% KH ₂ PO ₄ 0,5% MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5% CaCl ₂ 0,45% CoCl 0,05%	deep through Ferm. 4x2x1,5m	Xylose- produktion	28- 30°C	4,5 ¹⁾	⁴⁾ 1,3*10 ⁵		^{3) 4)} 1,0 *10 ⁴	8

¹⁾Start-pH, nicht reguliert,

²⁾Feststofffermentation: Mediumszusammensetzung in % der Trockensubstanz, Wassergehalt 70%

³⁾1 U = die Menge an Enzym die 2mol Glucose pro min aus Zellobiose bildet

⁴⁾Ertrag der ersten Fermentation, Material kann 3 mal verwendet werden mit jeweils ähnlichen Erträgen

2. Xylanase

2.1 Allgemeines

Viele Mikroorganismen besitzen Enzyme, die es ihnen ermöglichen das Polysaccharid Xylan an verschiedenen Stellen zu spalten. Die gebildeten Oligo- und Monosaccharide können dann vom Organismus in die Zelle aufgenommen werden und dienen ihr als Kohlenstoff- und Energiequelle. Diese Enzyme nennt man Xylanasen.

Auf Grund der komplexen Struktur der Hemizellulose sind verschiedene Enzyme für den Abbau notwendig. So gibt es auch nicht nur eine „Xylanase“ sondern eine ganze Gruppe von Enzymen die am Abbau von Xylan beteiligt sind. Die Angriffspunkte der verschiedenen Enzyme sind in Abbildung 10 dargestellt.

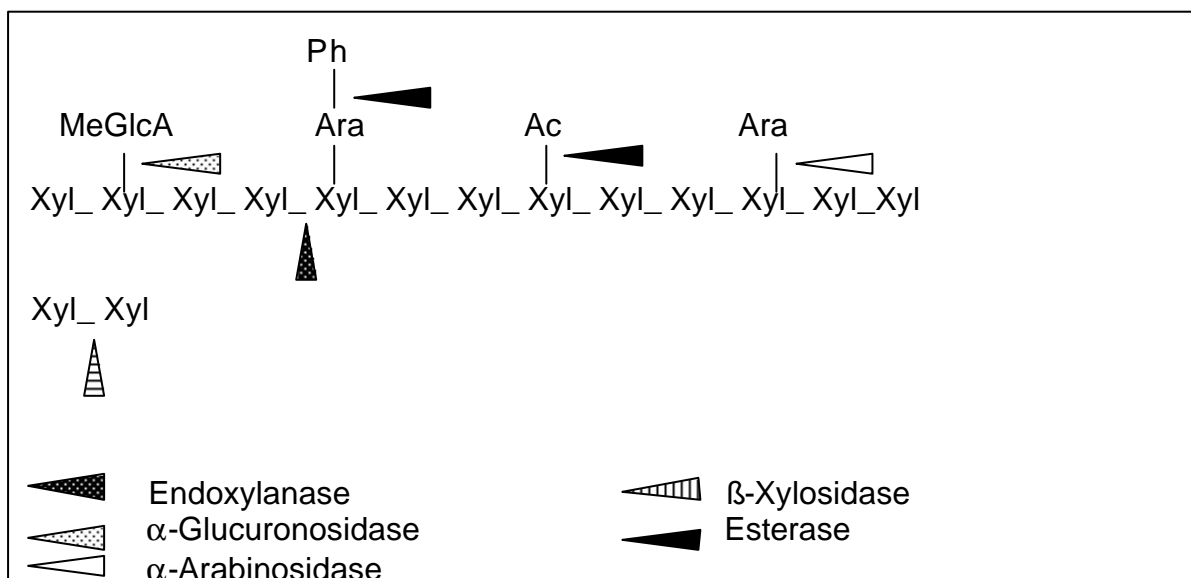


Abb. 10 Angriffspunkte der verschiedenen Xylanasen[17]
Ac...Acetyl, Ara...Arabinose MeGlcA...Methylglucuronsäure, Ph...Phenolische Gruppe Xyl...Xylose,

Endoxylanasen (1,4-β-D-xylan Xylanohydrolasen EC 3.2.1.8) katalysieren die Hydrolyse von 1,4-β-D-xylosidische Bindungen in Xylanen. Die meisten Endoxylanasen hydrolysieren verschiedene Arten von Xylanen und arbeiten in Bezug auf die gewählten Schnittstellen

zufällig. Die gebildeten Hauptprodukte sind Xylobiose, Xylotriose und substituierte Oligomere von zwei bis vier Xylosylresten.

Für die weitere Hydrolyse der entstandenen Oligosaccharide sind Enzyme wie β -Xylosidase (EC 3.2.1.37) verantwortlich, die sukzessiv Xylose vom nicht reduzierenden Ende der Xylooligosaccharide abspaltet. Die mit dem Xylan verbundenen Seitengruppen werden von α -Arabinosidase (EC 3.2.1.55) und anderen Enzymen abgespalten. An die Hemizellulose gebundene Acetylsubstituenten werden von Esterasen entfernt.

Endo-1,4- β -D-xylanasen werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen als Exoenzyme produziert. Die Enzyme werden also in die Umgebung abgegeben und verbleiben nicht in der Zelle. Das ist notwendig, da sie ja im umgebenden Medium Polymere abbauen sollen um für den Organismus Zucker freizusetzen, die ihm als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen sollen.

Unter den verschiedenen Xylanase produzierenden Mikroorganismen scheinen verschiedene Pilze am vielversprechendsten [18].

Vor allem thermostabile Pilzstämme sind interessant, da die von ihnen gebildeten Enzyme bei höheren Temperaturen eingesetzt werden können. Das bewirkt eine effektivere Anwendung und macht gewisse Anwendungen überhaupt erst möglich. Die Verwendung thermostabiler Stämme hat auch den Vorteil, daß die Gefahr der Kontamination durch andere Mikroorganismen geringer ist. Die Ansprüche an die Kühlung der Fermentation sind bei Verwendung thermophiler Pilze geringer, was vor allem bei Feststofffermentationen wichtig sein kann, da hier oft eine Abführung der durch das Wachstum der Mikroorganismen frei werdenden Energie kaum möglich ist (siehe auch Kapitel I.4) [19].

Daß man in Kulturen die Xylan enthalten hohe Konzentrationen an Xylanase findet, in Kulturen mit leicht verfügbaren Zuckern aber nur sehr geringe Mengen, deutet darauf hin, daß die Bildung dieser Enzyme induzierbar ist [20]. Eine geringe Menge an Xylanase wird auch ohne Induktion gebildet, auch wenn keine Kohlenstoffquelle anwesend ist. [21]

Durch diese geringe Menge an Xylanase wird, wenn Xylan anwesend ist, eine kleine Menge des Polysaccharids hydrolysiert. Die dadurch freigesetzten Oligosaccharide induzieren dann eine verstärkte Bildung von Xylanasen. Das Xylan wirkt also nicht selbst induzierend auf die Bildung von Xylanase. Eine Induzierung durch Xylan selbst wäre nicht möglich, da das Polysaccharid zu groß ist um in die Zelle eindringen zu können. Das Endprodukt der Hydrolyse, die Xylose, bewirkt keine Induktion. Die Synthese dieser Enzyme wird durch Glucose oder Xylose sogar gehemmt [3].

Die Maiskolben bzw. das Maisstroh sind also nicht nur Kohlenstoff- bzw. Energiequelle, sondern sie stellen auch die induzierenden Komponenten zur Verfügung. Besonders vorteilhaft an den Substraten Maisstroh und Maiskolben ist, daß das Xylan nicht allzu leicht zugänglich ist. Die dadurch bewirkte langsame enzymatische Freisetzung von Oligosacchariden und Xylose verursacht eine hohe Produktion von Xylanasen da über einen langen Zeitraum induzierende Substanzen gebildet werden [22].

Ein weiterer Vorteil von Maisstroh und Maiskolben ist der relativ geringe Proteingehalt. Was auf den ersten Blick ein Nachteil zu sein scheint, hat aber den Vorteil, daß nur sehr wenig Proteasen gebildet werden. Dies bewirkt, daß auch nicht gereinigte Fermentationsbrühen bei der Lagerung einen relativ geringen Verlust an Xylanaseaktivität aufweisen [23].

Xylanase können sowohl mit Maiskolben als auch Blättern und/oder Stengeln als Rohstoff hergestellt werden. Die Fermentation kann als Feststofffermentation aber auch submers durchgeführt werden.

2.2 Anwendungsmöglichkeiten für Xylanasen

In den letzten zehn Jahren ist die industrielle Verwendung von Hemizellulasen, im Besonderen von Xylanase, stark angestiegen. Für die meisten dieser Anwendungen ist es wichtig, daß die Xylanase frei von Zellulase ist, da sie für eine partielle Hydrolyse der Hemizellulose in einem Gemisch aus Zellulose und Hemizellulose eingesetzt wird. Die einzelnen Verwendungsmöglichkeiten sind im Folgenden genauer beschrieben.

a.) Zellstoff und Papierindustrie[17]

- Vorbleichen des Zellstoffs in der Papierherstellung

Um den erwünschten Weißheitsgrad von Papier zu erreichen muß der Zellstoff gebleicht werden. Hierfür werden vor allem chlorhaltige Chemikalien oder sauerstoffhaltige Verbindungen wie Sauerstoff, Ozon oder auch Wasserstoffperoxid verwendet. Viele der herkömmlich verwendeten Chemikalien sind starke Umweltgifte.

Wenn man aber den Zellstoff vor dem Bleichen mit Xylanasen behandelt, können im anschließenden Bleichprozeß ein großer Teil der Chemikalien eingespart werden. Xylanasen können den Zellstoff weder bleichen noch delignifizieren. Sie verändern den Zellstoff aber derart, daß das Lignin durch die bleichenden Chemikalien leichter entfernt werden.

Bereits seit 1991 wird Xylanase kommerziell eingesetzt. Dieser als "Biobleaching" bezeichnete Prozeß hat viele Vorteile:

- geringe Investitionskosten bei der Umstellung des Verfahrens
- Chemikalien können eingespart werden
- geringere Abwasserverschmutzung

Voraussetzung für diese Anwendung der Xylanase ist, daß sie völlig frei von Zellulase ist. Geringe Zellulaseaktivitäten können zu einer starken Verschlechterung der Papiereigenschaften führen, da die Fasern verkürzt werden. Außerdem wird das Abwasser dadurch stärker belastet.

Zellulasefreie Fermentationsbrühe aus der Enzymherstellung kann ohne großen Reinigungsaufwand direkt eingesetzt werden.

Die Xylanase darf in diesem Prozeß nicht in zu hohen Aktivitäten eingesetzt werden, da ein gewisser Gehalt an Hemizellulose für die Fasereigenschaften des Zellstoffs in der Papierherstellung sehr wichtig ist.

Der Zellstoff ist vor dem Bleichen stark alkalisch(pH 9-12), weshalb vor dem Einsatz der Enzyme eine Neutralisation erfolgen muß. Außerdem versucht man Xylanasen zu finden deren pH-Optimum möglichst weit im Alkalischen liegen.

Um bei höheren Temperaturen arbeiten zu können und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen sollte das Temperaturoptimum der Xylanasen möglichst hoch liegen.

- Enzymatisches Entrinden

Für die Produktion von qualitativ hochwertigen Zellstoff ist ein vollständiges Entrinden notwendig. Dieser Prozeß benötigt sehr viel Energie und führt zu großen Verlusten an Rohmaterial.

Das Kambium, die Grenzschicht zwischen Holz und Rinde, besteht nur aus einer einzigen Zellschicht. Diese Zellen enthalten kaum Lignin, aber sehr viel Pektin und Hemizellulose. Mithilfe von Pektinasen und Xylanasen könnte das Entrinden erleichtert werden. Solche Prozesse stehen aber erst am Beginn Entwicklung.

- Produktion von Zellstoff zur Herstellung von z.B.: Zelluloseacetaten, Zellophanen oder Kunstseiden.

In der Herstellung von Zellstoff als Ausgangsmaterial für Produkte wie Zellophane oder Kunstseiden ist es notwendig das Rohmaterial vollständig von Hemizellulose zu befreien. Verunreinigungen durch Hemizellulose führen zu Verfärbungen und unlöslichen Anteilen.

Im herkömmlichen Verfahren sind zum Entfernen der Hemizellulose große Mengen an umweltschädlichen Chemikalien notwendig. Durch den Einsatz von Xylanase kann ein großer Teil dieser Umweltgifte eingespart werden.

Eine vollständige enzymatische Hydrolyse ist schwer zu erreichen, und das Material muß chemisch nachbehandelt werden um den gewünschten Reinheitsgrad zu erreichen. Dafür ist aber nur ein Bruchteil der giftigen Chemikalien notwendig verglichen mit dem konventionellen Verfahren ohne enzymatische Hydrolyse.

b.) Rotten von Flachs Fasern

Beim Rotten von Flachs wird das im Pflanzengewebe enthaltene Bindematerial *in situ* durch Mikroorganismen entfernt. Wenn statt dessen Mischungen von Pektinasen und Xylanasen eingesetzt werden, kann der Prozeß stark beschleunigt werden.

c.) Herstellung von Jute[19]

Die Behandlung minderwertiger Fasern mit Xylanase kann eine Alternative zu den chemischen Weichmachern darstellen. Durch die Xylanase kann Xylan (welches die unerwünschte Härte der Fasern verursacht) selektiv entfernt werden ohne die Faserlänge zu beeinflussen. Dieser Prozeß ist umweltfreundlicher und auch wirtschaftlich. Für diese Anwendung sind thermisch relativ stabile Xylanasen notwendig.

d.) Lebensmittelindustrie [17]

- Klären von Säften und Weinen

Die Filtrationsgeschwindigkeit von Fruchtsäften kann durch den Einsatz von Xylanasen erhöht werden.

- Teigherstellung]

Durch den Einsatz von Xylanasen kann Brot lockerer werden ohne die Verarbeitungseigenschaften des Teiges negativ zu beeinflussen. Das kann durch die Umverteilung von Wasser von der Pentosanphase in die Glutenphase erklärt werden. Die Vergrößerung des Volumens der Glutenphase verleiht ihr eine bessere Dehnbarkeit und bewirkt besseres Aufgehen im Ofen.

e.) Tierfutter[17]

Gras besteht zu einem großen Teil aus Polysacchariden, wie zum Beispiel auch Hemizellulose, die von den meisten Tieren nicht abgebaut werden können. Durch die enzymatische Hydrolyse der Hemizellulose durch Zusatz von Xylanase werden Zucker gebildet die von den Tieren verdaut werden können und damit kann der Nährwert des Grünfutters erheblich verbessert werden.

Auch beim Verfüttern von Getreide an Geflügel und Schweine bewirkt die Zugabe von Xylanase einen höheren Nährwert, da vor allem in den Schalen der Getreide viel Hemizellulose enthalten ist. Wird diese durch Xylanase hydrolysiert ist die im Korn enthaltene Stärke besser zugänglich.

f.) Enzymatische Hydrolyse von Lignozellulose hältigen Pflanzenabfallen zur Herstellung von fermentierbaren Zuckern [15]

Mit Xylanase und Zellulase können Pflanzenabfalle hydrolysiert werden. Die erhaltenen Zuckerlösungen können dann fermentativ weiterverarbeitet werden. Der durch die Hydrolyse von Hemizellulose gebildete Zucker Xylose kann wie bereits erwähnt durch Reduktion in Xylitol, einen Zuckeraustauschstoff umgewandelt werden.

2.3 Vorbehandlung des Substrats

Das Material (Kolben, Stengel oder Blätter) muß gemahlen werden. Für Maiskolben wurde eine optimale Partikelgröße von 2-7 mm gefunden. Weitere Vorbehandlungen (z.B.: mit Wasserdampf) haben auf die Bildung von Xylanasen in Maiskolben enthaltenden Medien negative Auswirkungen. Auch ein feineres Mahlen bewirkt einen Rückgang der Xylanaseproduktion. Dies zeigt, daß ein langsames freisetzen löslicher Zucker durch eine geringere Oberfläche vorteilhaft ist [24].

Eine Fermentation einer Extraktionslösung von mit Dampf vorbehandeltem Maisstroh führte zu geringeren Xylanasekonzentrationen als bei einer Fermentation mit gemahlenem Maisstroh. Bei einer Fermentation des so vorbehandelten Materials mit *Aspergillus niger* war die Zellulaseaktivität beinahe Null. Diese Abwesenheit von Zellulase in Xylanaselosungen ist für viele Anwendungsmöglichkeiten notwendig (siehe Kapitel 2.2). Da die Herstellung einer Zellulase freien Xylanase aber auch durch eine geeignete Wahl des Mikroorganismus möglich ist, scheint es nicht sinnvoll mit diesem Verfahren die fünffache Menge an Maisstroh einzusetzen um dann eine um 25% geringere Konzentration an Xylanase zu erreichen[25].

Auch Behandlungen mit Natronlauge oder Wasserstoffperoxid in Kombination mit $MnSO_4$ brachten geringere Xylanasekonzentrationen als nach einfachem Mahlen.

Für die Herstellung von Xylanase mit Maiskolben oder Maisstroh als Rohstoff ist also eine Vorbehandlung die über das einfache Zerkleinern des Substrats hinausgeht nicht notwendig, ja sogar der Produktivität abträglich.

2.4 Herstellung von Xylanase mittels Submersfermentation

2.4.1 Medium

In den meisten Artikel zur Produktion von Xylanase mittels Submersfermentation werden Maiskolben als Substrat verwendet. Auch Blätter und Stengel können eingesetzt werden, allerdings liegt die Ausbeute verglichen mit dem Kolben hier nur bei etwas mehr als einem Viertel (Blätter) bzw. bei etwa einem Achtel für den Stengel [26] .

Die typischen Medien zur Produktion von Xylanasen durch Pilze enthalten zusätzlich zum Substrat auch verschiedene Mineralsalze (z.B.: KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , Ammonium- oder Nitratsalze) die auch eine Pufferung des pH-Wertes bewirken sollen. Außerdem werden einige Metallionen (z.B.: Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) und meist auch komplexe N-Quellen zugesetzt [24].

a.) Substratkonzentration

Die optimale Substratkonzentration unterscheidet sich natürlich abhängig vom eingesetzten Organismus. Außerdem unterscheiden sich die optimalen Konzentrationen, je nachdem ob eine maximale Endkonzentration von Xylanase in der Fermentationsbrühe erreicht werden soll, oder ob pro eingesetzter Substratmenge ein Maximum an Xylanase gebildet werden soll.

Die empfohlenen Substratkonzentrationen liegen zum Großteil im Bereich zwischen 2 und 3,5 % Maiskolbengranulat (einmal auch 5%). Für Stengel und Blätter wird eine Konzentration von 1,5 bis 3 % empfohlen.

b.) Stickstoffquelle

Zwar ist ein Zusatz von komplexen Stickstoffquellen nicht unbedingt notwendig, allerdings wird dadurch die Bildung von Xylanase erhöht. Wird Hefeextrakt als organische Stickstoffquelle verwendet ist die Menge an gebildeter Xylanase um bis zu 30% höher als bei einem Einsatz von Pepton.

Neben den komplexen Stickstoffverbindungen werden dem medium ammoniumsalze zugesetzt. In einer Fermentation mit *Thermomyces lanuginosus*. bringt $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ eine erhöhte Produktion von Xylanase gegenüber einer Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [27] .

Pepton und Hefeextrakt sind relativ teuer. Daher wird versucht billigere komplexe Stickstoffquellen einzusetzen. So wird zum Beispiel getrocknetes Maisquellwasser verwendet, was aber zu einer um 20% verringerten Bildung von Xylanase verglichen mit Hefeextrakt enthaltendem Medium bedeutet [18]. Bei der Verwendung von „Pharmamedia“ ,einem aus Baumwollsamem gewonnenen Protein, wird um 25% weniger Xylanase gebildet[18]. Als komplexe Stickstoffquellen können auch Sojabohnenmehl oder Kartoffelprotein verwendet werden [24] .

Eine weitere wichtige Aufgabe der Stickstoffquelle ist die Beeinflussung des pH-Wertes während der Fermentation, da dieser großen Einfluß auf die Produktion der Xylanasen hat. So kann durch die Stickstoffquelle eine Pufferwirkung erzielt werden, oder der pH-Wert wird durch den Verbrauch der Stickstoffverbindung verändert.

c.) Sterilisation

Da Maiskolben häufig mit thermophilen Bakterien kontaminiert sind, ist eine besonders sorgfältige Sterilisation notwendig. Es wird nach der ersten Sterilisation (45min, 121°C) eine zweitägige Erwärmung bei 50°C und anschließend eine zweite Sterilisation empfohlen [18] .

2.4.2 Fermentationsbedingungen

a.) Rühren

Verstärktes Rühren bewirkt eine starke Verringerung der Xylanaseproduktivität. Das ist auf die Zerstörung des Mycels durch die Scherkraft der Röhreinrichtung zurückzuführen. Bei Fermentationen im großen Maßstab hat die Rührergeschwindigkeit noch größeren Einfluß. So wurde in einem 20 m³ Fermenter die höchste Xylanaseaktivität erzielt indem das Rührwerk nach der Anfangsphase der Fermentation abgeschaltet und danach nur noch periodisch eingeschaltet wurde. Dadurch konnten ähnliche Bedingungen erreicht werden wie sie in einem Air-lift Fermentor (siehe Abbildung 11) herrschen. Durch Verwenden eines Air-lift Fermentors kann die Xylanase Aktivität um bis zu 60% erhöht werden. [24]

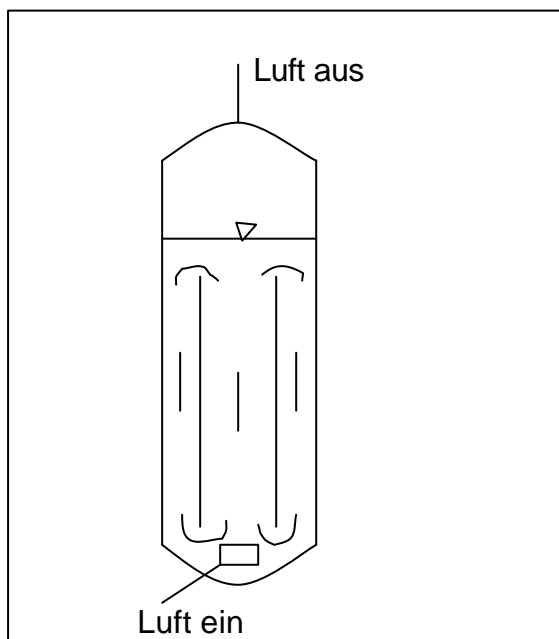


Abb. 11 Schema eines Air-lift Reaktors

Art und Geschwindigkeit des Rührwerks beeinflussen die Bildung von Xylanase von allen Betriebsparametern am stärksten. Der produzierende Mikroorganismus ist vor allem in der Anfangsphase besonders empfindlich, weshalb zu starke Scherkräfte auch eine verlängerte lag-Phase bewirken. Es wird empfohlen die Geschwindigkeit der Rührung in der Anfangsphase der Fermentation besonders gering zu halten.

Je nach Organismus und Substrat werden in der Literatur verschiedene Rührgeschwindigkeiten empfohlen.

So wurde für *Thermomyces lanuginosus* in normalen 300 mL Erlenmeyerkolben eine optimale Schüttelrate von 120 rpm bestimmt. In einem 42 L Reaktor mit „Intermig“ Rührwerk wurde eine optimale Rührgeschwindigkeit von 50rpm erhalten [26] .

In einen 15 m³ Reaktor mit einem Intermig Blatt- Rührwerk konnten die höchsten Xylanase Konzentrationen durch minimale Rührleistung (30rpm) erreicht werden. Um die Sauerstoffversorgung dennoch zu gewährleisten wurde die Belüftung auf 150 Nm³h⁻¹ (0,3 vvm) erhöht [28] .

b.) pH Wert

Ein weiterer wichtiger Einflußfaktor auf die Produktion von Xylanase ist der pH-Wert.

Für verschiedene Pilze wurde gezeigt, daß eine Fermentation bei ungünstigem pH-Wert, also bei Bedingungen die das Wachstum limitieren, zu einer erhöhten Bildung von Xylanase führt. Für *T. lanuginosus* zum Beispiel ist die Xylanasebildung bei einem konstantem pH von 7,5 deutlich höher als bei konstantem pH=6,5 (pH-Optimum des Enzyms). Dies wird von den Autoren durch die schlechtere Verfügbarkeit des hemizellulolytischen Substrats aufgrund des für die Xylanase ungünstigen pH-Werts erklärt. Der dadurch bedingte langsame Abbau der Hemizellulose und die längere Anwesenheit der induzierenden Substanzen führen zur verstärkten Xylanasebildung.

Es wurde außerdem gezeigt, daß ein Konstanthalten des pH-Wertes besonders wichtig ist. So konnte bei konstantem pH=7,5 eine um 50% höhere Endkonzentration an Xylanase beobachtet werden als bei einer Kultur mit nicht kontrolliertem pH-Wert ansonsten aber gleichen Bedingungen. Wird der pH-Wert während der Fermentation nicht kontrolliert verändert er sich sehr stark und zwar sehr verschieden je nach dem welcher Organismus verwendet wird. So wurden bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus* bei einem Start-pH-wert von 5,5 End-pH-Werte zwischen 2,7 und 8,8 beobachtet [29] .

Für die meisten Mikroorganismen begünstigt also ein konstanter pH-Wert, der leicht über dem pH Optimum der gebildeten Xylanase liegt, die Enzymproduktion. Dies gilt

aber nicht allgemein. So ist bei Pilzen, die stark zur Bildung von proteolytischen Enzymen neigen, ein niedrigerer pH Wert von Vorteil, da bei diesem pH-Wert die proteolytischen Enzyme inaktiviert werden. Da der Proteingehalt des Maisstrohs und auch des Kolbens relativ gering sind, ist das Problem der Bildung proteolytischer Enzyme aber eher gering. Dies wirkt sich auch positiv auf die Lagerfähigkeit der gewonnenen Xylanaselösung aus [24] .

c.) Belüftung

Für die verschiedenen Produzenten ist die optimale Sauerstoffkonzentration sehr unterschiedlich. So wurde für *Trichoderma reesei* gefunden, daß eine Sauerstoffkonzentration unter 10% der Luftsättigung sich stark negativ auf die Bildung von Xylanase auswirkt und eine Sauerstoffkonzentration von über 20% keine Verbesserung mehr bringt. Bei einigen Stämmen von *Trichoderma lanuginosus* beeinflussen hingegen auch sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen bis hin zu einer Sauerstofflimitierung die Xylanasebildung nicht negativ. Bei anderen Stämmen von *T. lanuginosus* wurden optimale Gelöstsauerstoffkonzentrationen bei mit mittleren Belüftungsraten gefunden [24] .

In Tabelle 5 sind mehrere Verfahren zur Herstellung von Xylanase in Submerskultur mit Maiskolben oder Maisstroh als Substrat dargestellt. Die meisten befinden sich in ihrer Entwicklung erst im Labormaßstab (Schüttelkolben). Die maximal erreichten Erträge liegen zwischen 10^7 und 10^8 Units Xylanase/kg Substrat.

Tab. 5a Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Bildung von Xylanase mittels Submerskultur (Maßstab = Schüttelkolben)

Organismus	Substrat [% im Medium]	Vorbehandlung	Medium [g/kg Substrat]	Temp. [°C]	pH	Schüttelgeschw. [rpm]	Daue r [d]	Xylanase [U/kg Substrat]	β-Xylosidase [U/kg Substrat]	Literatur
Aspergillus flavus	Kolben 3-4%	mahlen	Vogel[59]	30	9,0 ¹⁾	120	13	5,8 * 10 ⁶		20 59 (Medium)
Aspergillus tamarii	Kolben 5-8%	mahlen	Vogel[59]	30		120	5	5,0 * 10 ⁶	2,0 * 10 ⁵	30 59 (Medium)
Thermomyces lanuginosus DSM 5826	Kolben 3,1%	mahlen 2-7mm	Hefeextrakt 968 KH ₂ PO ₄ 160 (NH ₄) ₂ SO ₄ 128 CaCl ₂ 9,6 FeSO ₄ 9,6 MgSO ₄ 9,6	50	6,5 ¹⁾	120	7	6,9 * 10 ⁷		18
Therm. lanuginosus DSM 5826	Kolben 3%	mahlen	Hefeextrakt 477 KH ₂ PO ₄ 333 (NH ₄) ₂ SO ₄ 70 CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 FeSO ₄ ·7H ₂ O 17	50		150	7	4,8 * 10 ⁷		28
	Blätter 3%							1,3 * 10 ⁷		
	Stengel 3%							6,3 * 10 ⁶		

¹Start-pH, nicht konstant gehalten

Tab. 5a Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Bildung von Xylanase mittels Submerskultur (Maßstab = Schüttelkolben)
Fortsetzung

Organismus	Substrat [% im Medium]	Vorbehandlung	Medium [g/kg Substrat]	Temp. [°C]	pH	Schüttelrate [rpm]	Dauer [d]	Xylanase [U/kg Substrat]	β-Xylosidase [U/kg Substrat]	Literatur
Therm. lanuginosus MH4	Kolben 3%	schneiden trocknen, mahlen 2mm	Hefeextrakt 500 KH ₂ PO ₄ 333 (NH ₄) ₂ SO ₄ 70 CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 FeSO ₄ ·7H ₂ O 17 MgSO ₄ 10	50	6,0 ¹⁾	200	7	4,5 * 10 ⁶	1,3 * 10 ⁴	27
Therm. lanuginosus Stamm:	Kolben 2%	mahlen	Hefeextrakt 715 KH ₂ PO ₄ 500 (NH ₄) ₂ SO ₄ 105 CaCl ₂ ·2H ₂ O 15 FeSO ₄ ·7H ₂ O 25 MgSO ₄ 15	45 bzw. 50		200	5-6			31
ATCC 46882								1,4 * 10 ⁸	7,3 * 10 ⁴	
CBS 288.54								1,3 * 10 ⁸	6,0 * 10 ⁴	
RM-B								1,2 * 10 ⁸	4,8 * 10 ⁴	
CBS 395.62								1,1 * 10 ⁸	7,3 * 10 ⁴	
IMI 84400								1,2 * 10 ⁸	6,5 * 10 ⁴	
IMI 96213								1,1 * 10 ⁸	4,8 * 10 ⁴	
ATCC 34626								8,9 * 10 ⁷	nicht meßbar	
ATCC 16455								1,3 * 10 ⁸	7,5 * 10 ⁴	
Aspergillus foetidus	Kolben 3%	keine Angabe	Hefeextrakt 333 sonst keine genaueren Angaben	28°C	5,5 ¹⁾	150	4	1,8 * 10 ⁷		29
Aspergillus oryzae								7,5 * 10 ⁶		

¹Start-pH, nicht konstant gehalten

Tab. 5a Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Bildung von Xylanase mittels Submerskultur (Maßstab = Schüttelkolben)
Fortsetzung

Organismus	Substrat [% im Medium]	Vorbehandlung	Medium [g/kg Substrat]	Temp. [°C]	pH	Schüttelrate [rpm]	Dauer [d]	Xylanase [U/kg Substrat]	β-Xylosidase [U/kg Substrat]	Literatur
Aspergillus niger An-76	Stroh 100g/L→	Dampfaufschluß ²⁾	Medium KH ₂ PO ₄ 20 (NH ₄) ₂ SO ₄ 14 CaCl ₂ ·2H ₂ O 3 MgSO ₄ ·7H ₂ O 3 FeSO ₄ ·7H ₂ O 10mgFe ZnCl ₂ 8mgZn MnSO ₄ ·H ₂ O 5mgMn CoCl ₂ ·6H ₂ O 5mgCo	28		200	3-4	2,7 * 10 ⁵		25, 32 (Medium)
A.niger L22	15g/L Zucker							1,8 * 10 ⁵		
P. chryso-sporium	Stengel	mahlen <100µm	corn steep Fl 715 KH ₂ PO ₄ 133 (NH ₄) ₂ HPO ₄ 100 CaCl ₂ ·2H ₂ O 20 NaCl 33 MgSO ₄ 20 Struktol 67 Tween 80 67 Harnstoff 20	30	5,5 ¹	250	6	6,8 * 10 ⁶	7,9 * 10 ⁶	22

¹Start-pH, nicht konstant gehalten

²Das Material wurde nach der Dampfexplosion mit 10L heißem Wasser(75°C) pro kg Maisstroh extrahiert, die erhaltene Lösung enthielt 15g/L Zucker (davon 85% Pentosen), durch diese Vorbehandlung konnte eine Minimierung der gleichzeitigen Zellulasebildung erreicht werden

Tab. 5b Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Bildung von Xylanase mittels Submerskultur (Maßstab = pilot scale)

Organismus	Arbeitsvol. [L]	Substrat [% im Medium]	Medium	Rührergeschw. [rpm]	Belüftung (vvm)	Temp.	pH	Dauer [h]	Xylanase [U/kg Substrat]	β -Xylosidase [U/kg Substr.]	Literatur
Therm. lanuginosus RT9	10	Kolben 3%	Pepton 200 (NH ₄) ₂ SO ₄ 40 KH ₂ PO ₄ 500	200	1,0	50	6,5 ¹⁾	34	4,7 * 10 ⁷	4,0 * 10 ⁴	21
Therm. lanuginosus DSM 5826	30	Kolben 3,25%	Hefeextrakt 968 KH ₂ PO ₄ 154	50	O ₂ angereicherte Luft, wird automatisch auf 40% Sättigung gehalten	50	7,5 ¹⁾	118	6,5 * 10 ⁷		28
Therm. lanuginosus DSM 5826	15000	Kolben 3%	Hefeextrakt 477 KH ₂ PO ₄ 333 (NH ₄) ₂ SO ₄ 70 CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 FeSO ₄ ·7H ₂ O 17	30	0,3 (pO ₂ ca. 5-8%)	50	6,0 ²⁾	60	2,6 * 10 ⁷		26

¹Start-pH-Wert, nicht konstant gehalten

²pH-Wert wurde reguliert

2.6 Herstellung von Xylanase mittels Feststofffermentation

Prinzipiell gelten die für die Submerskultur angeführten Bedingungen auch für die Feststofffermentation. Einige spezifische Besonderheiten der Xylanaseproduktion mittels Feststofffermentation sind im folgenden dargestellt. Die aus der Literatur bekannten Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Ausbeuten liegen im Bereich der Submerskultur.

a.) Stickstoffquelle

Der Zusatz einer komplexen Stickstoffquelle erhöht hier wie auch bei der Submerskultur die Produktion von Xylanase und verkürzt auch die lag-Phase.

Für *Thermomyces lanuginosus* wurde eine optimale Konzentration von Hefeextrakt von 1,75% gefunden. Bei höheren Konzentrationen nahm die Bildung von Xylanase wieder ab. Der Ertragskoeffizient bezogen auf die Stickstoffquelle wurde berechnet und lag mit 2586 U/mg N fast viermal so hoch wie bei einer Fermentation des selben Produzenten in Submerskultur (678 U/mg N) [18].

Da die Kosten für Hefeextrakt sehr hoch sind, müssten auch hier alternative Stickstoffquellen wie Maisquellwasser verwendet werden.

b.) Wassergehalt

Der Wassergehalt beeinflusst die Bildung von Xylanase sehr stark. Der optimale Wert ist für jeden Organismus etwas unterschiedlich. So bildet *Aspergillus tamaris* auf Maiskolben bei 70% Wassergehalt nur etwa ein Drittel der Menge an Xylanase, die bei 80% gebildet werden. Für *Thermomyces lanuginosus* hingegen liegt der optimale Wert bei 70%. [18,23]

c.) Rühren

Noch stärker wie bei der Submerskultur wirkt sich zu starkes Rühren negativ auf die Bildung von Xylanase aus, da das Pilzmycel dadurch zerstört wird. Deshalb wird empfohlen die Fermentation statisch durchzuführen und den Reaktortyp dementsprechend zu wählen (siehe Kapitel I.4.2)

Tab.6 Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema Bildung von Xylanase mittels Feststofffermentation (Maßstab=Schüttelkolben)

Organismus	Substrat	Medium [g/kg Substrat]	Wasser- gehalt[%]	Temp [°C]	Dauer [h]	Xylanase [U/kg Substrat]
Aspergillus tamarii	Maiskolben	Vogel[59]	80	30	6	870 U/g DW
Thermomyces lanuginosus	Maiskolben	Hefeextrakt 5,8 KH ₂ PO ₄ 30 (NH ₄) ₂ SO ₄ 5,7 CaCl ₂ 4,3 FeSO ₄ 1,6 MgSO ₄ 4,3	70	50	9	2,0 * 10 ⁷
Chaetomium cellulolyticum ATCC32319	Maisstroh	(NH ₄) ₂ SO ₄ 35 KNO ₃ 168 KH ₂ PO ₄ 175 MgSO ₄ .7H ₂ O 87,5 FeSO ₄ .7H ₂ O 0,35	50	37	10	350 U/g

3. Lignin abbauende Enzyme

3.1 Laccase

Laccase ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe extrazellulärer Kupferoxidasen, die fähig sind, die sauerstoffabhängige Oxidation von ortho- und para-Diphenolen zu katalysieren. Dies geschieht durch den Abzug eines Elektrons von der Hydroxylgruppe, wobei Aryloxyradikale entstehen, die nicht enzymatische Kopplungsreaktionen eingehen können. Laccase baut Lignin ab und kann auch nicht-phenolische Substanzen oxidieren, wenn ein passendes Primärsubstrat vorhanden ist.

3.1.1 Anwendungsmöglichkeiten für Laccase[34]

a.) Entfernung von Lignin aus lignozellulärem Material

Vor allem in der Papierherstellung ist die Entfernung von Lignin aus dem lignozellulären Rohmaterial notwendig, was momentan durch stark oxidierende Reagentien wie z.B.: ClO_2 oder Ozon geschieht. Diese Verfahren haben den Nachteil, daß chlorierte Kohlenwasserstoffe gebildet werden, die stark umweltbelastend wirken. Außerdem kommt es zu einer Verringerung der Faserlänge der Zellulose.

Hier stellt die Verwendung von Laccase zusammen mit Xylanase eine alternative Möglichkeit dar die notwendige Menge an Chemikalien zu reduzieren, indem Lignin zum Teil abgebaut wird und vor allem die Struktur des Lignins gelockert wird um den Angriff durch die Chemikalien effizienter zu machen.

b.) Herstellung von Verbundplatten

Hier kann Laccase als sogenannter „Biokleber“ fungieren und auf drei verschiedene Arten eingesetzt werden. Es können durch Oxidation der Holz- bzw. Zellstoffpartikel Radikale gebildet werden, die für die Quervernetzung notwendig sind. Bei der zweiten Variante werden die Holzteilchen mit funktionalen Gruppen wie Aromaten, Säuregruppen und Isocyanate, die dann als querverbindende Reagentien agieren. Drittens kann reines Lignin, daß in vielen Prozessen wie zum Beispiel der Papierherstellung als Abfallprodukt anfällt durch Laccase in einen radikalreichen "Klebstoff" verwandelt werden. So kann Laccase die herkömmlich verwendeten Chemikalien wie Isocyanate, Formaldehyd oder petrochemische Harze ersetzen, die meist sehr gefährlich sind.

c.) Abwasserreinigung

Laccase kann verwendet werden, um verschiedene aromatische Umweltgifte aus industriellen Abwässern oxidativ zu entfernen. Die Giftstoffe können direkt abgebaut werden oder die Bildung von Radikalen kann zur Polymerisation der Substanzen führen. Diese werden dadurch häufig wasserunlöslich und können so leicht entfernt werden.

d.) Bekleidungsindustrie

In der Bekleidungsindustrie kann Laccase zum Bleichen eingesetzt werden, wenn es sich um phenolische Farbstoffe wie Indigo handelt. Außerdem können mit Hilfe von Laccase Farbstoffe oxidativ umgewandelt und so an die Collagen-Matrix von Fellen gebunden werden. Lösliche Farbstoffe können absorbiert, oxidiert und polymerisiert werden um den gewünschten färbenden Effekt zu erreichen.

e.) Haarfärbung und in Wellen legen

Die derzeit verwendeten oxidierenden Chemikalien haben einen unangenehmen Geruch, schädigen die Handtücher und sind unangenehm handzuhaben. Ein auf Laccase basierendes System könnte bei mildereren Bedingungen eingesetzt werden und aggressive Chemikalien würden vermieden werden. Eine Laccase katalysierte Oxidation, Umwandlung und Querverbindung einer Vorläuferverbindung (meistens Phenole oder Aniline) führt zu den erwünschten Farbergebnissen.

f.) In situ Bildung von Iod

Laccase kann Iodid zu Iod oxidieren, das häufig als Desinfektionsmittel eingesetzt wird. Der Vorteil gegenüber dem direkten Einsatz des Iods ist die längere Haltbarkeit des Iodidsalzes und es ist auch sicherer im Transport, der Lagerung und im Gebrauch. Dieses System könnte in der Sterilisation von Trinkwasser, für Swimmingpools aber auch für die Desinfektion kleinerer Wunden eingesetzt werden.

g.) Lebensmittelindustrie

Braunfärbung und Trübung sind wichtige Probleme in der Produktion von Fruchtsäften und Weinen. An diesen Prozessen sind phenolische Verbindungen beteiligt. Normalerweise werden diese an Verbindungen wie Gelatine absorbiert und entfernt, was aber nur sehr unspezifisch funktioniert und Farbe und Aroma des Produkts beeinflussen kann. Laccase könnte diese phenolischen Verbindungen entfernen und die Klarheit und Farbe der Säfte verbessern. Die durch die Behandlung mit Laccase polymerisierten und ausgefällten Substanzen können abfiltriert werden.

h.) Organische Synthese

Laccase kann in der organischen Synthese zur Herstellung oder Umwandlung von Polymeren verwendet werden. Außerdem ist die Herstellung komplexer medizinisch wirksamer Substanzen mit der Hilfe von Laccase möglich. Durch den Einsatz von Laccase kann bei milderer Bedingungen in Bezug auf Temperatur, pH und Lösungsmittel gearbeitet werden. Außerdem ist die Regioselektivität der Reaktion leichter zu steuern.

i) Biosensoren und enzymatische Assays

Mit der Hilfe von Laccase können Biosensoren zur Bestimmung von Phenol, Aniline Sauerstoff und anderer Substanzen hergestellt werden.

Kovalent an Antikörper gebunden kann Laccase als Markerenzym auch in immunochemischen Assays verwendet werden.

3.1.2 Herstellung von Laccase mit Maisstroh als Substrat [35,36]

Laccase kann mittels Feststofffermentation oder Submerskultur hergestellt werden mit den schon in den vorangegangenen Kapiteln erwähnten Vor- und Nachteilen.

a.) Organismus

Viele Pilze (vor allem Weißfäulepilze) können alle Hauptbestandteile von lignozellulärem Material abbauen und bilden dadurch neben Xylanase und Zellulase auch Lignin abbauende Enzyme wie Laccase. Aufgrund der möglichen Bildung von Mycotoxinen (Pilzgiften) sollten vor allem bei einem Einsatz der Laccase in der Lebensmittelindustrie Pilze gewählt werden bei denen die Bildung solcher Gifte ausgeschlossen werden kann, wie z.B.: bei den essbaren Pilzen *Lentinus edodes* oder *Pleurotus ostreatus*. Der Basidiomycet *Lentinus edodes* produziert Laccase und andere ligninabbauende Enzyme wie Manganperoxidase vor allem während des primären vegetativen Wachstums, wohingegen *Pleurotus ostreatus* diese Enzyme

vor allem während der Idiophase (stationäre Phase) synthetisiert. Deshalb ist die Herstellung mit *L. edodes* bedeutend schneller als mit *P. ostreatus*.

b.) Medium und Fermentationsbedingungen

Obwohl die Autoren eine Laccaseproduktion sowohl mittels Feststofffermentation als auch mittels Submerskultur als möglich erachten wird in weiterer Folge nur noch die Feststofffermentation beschrieben. Auf etwa 2 cm geschnittenes Maisstroh dient hier als Substrat. Durch Zusatz des Mediums wird das Gemisch auf einen Wassergehalt von etwa 65% gebracht. Nach Sterilisation und Inokulation wird bei 28°C statisch inkubiert.

c.) Aufbereitung

Nach der Feststofffermentation erhält man durch hydraulisches Pressen und anschließende Filtration die rohe Enzymlösung, nach einer Submersfermentation durch bloße Filtration. Die gewonnene Lösung wird für 30 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Der blaßbraune Überstand wird durch Zusatz von Polyethylenimin gereinigt und die enthaltenen Proteine anschließend mit einem Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer etwa 85%igen Sättigung ausgefällt. Nach Zentrifugation (11.000 g, 30 min) wird der Niederschlag in 10mM Imidazol-HCl-Puffer (pH=6) wieder aufgenommen und in einer gerührten Zelle mit einer Diaflo Membran (Cut-off 10 KDa) aufkonzentriert.

Sehr reine Laccase mit einer spezifischen Aktivität von 192 U/mg kann durch Anionentauscherchromatographie und zweistufige Affinitätschromatographie erhalten werden. Die Ausbeute beträgt dabei 7,45%.

3.1.3 Eigenschaften des Enzyms

Die erhaltene Laccase hat ein Molekulargewicht von 74 kDa, einen isoelektrischen Punkt von 3,42 und einen Kohlehydratanteil von 7,5%. Das Absorptionsmaximum liegt bei 605nm, was typisch für Blau-Kupfer-Oxidasen ist. Das pH Optimum liegt zwischen 4,0 und 4,2, das Temperaturoptimum bei 50°C. Die Reaktivität des Enzyms gegenüber verschiedenen phenolischen Verbindungen ist sehr unterschiedlich.

3.2 Andere ligninabbauende Enzyme[37]

Neben Laccase gibt es noch weitere Enzyme, die fähig sind Lignin abzubauen, wie z.B.: Manganperoxidase(MnP) und Ligninperoxidase (LiP). Die Verwendungsmöglichkeiten dieser Enzyme sind zum Teil denen der Laccase ähnlich. Eine Herstellung dieser Enzyme mit dem äußeren oder inneren Maiskolben als Substrat wird beschrieben.

Unter gewissen Bedingungen bildet der weißfäule Basidiomycet *Phanerochete chrysosporium* die ligninabbauenden Enzyme MnP und LiP. Diese Enzyme unterscheiden sich in der katalytischen Wirkung.

LiP zieht ein Elektron von einem aromatischen Ring im Lignin oder ähnlichen Substanzen ab was zur Bildung eines kationischen Radikals führt und zur darauf folgenden Spaltungsreaktion. MnP bildet Mangan in der Oxidationsstufe +3, eine hochreaktive Zwischenverbindung, die sich vom aktiven Zentrum des Enzyms lösen und Lignin oxidieren kann.

3.2.1 Medium und Fermentationsbedingungen

Obwohl *P. chrysosporium* Lignin abbaut, kann er es nicht als einzige Kohlenstoffquelle verwenden und benötigt die Anwesenheit von anderen Substraten wie Zellulose, das im Maiskolben ja ebenfalls enthalten ist.

Die Bildung dieser ligninolytischen Enzyme wird vor allem durch Stickstoffmangel während der Sekundärmetabolismuswachstumsphase begünstigt. Auch eine Limitierung von Schwefelverbindungen begünstigt die Bildung von MnP und LiP.

Die Produktion dieser Enzyme wird mittels Feststofffermentation empfohlen, da dies preisgünstiger ist und außerdem den natürlichen Lebensbedingungen der Weißfäulepilze am ehesten entspricht.

Der innere Teil des Maiskolben, der sich laut den Autoren auf Grund des höheren Ligningehalts besser als Substrat eignet als der äußere Maiskolben wird mit dem Medium auf einen Wassergehalt von 84% gebracht. Nach Inokulation mit 10%(v/v) homogenisiertem Mycel werden die Erlenmeyerkolben mit Sauerstoff gespült und verschlossen bei 37°C statisch inkubiert. Das Spülen mit Sauerstoff wird jeden Tag wiederholt.

Der Zusatz von Tween 80(Sorbitanpolyoxyethylenmonolaurat) erhöht die Bildung von LiP und MnP deutlich.

Der Stickstoff ist nach etwa einem Tag verbraucht (bei Zusatz von Tween 80 nach zwei Tagen). Danach beginnt die Bildung von LiP und MnP im Medium. Nach elf Tagen erreicht die MnP mit 384 U/L ihr Maximum, die LiP hat ein Maximum schon nach einem Tag (150 U/L) und liegt danach etwa bei 50 U/mL

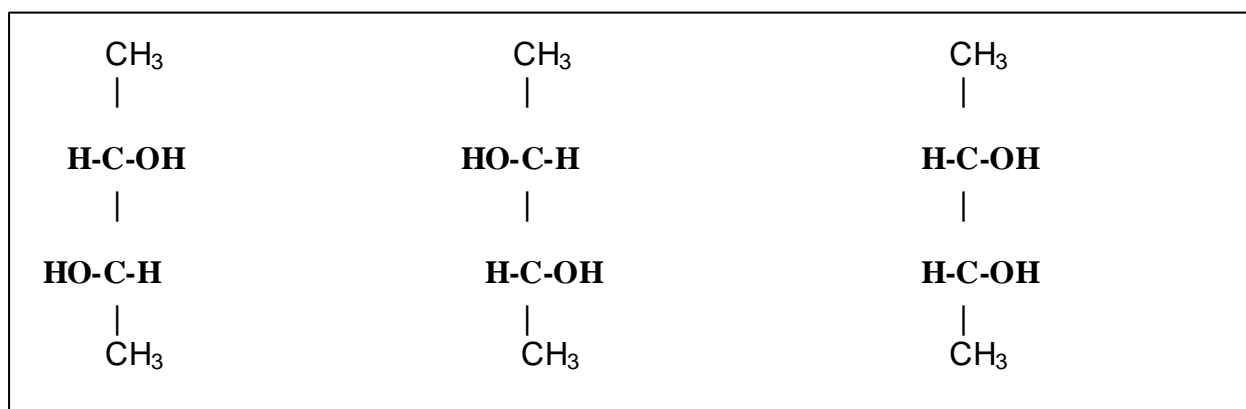
Tab.7 Ertrag an MnP und LiP nach elf Tagen mit und ohne Zusatz von Tween zum Medium

	MnP [U/kg Substrat]	LiP [U/kg Substrat]
mit Tween	2050	128
ohne Tween	1570	128

4. 2,3 Butandiol

4.1 Allgemeines

Diese Verbindung mit der Summenformel $C_4H_{10}O_2$ kann in drei verschiedenen enantiomeren Formen vorliegen, die in Abbildung 12 dargestellt sind. Sie haben zum Teil verschiedene physikalische Eigenschaften wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist. 2,3 Butandiole sind farb- und geruchlose, stark hygroskopische ölige Flüssigkeiten oder Kristalle mit leicht süßem Geschmack. Sie sind mit Wasser mischbar und gut in niedermolekularen Alkoholen und Ketonen löslich.



2S,3S-2,3-Butandiol

2R,3R-2,3-Butandiol

(R,S)-2,3-Butandiol

Abb.12 Enantiomere Formen von 2,3 Butandiol

Tab.8 Eigenschaften der verschiedenen Enantiomere von 2,3 Butandiol[39]

	2S,3S-2,3-Butandiol	2R,3R-2,3-Butandiol	(R,S)-2,3-Butandiol	Racemat
Schmelzpunkt [°C]	25	19,7	34,4	7,6
Siedepunkt [°C]	179-182	179-180	181,7	182,5
Opt. Drehung $[\alpha]_D^{25}$ [°]	+11,8	-13	-	-
Viskosität(35°C) [mPa*s]		21,8	65,6	

4.2 Anwendungsmöglichkeiten von 2,3 Butandiol

Butandiol hat einen Heizwert von 27200 kJ/kg und es diesbezüglich vergleichbar mit Methanol (22100 kJ/kg) und Ethanol (29100 kJ/kg) und wäre somit als Treibstoff einsetzbar. Bei dieser Anwendung muß das bei der Fermentation ebenfalls gebildete Ethanol nicht abgetrennt werden. Außerdem zeichnet sich Butandiol durch eine sehr hohe Oktanzahl aus.[40]

2,3 Butandiol kann schrittweise zu 2-Butanon und anschließend zu 1,3 Butadien dehydratisiert werden. Ersteres ist ein industrielles Lösungsmittel für Lacke und Harze und kann durch Hydrieren in Oktanisomere für qualitativ hochwertige Luftfahrtstreibstoffe umgewandelt werden. Butadien kann weiter zu Styren verarbeitet werden, das ein Ausgangsprodukt für Kunststoffe und Harze ist.[41]

Die Veresterung von 2,3 - Butandiol führt zu Vorstufen von Polyurethanschäumen, die in der Medizin und in kosmetischen Produkten eingesetzt werden. Butandiolester wirken außerdem antibakteriell. Schon eine 0,1 %ige Lösung tötet die meisten pathogenen Keime ab, aber auch auf nicht pathogene Keime wirkt der Diacethylester stärker toxisch als Benzoesäure.[42]

Diacetyl, gebildet durch katalytische Dehydrogenierung des Diols, ist ein hochwertiger Lebensmittelzusatz, der als Geschmacksstoff verwendet wird. [40]

Butandiol könnte auch bei der Herstellung von Druckerfarbe, Weichmachern, Sprengstoffen und als Träger für Pharmazeutika eine wichtige Rolle spielen.[40]

4.3 Produktion von 2,3 Butandiol mit Maisstroh und Maiskolben als Substrat

4.3.1 Organismus

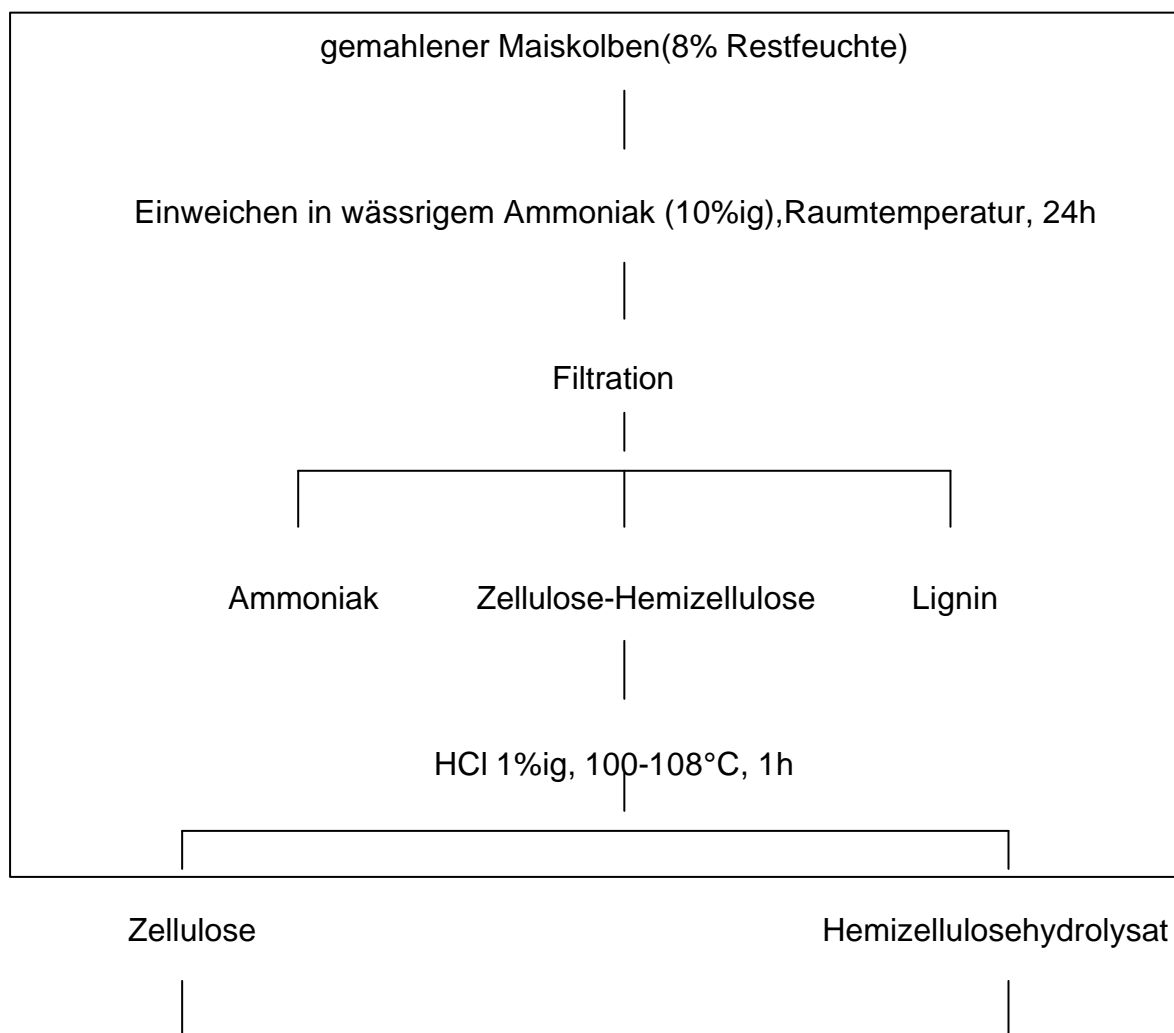
Sehr viele Hefen können Butandiol bilden, aber mit sehr geringer Ausbeute. Bakterien sind momentan die einzigen Butandiolbildner von industrieller Bedeutung. Viele Spezies von Klebsiella, Bacillus, Serratia und Pseudomonas können Butandiol bilden, aber vor allem Klebsiella pneumoniae und Bacillus polymyxa werden industriell verwendet. Klebsiella pneumoniae und Klebsiella oxytoca haben den Vorteil von höheren Erträgen und sind fähig die meisten in Zellulose und Hemizellulose enthaltenen Zucker zu verwerten. Allerdings bilden diese Bakterien keine Exoenzyme um die Polysaccharide abzubauen, weshalb die Hydrolyse im Rahmen der Vorbehandlung geschehen muß oder der Fermentation die nötigen Enzyme zugesetzt werden müssen. [42, 43]

4.3.2 Vorbehandlung

Auch zur Herstellung von 2,3 Butandiol ist die Dampfexplosion die häufigste Art der Vorbehandlung (siehe auch Kapitel I.1.4.2). Nach diesem Aufschluß des Materials kann sowohl die Hemizellulosefraktion als auch der zellulosehaltige Rest hydrolysiert und für die Fermentation zu Butandiol verwendet werden. Obwohl beide Polysaccharide als Substrat verwendet werden können, ist es notwendig Hemizellulose und Zellulose voneinander zu trennen, da die bakterielle Verwertung von Pentosen sehr viel langsamer abläuft als die von Hexosen.

Neben der einfachen Dampfexplosion, bei welcher die Hemizellulose und zum Teil auch das Lignin in einem Schritt abgetrennt werden, gibt es auch komplexere Vorbehandlungsarten. So können durch eine Kombination verschiedener Methoden die einzelnen Fraktionen (Lignin, Hemizellulose, Zellulose) relativ rein gewonnen werden. Abbildung 13 gibt einen Überblick über ein solches Verfahren. Zuerst wird durch Einweichen in wässriger Ammoniaklösung und anschließender Filtration der Ligninanteil entfernt (0,85% Restligningehalt). Die anschließende Hydrolyse mit

verdünnter Salzsäure löst die Hemizellulose und der verbleibende Feststoff besteht zu 90% aus Zellulose mit etwa 5% Restanteil an Hemizellulose. Nach diesem Verfahren kann die bereits hydrolysierte Hemizellulose direkt weiter zu Butandiol fermentiert werden. Die Zellulosefraktion eignet sich wegen ihrer hohen Reinheit für eine anschließende kombinierte enzymatische Hydrolyse und Fermentation besonders gut. Verunreinigungen von Hemizellulose und Lignin würden die zur Hydrolyse eingesetzten Enzyme adsorbieren und inaktivieren. Durch die Vorbehandlung und dem damit verbundenen Schwellen wurde die Porosität und damit die Zugänglichkeit für die Zellulase stark erhöht. Um diesen Vorteil nützen zu können, darf die Zellulose aber nicht getrocknet werden, sondern muß direkt weiterverarbeitet werden. Die in diesem Verfahren gewonnene Ligninfraktion ist chemisch unverändert und könnte nach der Entfernung des Ammoniaks weiterverwertet werden. Bis zu 98% des Ammoniaks können wiedergewonnen werden, indem man bereits bekannte Technologien aus der Ammoniakindustrie verwendet [43] .



simultane Hydrolyse und Fermentation

|

Butandiol, Ethanol

Fermentation

|

Butandiol, Ethanol

Abb.13 Vorbehandlung zur Trennung von Lignin, Zellulose und Hemizellulose[43]

Die Hydrolyse der Hemizellulose kann auch simultan mit der Fermentation zu 2,3-Butandiol erfolgen. Bei der simultanen Hydrolyse und Fermentation der Hemizellulose ist es von Vorteil, die Mikroorganismen erst einige Zeit (etwa einen Tag) nach den hydrolysierenden Enzymen zuzusetzen, um von Beginn an eine ausreichende Versorgung mit Substrat zu gewährleisten. Der genaue Zeitabstand zwischen dem Start der Hydrolyse und der Zugabe des Inokulums beeinflusst das Ergebnis aber nur gering [44].

Werden für die Hydrolyse nicht reine Enzyme sondern ungereinigte Fermentationsbrühen verwendet, so können diese Inhibitoren enthalten, die das Wachstum der butandiolbildenden Bakterien hemmen. Dies wurde bei der Verwendung eines aufkonzentrierten Fermentationsfiltrats von *Trichoderma harzianum* beobachtet. Bei höherer Substratkonzentrationen wurde eine wesentlich geringere Bildung von 2,3 Butandiol gefunden, was auf inhibierende Substanzen im mit Dampf vorbehandeltem Substrat zurückzuführen ist. Bei diesen Substanzen könnte es sich um Verbindungen wie Furfural oder Hydroxymethylfurfural handeln, die bei der Hitzebehandlung des lignozellulären Substrats gebildet werden [44].

Das vorher beschriebene Trennungsverfahren, das in Gegensatz zur Dampfexplosion bei etwas niedrigeren Temperaturen (ca. 100°C statt über 200°C) abläuft, hat also nicht nur den Vorteil, daß sie verschiedenen Fraktionen relativ rein gewonnen werden, sondern auch die geringere Wahrscheinlichkeit der Bildung von inhibierenden Substanzen.

4.3.3 Fermentationsbedingungen

Häufig unterscheiden sich die optimalen Werte für Temperatur und pH-Wert der hydrolytischen Enzyme und der Butandiol bildenden Mikroorganismen. Die Differenz dieser Werte sollte durch die Wahl von Enzym und Organismus möglichst gering gehalten werden.

Die Enzyme sollten über die ganze Dauer der Fermentation aktiv sein. Das Temperaturoptimum der Butandiolbildung liegt zwischen 30° und 35°C. Da die Butandiolbildung wachstumsassoziiert ist, liegt die optimale Wachstumstemperatur im gleichen Bereich [42]. In diesem Temperaturbereich sollte die verwendete Xylanase daher ausreichend stabil sein.

Allgemein kann gesagt werden, daß ein erhöhter pH-Wert (über pH 6,3-6,5) die Bildung von organischen Säuren begünstigt und damit die Butandiolausbeute zurückgeht. Das genaue pH Optimum unterscheidet sich stark abhängig vom verwendeten Substrat. Unter einem pH-Wert von 4,2 konnte aber keine Butandiolbildung mehr beobachtet werden. Obwohl die Bildung von 2,3 Butandiol ein anaerober Prozeß ist, fördert verstärkte Rührung die Produktbildung. Dies könnte auf die Entfernung des gebildeten CO₂ zurückzuführen sein. Zu starke Belüftung führt aber zu einem Rückgang der Butandiolbildung [42].

4.3.4 Produktgewinnung

Das Problem bei der Gewinnung von 2,3 Butandiol ist der hohe Siedepunkt und die starke Affinität zu Wasser. Bei der Destillation entsteht vor dem Erreichen des Siedepunktes eine dicke, zähe Masse, die ein Abdestillieren des Butandiols unmöglich macht.

Deshalb wird wiederholte Extraktion verwendet um Butandiol abzutrennen. Dafür eignen sich verschiedene Lösungsmittel wie Ethylacetat, Diethylether und n-Butanol.

In Tabelle 8 sind zwei Methoden zur Gewinnung von Butandiol aus Maisstroh und Maiskolben zusammengefaßt. Der Ertrag ist bei der Fermentation des

Hemizelluloseanteils beinahe gleich groß wie bei der Verwertung des Zelluloseanteils.

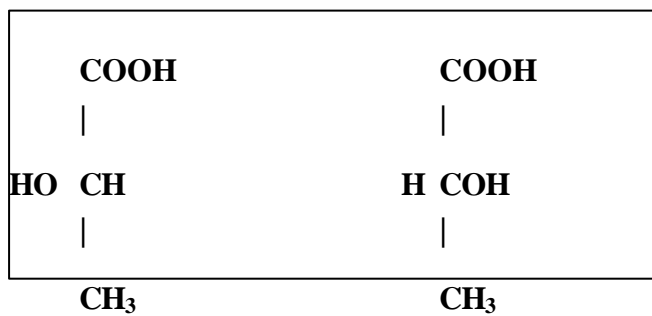
Tab. 8 Übersicht über die Veröffentlichungen zum Thema 2,3 Butandiolbildung mit Maiskolben bzw. –stroh als Substrat

Organismus	Substrat	Medium [g/kg Substrat]	Vorbehandlung	Hydrolyse	pH	Temp [°C]	Butandiol	Literatur
Klebsiella oxytoca	Zellulose aus Maiskolben 160g/L	Hefeextrakt 19	siehe Abb.4.2	simultan 8500 U/kg Zellulose		35	155 g/kg Zellulose	54
		Malzextrakt 19						
		Pepton 31						
Klebsiella pneumoniae	Hemizellulose aus Maisstengel 20g/L	Yu and Saddler	steam explosion 30 sec, Trocknen	ein Tag Hydrolyse dann Zusatz von Inokulum $3 \cdot 10^6$ U/kg Hemi- zellulose	6,5	30	130 g/ kg Hemizellulose	B7

5. Milchsäure

5.1. Allgemeines

Milchsäure oder 2-Hydroxypropansäure kommt in zwei enantiomeren Formen vor (siehe Abbildung 14), die sich in ihren physikalischen Eigenschaften zwar zum Teil unterscheiden, beide sind aber ebenso wie das Racemat für die meisten Anwendungen einsetzbar. (Tabelle 9)



L(+)-Milchsäure

D(-)-Milchsäure

Abb.14 Verschiedene enantiomere Formen der Milchsäure

Tab.9 Eigenschaften der beiden Enantiomere und der racemischen Gemisches [45]

	L(+)	D(-)	DL Racemat
Molekulargewicht	90,08	90,08	90,08
Schmelzpunkt[°C]	25-26	26-27	18
Siedepunkt[°C]	-	103	82-85
opt. Drehung[α] _D ²⁰ [°]			
Säure	+2,5	-2,5	-
Zinksalz	-8,2	+8,18	-
Diss. Konstante	1,9*10 ⁻⁴	-	1,38*10 ⁻⁴
pK(25°C)	3,79	3,83	3,73

Milchsäure bildet ein Dimer und auch höhere lineare Polymere in denen die Hydroxylgruppe des einen Moleküls mit der Säuregruppe des anderen verestert ist. Außerdem entsteht bei Temperaturen über 140°C und niedrigem Druck ein analog

aufgebautes zyklisches Dimer, das besonders gut als Ausgangsprodukt für die Synthese biologisch abbaubarer Polymere geeignet ist.[45]

5.2. Anwendungsmöglichkeiten für Milchsäure [45,46,47]

a.) Lebensmittelindustrie

Beinahe 85% der hergestellten Milchsäure wird in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Die hier verwendete Milchsäure sollte farblos und fast geruchlos sein.

Aufgrund ihres milden säuerlichen Geschmacks, der schwächere Aromen nicht überdeckt, wird Milchsäure häufig in der Herstellung von Getränken, Fruchtsirups, Marmeladen und Gelees eingesetzt. Außerdem findet sie aufgrund ihrer konservierenden Eigenschaften Einsatz in der Konservenindustrie und als 2%ige Lösung in der antimikrobiellen Behandlung von Fleisch und Geflügel. Bei der Herstellung von Milchprodukten wie Hüttenkäse wird die direkte Ansäuerung mit Milchsäure einer Fermentation häufig vorgezogen, um die damit verbundenen Risiken einer Kontamination zu vermeiden. In Bier und Obstwein mit geringem Eigensäuregehalt verbessert Milchsäure Geschmack und Haltbarkeit, vor allem weil sie gegenüber säureabbauenden Bakterien resistent ist. Ein Ersatz eines Teils des Essigs beim Einlegen von Gurken, Zwiebeln oder Fisch durch Milchsäure führt zu einem milderem Geschmack und verlängerter Haltbarkeit.

Kalziumlactat wird als Geschmacksverstärker, Stabilisator und Eindicker verwendet. Außerdem ist es eine gute Kalziumquelle für den Körper und wird sogar in der Behandlung von Kalziummangel eingesetzt. Kalium- und Natriumlactat sind Geschmacksstoffe und Geschmacksverstärker und dienen zur pH-Wert-Kontrolle. Lebensmittelzusatzstoffe, die durch Reaktion der Milchsäure mit verschiedenen Fettsäuren gebildet werden, sind Teigverbesserer, Emulgatoren und Weichmacher.

b.) Kunststoff- und Lackherstellung

Die Milchsäure muß absolut farblos und zum Teil auch von sehr niedrigem Aschegehalt sein. Es werden Lacke, Glasuren, imprägnierende Substanzen wie auch Polymere hergestellt. So wird Polymilchsäure in konzentrierten erwärmten Lösungen spontan gebildet. Diese Kunststoffe sind biologisch abbaubar und daher gut für Wundklammern, chirurgische Fäden und andere medizinische Materialien verwendbar. Aber auch biologisch abbaubares Verpackungsmaterial ist ein mögliches Einsatzgebiet.

c.) Kosmetik

Durch Reaktion von Milchsäure mit verschiedenen Fettsäuren entstehen Produkte, die als Emulgatoren und Stabilisatoren in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden. Milchsäure wird als „ α -Hydroxysäure“ in Hautpflegeprodukten als hautverschönernd und faltenreduzierend beworben.

d.) Industrielle Anwendungen

Alkylactatester, im besonderen Ethyl- und Butylester, sind auf Grund ihrer geringeren Giftigkeit attraktive Alternativen zu Glykolethern und anderen Lösungsmitteln. Der Ethylester der L(+)-Milchsäure könnte als Ersatz von chlorierten Kohlenwasserstofflösungsmitteln in der Metallreinigung in der Elektronik, der Halbleitertechnik und der Luftfahrt dienen.

5.3. Herstellung von Milchsäure mit Maiskolben als Substrat

Da die Milchsäure bildenden Mikroorganismen nicht fähig sind die im Maiskolben und Maisstroh enthaltenen Polysaccharide als Kohlenstoff und Energiequelle zu nutzen, müssen diese hydrolysiert werden. Diese Hydrolyse kann im Rahmen der Vorbehandlung erfolgen oder auch simultan mit der Fermentation erfolgen.

5.3.1 Vorbehandlung

Milchsäurebildende Bakterien sind nicht in der Lage Polysaccharide wie Zellulose oder Hemizellulose direkt zu verwerten. Deshalb muß das lignozelluläre Substrat vorbehandelt werden. Im Zuge dieser Vorbehandlung muß die Zellulose hydrolysiert werden und die Hemizellulose und das Lignin entfernt werden. Die Hydrolyse der Zellulose wird enzymatisch durchgeführt. Die Entfernung des Hemizelluloseanteils ist notwendig, da die meisten milchsäurebildenden Bakterien Monosaccharide wie Xylose nur schlecht oder gar nicht verwerten können. Die Entfernung des Lignins ermöglicht einen effektiveren Einsatz der zellulolytischen Enzyme, die ein wesentlicher Kostenfaktor bei der Produktion von Milchsäure aus lignozellulärem Material sind. Die Möglichkeiten der Vorbehandlung vor der enzymatischen Hydrolyse entsprechen den in 1.1.4 *Herstellung von Zellulase mittels Feststofffermentation* besprochenen Varianten.

Für die enzymatische Hydrolyse wird Zellulase verwendet, die ebenfalls aus Maisstroh oder Maiskolben hergestellt werden kann (siehe Kapitel 1.1).

5.3.2 Organismus und Fermentationsbedingungen

Die verwendeten Mikroorganismen sind Spezies von *Lactobacillus*. Abhängig vom verwendeten Organismus unterscheiden sich auch die optimalen Fermentationsbedingungen. Bei der simultanen Hydrolyse und Fermentation empfiehlt es sich einen Organismus zu wählen, dessen Temperaturoptimum

möglichst im Bereich von etwa 50°C liegt, wo auch die meisten Zellulasen ihr Optimum haben.

Milchsäure wird mittels Submerskultur hergestellt, in der pH-Wert und Temperatur am jeweiligen Optimum des Organismus konstant gehalten werden. Da es sich um einen anaeroben Prozeß handelt ist eine Sauerstoffversorgung nicht notwendig und die Rührung erfüllt nur den Zweck einer möglichst guten Durchmischung.

5.3.3 Getrennte Hydrolyse und Fermentation zu Milchsäure [48,49]

Mit Maiskolbenhydrolysat können ähnliche Ertragskoeffizienten $Y_{L/S}$ (L...Milchsäure, S...Glukose) erzielt werden, wie mit einem künstlichen Medium. Der mittlere Ertragskoeffizient lag bei etwa 0,8 g Milchsäure/g Hexose . Der theoretische Wert dieses Koeffizienten liegt bei 1 g/g.

Durch die Verwendung eines Membranbioreaktors (ein kontinuierlicher Rührkessel kombiniert mit einem Membranmodul, das niedermolekulare Verbindungen, wie z.B.: Milchsäure, ins Permeat läßt, das aber die Zellen zurückhält, die dann in den Reaktor zurückgeführt werden können) sollte durch eine höhere Biomassekonzentration die Produktivität erhöht werden. Die erhaltene Konzentration an Milchsäure im den Reaktor verlassenden Medium war zwar deutlich höher als die Endkonzentration im Batch aber die Ertragskoeffizienten waren deutlich niedriger (zwischen 0,6 und 0,7 g/g). Dies erklären die Autoren durch ein Verdünnen und Auswaschen einiger Metabolite.

5.3.4 Simultane Hydrolyse und Fermentation[50]

Wenn sich bei der enzymatischen Hydrolyse von Zellulose Zellulose und Glukose im Medium anreichern, werden die Enzyme inhibiert und ihre Aktivität nimmt stark ab. Um dies zu verhindern, damit zu einer vollständigeren Hydrolyse des Ausgangsmaterials zu kommen und außerdem die notwendige Menge an Enzym zu verringern, müssen diese Substanzen dem System entzogen werden. Durch die gleichzeitige Fermentation wird Glukose verbraucht und so eine Inhibierung der Enzyme verhindert.

Diese Kombination von Hydrolyse und Fermentation ist mit Milchsäurebakterien besonders gut möglich, da es Spezies gibt, die ähnliche optimale Bedingungen haben wie zellulolytische Enzyme.

Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Einsparung von Arbeitsschritten, was die Zeitdauer und Kosten der Produktion von Milchsäure senkt.

Für eine möglichst vollständige Hydrolyse und Verwertung der gebildeten Zucker wird eine möglichst hohe Enzymkonzentration, gepaart mit einer niedrigen Substratkonzentration vorgeschlagen. Das erhöht aber wiederum die Produktionskosten und senkt die Produktivität. Welcher Faktor nun ausschlaggebend ist, kann nur bei Kenntnis des Enzym- und Substratpreises, der Kosten der Aufarbeitung und dem Marktwert der Milchsäure entschieden werden.

Tab. 10 Übersicht über die Veröffentlichungen zur Milchsäureproduktion mit Maiskolben bzw. -stroh als Substrat

Organismus	Substrat	Vorbe- handlung	Hydrolyse	Medium [g/kg Kolben]	Temp [°C]	pH	Fermentor	Milchsäure [g/kg Substrat]	Literatur
L.lactis L.casei	Maiskolben Hydrolysat 50g Glu/L Entspricht ca. 150 g/L Kolben	„steam explosion“	getrennt 2*10 ⁴ U/ kg vorbe- handeltes Substrat-> 740g Glu/ kg vorbeh. bzw.: 320 g Glu/ kg Kolben	Hefeextrakt 130 Pepton 65 KH ₂ PO ₄ 13 NaAc 33 MgSO ₄ .7H ₂ O 3,3 Ammoniumcitrat 13 MnSO ₄ .4H ₂ O 0,33	37	5,8	Rührkessel im Batch-Betrieb	ca. 250 ¹ g/kg Kolben	58
L. delbrium	Maiskolben- rückstand aus Xylose Produktion 70 g/L (entspricht ca. 103 g/L Kolben)	Xylose Produktion (mit verd. H ₂ SO ₄)[15]	simultan 5000 FPU / kg Rück- stand	Hefeextrakt 10 Pepton 10 KH ₂ PO ₄ 1,0 Na ₂ HPO ₄ 1,0 MgSO ₄ .7H ₂ O 0,49 FeSO ₄ .7H ₂ O 2mg MnSO ₄ .7H ₂ O 0,28mg ZnSO ₄ 16mg CoCl ₂ .6H ₂ O 0,97mg	50	4,8-5	Rührkessel im Batch-Betrieb	300 g/kg Kolben 450 g/kg Rück- stand aus Xylose Produktion	56

¹ Da die Autoren keine genaueren Angaben über den Massenverlust im Zuge der Vorbehandlungen geben konnten die Erträge an Milchsäure pro kg Kolben nur ungefähr berechnet werden.

6. Kurzkettige organische Säuren

6.1 Allgemeines und Verwendung kurzkettiger organischer Säuren

Anaerobe acidogene Bakterien bilden kurzkettige organische Säuren, vor allem Essig- Butter- und Propionsäure, in geringen Mengen auch Valerian- und Hexansäure. Die physikalischen Eigenschaften der Säure sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

a.) Essigsäure ($\text{H}_3\text{C-COOH}$)[5]

Essigsäure dient hauptsächlich zur Herstellung verschiedener Essigsäureester. Die Salze der Essigsäure, wie z.B.: Na-, Pb-, Al- und Zn-Acetat, dienen als Hilfsmittel in der Textil- und Lederindustrie, in der Färberei und Medizin. In Form von Chloressigsäure findet Essigsäure Verwendung für zahlreiche organische Synthesen und wird außerdem häufig als Lösungsmittel eingesetzt.

b.) Propionsäure ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-COOH}$)[5]

Propionsäure wird zur Herstellung von Estern, wie z.B. Vinylpropionat oder Amylpropionat, das als Lösungsmittel für Harze und Zellulosederivate verwendet wird, eingesetzt. Eine weitere wichtige Anwendung ist die Herstellung von Herbiziden.

c.) Buttersäure ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$)

Die Säure und einfache Ester sind Geschmacksstoffe [51], höhermolekulare Ester besitzen hingegen Weichmachereigenschaften. In Frankreich ist ein

Lösungsmittelgemisch der Kalziumsalze von Butter- und Essigsäure auf dem Markt. Dieses Gemisch wird als Ketol bezeichnet und ist ein Antiklopfmittel für Motortreibstoffe. Buttersäure wird zur Herstellung von Celluloseacetylbutyrat in der Kunststoffindustrie verwendet und dient außerdem zur Herstellung von Estern in der Parfümindustrie.[52] Weiter wird Buttersäure zur Synthese von Arzneimitteln und Schädlingsbekämpfungsmitteln eingesetzt. Das Kalziumsalz, das im heißen Wasser besser löslich ist wie im kalten, wird als Entkalkungsmittel in der Gerberei verwendet.[5]

d.) Valeriansäure ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)[5]

Die Ester (Valerate) mit Glykolen und Polyolen ergeben Schmierstoffe. Aus Derivaten der Valeriansäure gewinnt man auch Lösungsmittel, Weichmacher, Emulgatoren, Kunststoffe, Insektizide, Korrosionsinhibitoren und Pharmaka.

e.) Hexansäure ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)[5]

Hexansäure ist die Säurekomponente vieler Fruchttester. Sie ist Bestandteil von Arzneimitteln und dient zur Synthese von Hexylphenolen.

Tab.11 Physikalische Eigenschaften der verschiedenen Säuren[5]

	Schmelzpunkt [°C]	Siedepunkt [°C]	Dichte [g/cm ³]	Löslichkeit
Essigsäure	16,5	117,9	1,0492	in Wasser, Alkohol, Ether... gut
Propionsäure	-22	141	0,992	in Wasser, Alkohol, Ether.. gut
Buttersäure	-6	164	0,959	in Wasser, Alkohol, Ether.. gut
Valeriansäure	-34	186	0,939	in Alkohol, Ether.. gut; in Wasser wenig
Hexansäure	-3,9	205	0,930	in Alkohol, Ether.. gut; in Wasser kaum

6.2 Produktion kurzkettiger organischer Säuren mit Maisstroh als Substrat [53]

6.2.1 Organismus

Eine Mischkultur anaerober acidogener Mikroorganismen kann verwendet werden um das Maisstroh nach einer relativ einfachen Vorbehandlung (siehe unten) in kurzkettige organische Säuren umzuwandeln. Der anaerobe Abbau lignozellulären Materials geschieht normalerweise in zwei Phasen. Zuerst baut eine Gruppe acidogener Bakterien das Material ab und produziert organische Säuren, CO₂ und Wasserstoff. Diese Produkte werden von einer zweiten Gruppe von Bakterien, den methanogenen Bakterien, als Substrat verwendet, um Methan und CO₂ zu bilden. Durch Unterdrückung der Methanbildung erhält man eine Mischung verschiedener organischer Säuren als Hauptprodukt der Fermentation.

Die Autoren erhielten das Inokulum für diesen Prozeß durch eine semikontinuierliche anaerobe Fermentation eines 50:50 Gemisches von frischem Kuhdung und Klärschlamm mit einer Aufenthaltszeit im Reaktor von 30 Tagen. Der pH dieser Fermentation liegt zwischen 6,9 und 7,2 und es entsteht dabei ein Gas das zu 50-60% aus Methan besteht.

Die Vorteile der Verwendung dieser Mischkultur sind folgende:

- Zellulose, Hemizellulose und andere Kohlehydrate können nach einfacher Vorbehandlung direkt verwertet werden.
- Die Fermentation muß nicht unter sterilen Bedingungen ablaufen, was die Betriebskosten gering hält.
- Die organischen Säuren können einfach durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnen werden.

Als Nachteile sind anzuführen:

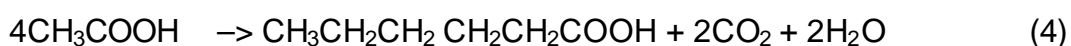
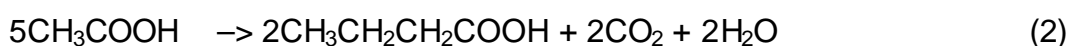
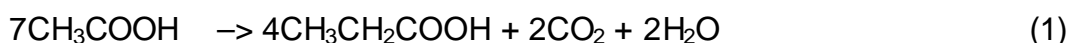
- Es ist notwendig die Methanbildung zu unterdrücken
- Die Fermentation läuft sehr langsam ab.

6.2.2 Vorbehandlung

Das Maisstroh wird getrocknet und auf eine Größe von 8 mesh gemahlen. Danach wird das Material unter milden basischen Bedingungen vorbehandelt. Dadurch werden vor allem Ester gespalten, die mit den Xylanketten verbunden sind und als Querverbindungen zwischen den Polymerketten dienen. Durch Spalten dieser Querverbindungen kommt es zu einer verstärkten Quellung des Materials und zur Vergrößerung der Poren. Das Material wird bei Raumtemperatur für zwei Tage in einer Lösung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und Na_2CO_3 eingeweicht. Diese preisgünstigere Alternative zur Verwendung von Natronlauge führt außerdem zu besseren Ergebnissen in der anschließenden Fermentation. Dies könnte auf die höhere Pufferkapazität des Mediums durch die Anwesenheit von Kalziumsalzen zurückzuführen sein. Bis zu einer Konzentration von $0,035 \text{ g OH}^- / \text{g}$ Maisstroh steigt die Wirkung der Vorbehandlung, bei höheren Werten ist nicht nur keine Verbesserung sondern sogar ein Rückgang der Ausbeute bei der nachfolgenden Fermentation zu beobachten.

6.2.3 Medium und Fermentationsbedingungen

Nach der Vorbehandlung wird das Gemisch mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert, auf 50 g Maisstroh/L verdünnt und Ammoniak und Phosphorsäure (je $0,025 \text{ mol/L}$) zugesetzt. Die Substratkonzentration sollte auf jeden Fall über 25 g/L liegen da bei hohen Konzentrationen die Methanbildung geringer ist. Außerdem wird die Methanogenese durch eine Fermentation bei relativ niedriger Temperatur (25°C) unterdrückt. Die Versuche wurden in verschlossenen Erlenmeyerkolben statisch durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte nach etwa 24 Tagen eine Ausbeute von $0,5 \text{ g}$ Essigsäure Äquivalenten pro Gramm trockenes Maisstroh erreicht werden. Diese Werte wurden entsprechend den nachfolgenden Reaktionsgleichungen berechnet:



Das Verhältnis der einzelnen Säuren zueinander ist in Abbildung 15 dargestellt.

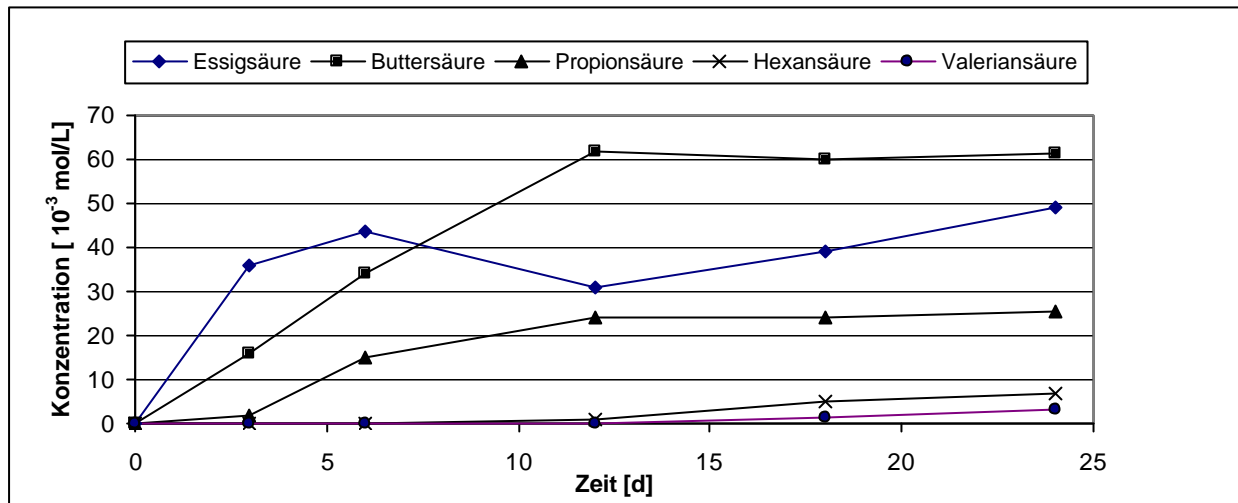


Abb.15 Verlauf der Konzentration der Säuren während der Fermentation

6.2.4 Aufarbeitung

Die Gewinnung der Säuren ist durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Toluol, Amylacetat oder Diesel möglich. Da im Batch-Prozeß durch Produktinhibierung höhere Konzentrationen der organische Säuren nicht möglich sind, könnte die Ausbeute durch eine kontinuierliche Extraktion der Fermentationslösung und anschließende Rückführung der wässrigen Phase in den Fermentor erhöht werden. Die Sättigungskonzentrationen der oben angeführten Lösungsmittel in der wässrigen Phase beeinträchtigen das Wachstum und die Produktbildung der Mikroorganismen nicht.

7. Protein

Auf Maisstroh und Maiskolben als Substrat können Mikroorganismen angezüchtet werden, um Einzellerprotein zu gewinnen. Das gebildete Protein kann zu Fütterungszwecken oder in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Es besteht auch die Möglichkeit das nun proteinreiche Material direkt zu verfüttern. Das Mycel von Pilzen wie z.B. *Pleurotus sajor-caju* ist außerdem als Pilz-Geschmacksstoff verwendbar.

Wichtig für die Verwendung des Proteins ist seine Aminosäurezusammensetzung. Vor allem essentielle Aminosäuren sollten in hohen Konzentrationen vorhanden sein.

7.1 Organismus und Vorbehandlung

Die Wahl des Organismus beeinflusst die notwendige Vorbehandlung sehr stark. So können filamentöse Pilze das Substrat nach einfacher Vorbehandlung gut verwerten, da sie einerseits zum Teil Zellulose- und Hemizellulose-spaltende Enzyme ausscheiden und andererseits mit ihren Hyphen gut in das Pflanzengewebe eindringen können. Für diese Pilze ist eine basische Vorbehandlung des Substrates bei Temperaturen knapp über einhundert Grad empfehlenswert [54,55]. Die Fermentation kann in Submerskultur oder als Feststofffermentation durchgeführt werden.

Sollen Hefen verwendet werden, muß das Substrat in der Regel hydrolysiert werden. Eine Hydrolyse des Hemizelluloseanteils ist mittels Behandlung mit verdünnter Säure möglich. Hefen wie *Candida utilis* sind fähig, die bei dieser Hydrolyse gebildeten Pentose zu verwerten. Der verbleibende Zellulose und Lignin enthaltende Reststoff könnte ebenfalls hydrolysiert und zur Proteinproduktion verwendet werden. Die Autoren[57] empfehlen allerdings einen anaeroben Abbau zu Methan. Eine weitere Möglichkeit, den Hefen die im Substrat enthaltenen Zucker zugänglich zu machen, besteht in der gleichzeitigen Fermentation eines zweiten Organismus der Zellulase und Xylanase ausscheidet.[58]

7.2 Medium und Fermentationsbedingungen

Da es sich um aerob wachsende Organismen handelt muß sowohl in Submerskulturen als auch bei Feststofffermentationen auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung geachtet werden. Die kann vor allem bei der Feststofffermentationen wie schon öfters erwähnt zu Problemen führen (siehe Kapitel I.4 Grundlagen der Feststofffermentation).

Den Medien muß Stickstoff in Form von Ammoniumsalzen zugesetzt werden, außerdem wirkt sich ein Zusatz komplexer Stickstoffquellen zumeist positiv aus. So ist das Wachstum von *Pleurotus sajor-caju* nur sehr schwach, wenn kein Hefeextrakt als Vitaminquelle zugesetzt wird. Es gelang aber, den Pilz durch wiederholtes Kultivieren auf Maisstroh so zu verändern, daß er auch ohne komplexe Stickstoffquelle ein ähnlich starkes Wachstum zeigte wie mit Hefeextrakt.

In Tabelle 12 sind mehrere Verfahren zur Herstellung von Protein mit Maisstroh und Maiskolben als Substrat dargestellt.

Tab.12 Übersicht über die Veröffentlichungen zur Produktion von Protein mit Maisstroh und Maiskolben als Substrat

Organismus	Substrat	Vorbe- handlung	Medium [g/kg Substrat]	pH	Temp. [°C]	Dauer	Wasser- gehalt ¹	Protein [g/kg Substrat]	Literatur
Candida utilis	Maisstroh- Hydrolysat	2,5% w/v H ₂ SO ₄ , 1,5 h 100 °C, Zentrifugation	in g/L pro 10g/L Zucker (keine genau- eren Angaben): (NH ₄) ₂ SO ₄ 2,9 KH ₂ PO ₄ 2,0 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,3	4,5	30	13 h		keine Angabe	56
Cellulomonas uda + Candida utilis	je 10g/L	0,2 N NaOH 121°C, 15psi 15min	(NH ₄) ₂ SO ₄ 250 Hefeextrakt 50 KH ₂ PO ₄ 270 Na ₂ HPO ₄ 5,31 NaCl 21 MgSO ₄ 21	7,4	30	5 d			57
	1:1 Stroh und Kolben							890	
	Maistroh							520	
	Maiskolben						680		
Pleurotus sajor-caju	Maisstroh		Lit. 90-22 Mandels und Weber	6,0	30	48-120 h abh. von Substrat- konz.		210	55
			Lit. 90-23 Chahal und Gray					125	
Chaetomium cellulolyticum	Maistroh	4% NaOH wt/wt 1h, 100°C	(NH ₄) ₂ SO ₄ 118	6	37	5 d	77 %	180	55

¹ bei Feststofffermentation

8. Zusammenfassung und Diskussion

Sowohl aus ökologischen als auch ökonomischen Gründen ist es wichtig das Material möglichst umfassend zu verwerten. Werden alle Hauptbestandteile, Zellulose, Hemizellulose und Lignin, zur Gewinnung von Produkten herangezogen, verringert das den anfallenden Abfall und erhöht gleichzeitig die Wertschöpfung.

Ein wichtiger Kostenfaktor bei der Verwertung von Maisstroh ist die Vorbehandlung des Materials. Viele Verfahren (siehe Kapitel 1.4.2) sind ausgesprochen energieintensiv und deshalb teuer. Es sind also solche Produktwege zu wählen die eine möglichst einfache Vorbehandlung erfordern. Es ist außerdem möglich die Herstellung verschiedener Produkte zu kombinieren und so Vorbehandlungsschritte einzusparen (siehe unten).

Da das Material sehr wenig Protein enthält, müssen Stickstoffverbindungen zugesetzt werden. In den meisten Fällen ist der Produktertrag bei Zusatz komplexer Stickstoffquellen sehr viel höher als mit anorganischen Stickstoffsalzen. Aufgrund der hohen Kosten für Hefeextrakt oder Pepton müßten regional billige Stickstoffquellen gefunden werden. Möglich wäre die Verwendung von Maisquellwasser oder Molkepulver, die ebenfalls Abfallprodukte darstellen.

Wichtig bei der Verwertung von Maisstroh ist auch, daß diese möglichst regional geschehen muß, da die Transportkosten eines so leichten, voluminösen Materials seinen Wert bei weitem übersteigen würde. Aus diesem Grund sollten die Technologien möglichst einfach und die Anlagen zur Herstellung der Produkte nicht zu teuer sein.

Einen Überblick über die möglichen Produkte bietet Tabelle 13.

Tab. 13 Übersicht über die möglichen Produkte durch direkte Fermentation von Maisstroh

Produkte durch direkte Fermentation von Maisstroh	
Enzyme	Zellulase
	Xylanase
	Laccase
organische Lösungsmittel	2,3 Butandiol
organische Säuren	Milchsäure
	kurzkettige organische Säuren (Essig-, Butter-, Propion-, Valerian- und Hexansäure)
Protein	

Enzyme

Für die Verwendung von Maisstroh zur Herstellung von Enzymen sprechen mehrere Punkte:

- Maisstroh stellt eine billige Kohlenstoffquelle dar.
- Durch das Vorhandensein der Polymere Zellulose, Hemizellulose und Lignin wird die Produktion der einzelnen Enzyme induziert. Eine Fermentation der gleichen Mikroorganismen auf Glucose würde nicht zur Bildung der Enzyme führen.
- Bei der Herstellung der Xylanase bewirkt die schwere Zugänglichkeit des Xylans durch die komplexe Struktur des Rohstoffs eine langsame Freisetzung von Oligomeren und damit einen höherer Xylanaseertrag, als bei der Fermentation auf reinem Xylan.

Zur Herstellung von Zellulase muß das Material vorbehandelt werden, da vor allem die kristalline Struktur und die Anwesenheit von Hemizellulose und Lignin einen effektiven Angriff der Zellulose durch die Mikroorganismen verhindert. Diese Vorbehandlung sollte im Sinne einer umfassenden Nutzung des Rohstoffs nicht nur eine Abtrennung unerwünschter Bestandteile darstellen, sondern diese sollten

ebenfalls genutzt werden. Um das zu erreichen, kann vor der Fermentation eine saure Hydrolyse des Materials erfolgen. Aus dem Hydrolysat der Hemizellulose kann in diesem Fall der Zuckerersatzstoff Xylitol gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, vorher eine Fermentation zur Herstellung von zellulasefreier Xylanase durchzuführen. Danach wäre die Zellulose gequollen, also nicht mehr kristallin, und die Hemizellulose wäre zu einem großen Teil abgetrennt. Für eine effektive Bildung von Xylanase reicht ein einfaches Mahlen des Materials auf eine Größe von 2-7 mm aus.

Ein weiterer Vorteil dieser Variante wäre, daß die nach dem Abpressen der xylanasehaltigen Fermentationsbrühe auf dem Maisstroh zurückbleibende Biomasse bei der nachfolgenden Fermentation als Stickstoffquelle dienen könnte. Zwar müßte eine Sterilisation des Materials erfolgen, aber das ist auch bei der direkten Verwendung von frischem Maisstroh notwendig.

Die Bildung von Laccase geschieht vor allem parallel zur Bildung von Zellulase und Hemizellulase. Für die Gewinnung des reinen Enzyms sind aufwendige Reinigungsschritte notwendig. Dies stellt einen Nachteil gegenüber der Produktion von Zellulase oder Xylanase dar, die von manchen Pilzen ohne die gleichzeitige Bildung der anderen Enzyme produziert werden.

2,3 Butandiol

Die Produktion von Butandiol bedarf der Abtrennung von Hemizellulose und Lignin und eine Hydrolyse der Zellulose. Zwar können viele butandiolbildende Mikroorganismen auch Pentosen verwerten, aber dies geschieht viel langsamer als der Abbau von Hexosen. Es gibt Verfahren die einzelnen Bestandteile des Maisstrohs voneinander zu trennen, diese sind aber sehr aufwendig. Auch hier würde sich eine Voranstellung einer Xylitol- oder Xylanaseproduktion empfehlen. Für die notwendige Hydrolyse der Zellulose könnten die Enzyme selbst hergestellt werden, um so die Kosten zu verringern. Wichtig ist, die Hydrolyse und Fermentation zu 2,3 Butandiol simultan durchzuführen, da dies die Effektivität der Hydrolyse erhöht.

Milchsäure und andere organische Säuren

Bei der Herstellung von Milchsäure gelten ähnliche Überlegungen wie für Butandiol. Allerdings können die meisten Milchsäurebildner Pentosen nur sehr schlecht oder gar nicht verwerten. Über die Herstellung anderer organischer Säuren mit Maisstroh als Substrat gibt es kaum Literatur. Mit Hilfe einer Mischkultur kann ein Gemisch verschiedener Säuren gebildet werden. Die Vorbehandlung für diesen Prozeß ist relativ einfach und erfordert keine Sterilisation. Die Reinigung der Produkte ist allerdings aufwendig und auf Grund ihres geringen Preises wahrscheinlich nicht rentabel.

Abb. 16 Übersicht über die möglichen Produktwege, Teil 1 ENZYME, LiP...Ligninperoxidase, MnP...Manganperoxidase

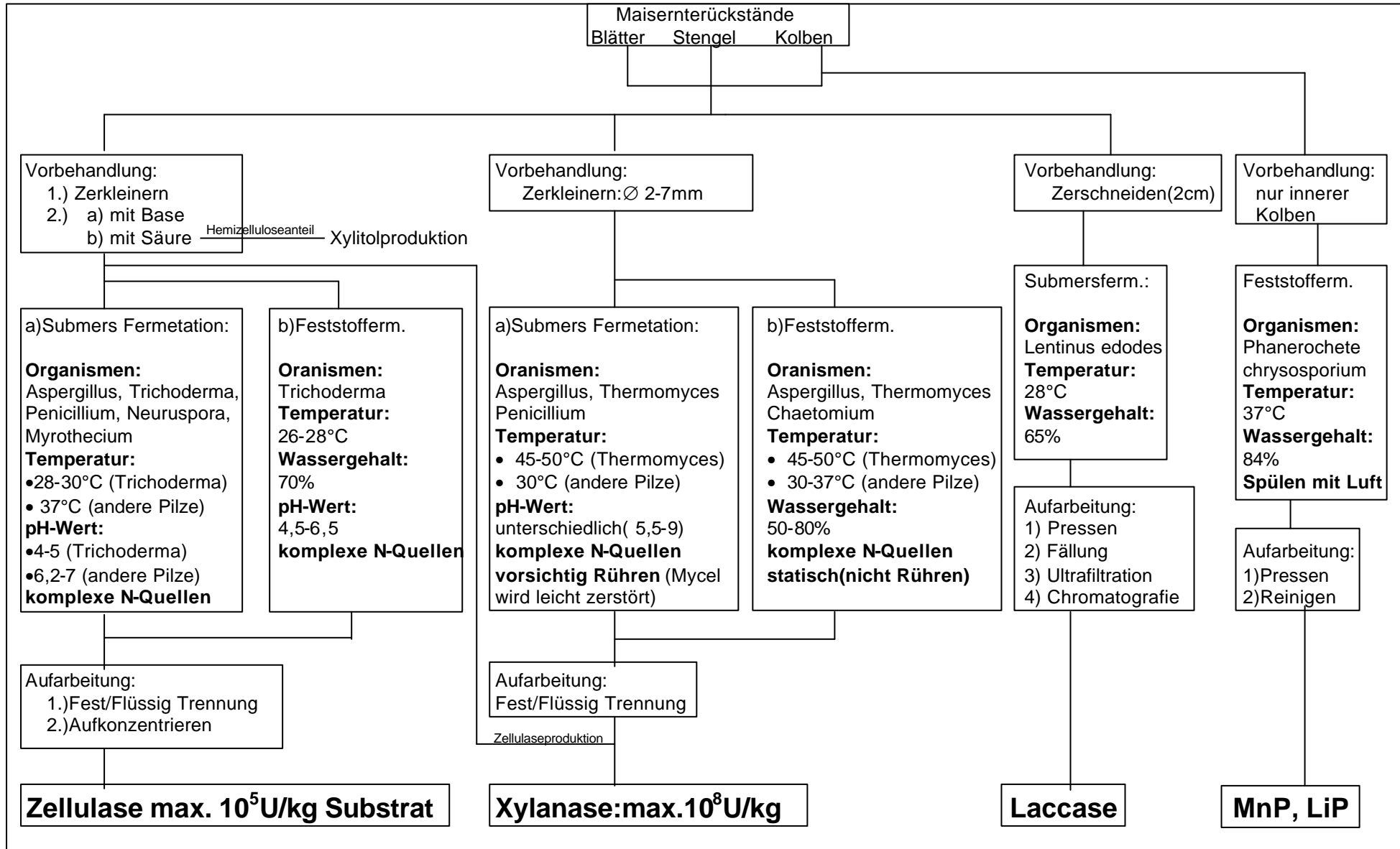
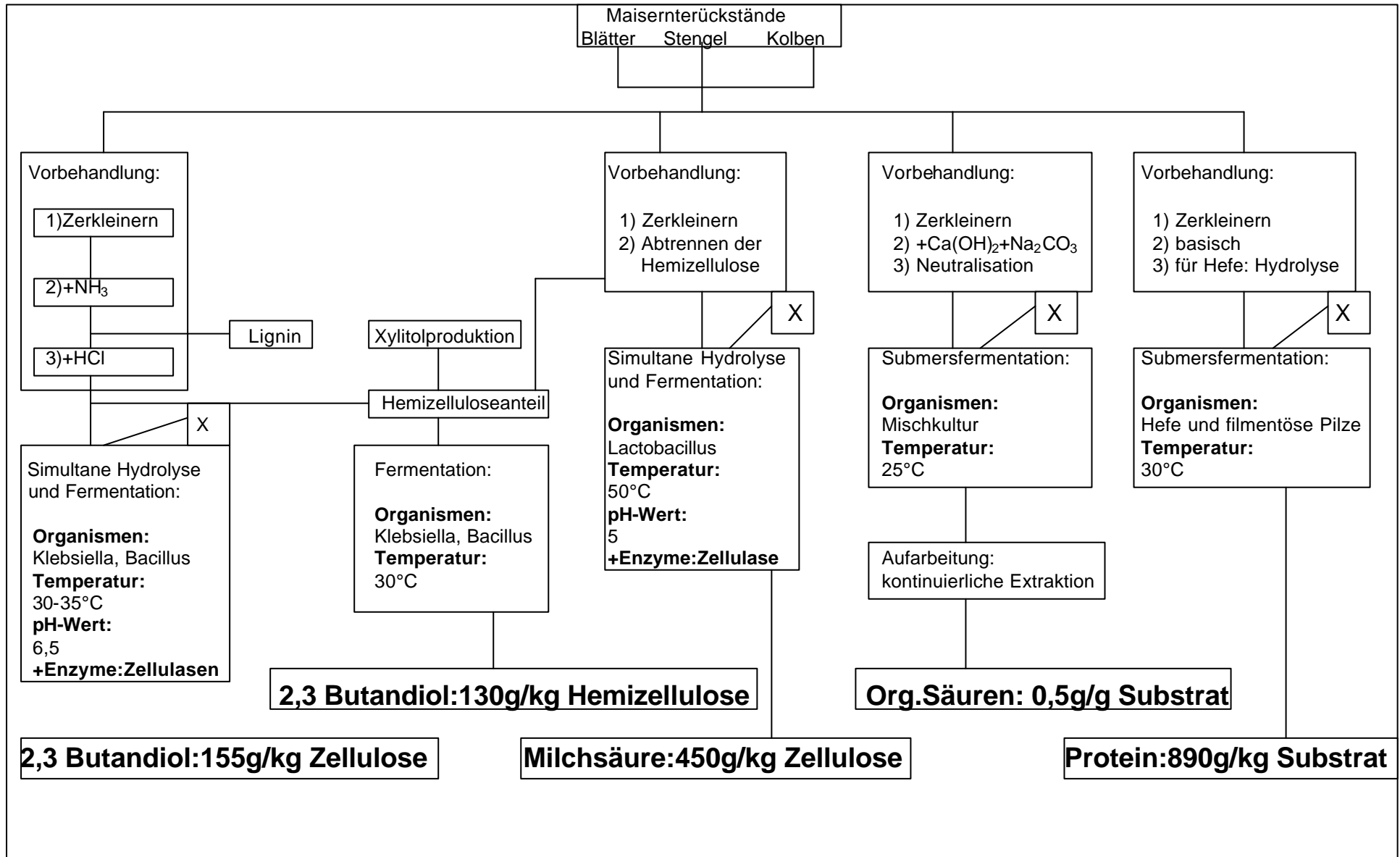


Abb. 16 Übersicht über die möglichen Produktwege, Teil2, X...fester Rückstand der Xyloseproduktion(siehe Teil 1)



III. Anhang

Literaturliste

1. Franke, Wolfgang, 1997, Nutzpflanzenkunde: nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten Subtropen und Tropen, 6. Neubearb. u. erw. Aufl., Stuttgart; Thieme 1997
2. Birgit Laussamayer, Optimierung der Produktion cellulolytischer und hemicellulolytischer Enzyme durch *Sclerotium rolfsii*, 1993, Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie an der Universität Graz
3. Pratima Bajpai, 1997. Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 43, 141-187
4. <http://www.esb.ucp.pt/~bungah/sugar/lignin.htm>
5. Jürgen Falbe, Manfred Regitz, 1995. *CD-Römpps-Chemielexikon*, 9. Auflage, Version 1.0
6. Bingyou Lu, Jingsong Yan, Rusong Wang, 1998. Integrated ecological engineering of corn utilization in Zhaodong County. *Ecological Engineering*, 11, 139-146
7. Peilin Cen, Liming Xia, 1999. Produktion of Cellulase by Solid-State Fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 65, 70-91
8. Gbemeloluwa Oguntimein, Dagmar Vlach, Murray Moo-Young, 1992. Production of Cellulolytic Enzymes by *Neurospora sitophila* Grown on Cellulosic Materials. *Bioresource Technology*, 39, 277-283
9. Ajay Singh, Kiyoshi Hayashi, 1995. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 40, 1-44

10. Jeffrey S. Tolan, Brian Foody, 1999. Cellulase from Submerged Fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 65, 42-67
11. Guo-Sui Ye, M.L. Fields, 1989. Cellulolytic Enzyme Production by Three Fungi Grown in a Ground Corn Cob Medium. *Journal of Food Protection*, Vol.52, No.4, 248-251
12. Ali M. Elshafei, 1990. Cellulase and Hemicellulase Formation by Fungi using Corn Stover as the Substrate. *Biological Wastes*, 32, 209-218
13. A. Singh, A.B. Abidi, A.K. Agrawal, N.S. Darmwal, 1989. Evaluation of Alkali Treatment for Biodegradation of Corn Cobs by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologia*, 34, 479-484
14. Liming Xia, Peilin Cen, 1999. Cellulase Production by Solid State Fermentation on Lignocellulosic Waste from the Xylose Industry. *Process Biochemistry*, 34, 909-912
15. Petschacher Barbara, 2001, Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie an der Technischen Universität Graz
16. R. Pyc, A. Fiechter, E. Galas, 1977, The Production of Cellulolytic Enzymes by Fungal Cultures. *European Journal of Applied Microbiology*, 4, 151-158
17. Liisa Viikari, Maija Tenkanen, Kaisa Poutanen, 1999. Hemicellulases, *Encyclopedia of Bioprocess Technology, Wiley Biotechnology Encyclopedias*, Vol3, 1383- 1400
18. Heinz Purkarthofer, Michael Sinner, Walter Steiner, 1993. Cellulase-free Xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of Production in Submerged and Solid-State Culture. *Enzyme Microbial Technology*. 15, 677-682

19. Mustafe Alam, Isidore Gomes, Ghulam Mohiuddin, M. Mozammel Hoq, 1994. Production and Characterization of Thermostable Xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* Grown on Lignocelluloses. *Enzyme Microbial Technology*, 16, 298-302
20. Cristina Giatti Marques de Souza, Nélio Silva Girardo, Maria Aparecida Ferreira Costa, Rosane Marina Peralta, 1999. Influence of Growth Conditions on the Production of Xylanolytic Enzymes by *Aspergillus flavus*. *Journal of Basic Microbiology*, 39, 3, 155-160
21. M. Mozammel Hoq, Carsten Hempel, Wolf-Dieter Deckwer, 1994. Cellulase-free Xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of Agitation, Aeration, and Medium Components on Production. *Journal of Biotechnology*, 37, 49-58
22. Mária Szakács Dobozi, György Szakács, Carlo v. Bruschi, 1992. Xylanase Activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.58, No.11, 3466-3471
23. Gisélia Ferreira, Cinthia G. Boer, Rosane M. Peralta, 1999. Production of Xylanolytic Enzymes by *Aspergillus tamarii* in Solid State Fermentation, *FEMS Microbiology Letters*, 173, 335-339
24. Dietmar Haltrich, Bernd Nidetzky, Klaus Kulbe, Walter Steiner, Silvia Zupancic, 1996. Production of Fungal Xylanases. *Bioresource Technology*. 58, 137-161
25. Qu Yinbo, Gao Peiji, Wang Dong, Zhao Xin, Zhang Xiao, 1996. Production, Characterization, and Application of the Cellulase-Free Xylanase from *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 57/58, 375-381
26. J. Gomes, H. Purkarthofer, M. Hayn, J. Kapplmüller, M. Sinner, W. Steiner, 1993. Production of a High Level Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* in Laboratory and Pilot Scales Using Lignocellulosic Materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39, 700-707

27. M. Mozammel Hoq, Wolf-Dieter Deckwer, 1995. Cellulase-Free Xylanase by Thermophilic Fungi: A Comparison of Xylanase Production by two *Thermomyces lanuginosus* Strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43, 604-609
28. Heinz Purkarthofer, Michael Sinner, Walter Steiner, 1993. Effect of Shear Rate and Culture pH on the Production of Xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology Letters*. Vol15, No4, 405-410
29. L.P. Christov, G. Szabacs, H. Balakrishnan, 1999. Production, Partial Characterization and Use of Fungal Cellulase-Free Xylanases in Pulp Bleaching. *Process Biochemistry*. 34, 511-517
30. Marina K. Kadowaki, Cristina G.M. Souza, Rita C.G. Simao, Rosane M. Peralta, 1997. Xylanase Production by *Aspergillus tamarii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 66, 97-106
31. Vladimir Puchart, Petros Katapodis, Peter Biely, Lubomir Kremnicky, Paul Christakopoulos, Maria Vrsanska, Dimitris Kekos, Basil J. Macris, Mahalingeshwara K. Bhat, 1999. Production of Xylanases, Mannanases, and Pectinases by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 24, 355-361
32. Mary mandels, Elwyn T. Reese, 1956. Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals. *Journal of Bacteriology*. 73, 269-278
33. H. Dubeau, D.S. Chahal, M. Ishaque, 1986. Production of Xylanases by *Chaetomium Cellulolyticum* During Growth on Lignocelluloses. *Biotechnology Letters*. Vol8, No6, 445-448
34. Feng Xu, 1999, Laccase. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, Wiley *Biotechnology Encyclopedias*. Vol 3, 1545-1551
35. Giovanni Giovannozzi Sermanni, Alessandro D'Annibale, Gabriella Di Lena, Nicoletta Silvia Vitale, Elena Di Mattia, Vincenzo Minelli, 1994. The Production of

- Exo-Enzymes by *Lentinus Edodes* and *Pleuratus ostreatus* and Their Use for Upgrading Corn Straw. *Bioresource Technology*. 48, 173-178
- 36., Alessandro D'Annibale, D. Celletti, M. Felici, Elena Di Mattia, Giovanni Giovannozzi Sermanni, 1996. Substrate Specificity of Laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologia*, 16, 257-270
- 37.S. Rodriguez, R. Santoro, C. Cameselle, A. Sanromán, 1998. Effect of the Different Parts of the Corn Cob Employed as a Carrier on Ligninolytic Activity in Solid State Cultures by *P. Chrysosporium*. *Bioprocess Engineering*. 18, 251-255
- 38.P. Chahal, Lactic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry*, VCH, D-Weinheim. Vol. A4, 459-460
- 39.Chapman & Hall, *Dictionary of Natural Products*, , Vol 1 (A-C) 772-773
- 40.Robert J. Magee, Naim Kosaric, 1987. The Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32, 89-161
- 41.Ian S. Maddox, Microbial Production of 2,3-Butandiol. *Biotechnology*, 2nd Edition, VCH, Volume 6 (Products of Primary Metabolism), Kapitel 7.6 Uses ,288
- 42.S.K. Garg, A. Jain, 1995. Fermentive Production of 2,3 Butandiol: A Review. *Bioresource Technology*. 51, 103-109
- 43.Ningjun Cao, Youkun Xia, Cheng S. Gong, George T. Tsao, 1997. Production of 2,3 –Butandiol from Pretreated Corn Cob by *Klebsiella oxytoca* in the Presence of Fungal Cellulase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 63-65, 129-139
- 44.Ernest K.C. Yu, Lise Deschatelets, John N. Saddler, 1984. The Combined Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Hemicellulose to 2,3 Butandiol, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19, 365-372
- 45.J.H. Litchfield, 1996, Microbiological Production of Lactic Acid. *Advances in Applied Microbiology*. 42, 45-95

46. H.-J. Rehm. Lactic Acid. *Biotechnology, 2nd Edition, VCH, Volume 6 (Products of Primary Metabolism), Kapitel 8.4.4 Product Quality and Applications, Production Figures, 303*
47. P. Chahal, Lactic Acid. *Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry, VCH, D-Weinheim. Vol. A15*
48. Karel Melzoch, Jaroslav Votruba, Véra Hábová, Mojmír Rychtera, 1997. Lactic Acid Production in a Cell Retention Continuous Culture Using Lignocellulosic Hydrolysate as a Substrate. *Journal of Biotechnology. 56, 25-31*
49. Karel Melzoch, Jaroslav Votruba, Mojmír Rychtera, Véra Hábová, 1996. Batch Lactic Acid Fermentation on Lignocellulosic Hydrolysate: Identification of Physiological Model. *Potravinarske Vedy (Food Sciences) 14, 1-11*
50. Jun Luo, Liming Xia, Jianping Lin, Peilin Cen, 1997, Kinetics of Simultaneous Saccharification and Lactic Acid Fermentation Processes.
51. Chapman & Hall, *Dictionary of Natural Products, , Vol 1 (A-C), 774-775*
52. Jürgen Rehm, Butanol-Aceton und weitere Produkte aus Clostridien, *Industrielle Mikrobiologie, Seite 304*
53. Rathin Datta, 1981. Acidogenic Fermentation of Corn Stover. *Biotechnology and Bioengineering. 23, 61-77*
54. D.S. Chahal, M. Moo-Young, D. Vlach, 1983. Protein Production and Growth Characteristics of *Chaetomium Cellulolyticum* During Solid State Fermentation of Corn Stover. *Mycologia. 597-603*
55. Devinder Singh Chaghal, 1989. Production of Protein-Rich Mycelial Biomass of a Mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, on Corn Stover. *Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol 68, No 5, 334-338*

- 56.A. Gonzalez-Valdes, M. Moo-Young, 1981. Production of Yeast SCP from Corn Stover Hydrolysates. *Biotechnology Letters*. Vol 3, No 3, 148-153
57. Marion L. Fields, Sumate Tantratian, Ruth E. Baldwin, 1991. Production of Bacterial and Yeast Biomass in Ground Corn Cob and Gound Corn Stalk Media. *Journal of Food Protection*. Vol 54, No 2, 117-120
59. H.J. Vogel, 1956, A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genet. Bull.* 13, 42-43