

# Der *Penicillium verruculosum*-Cellulasekomplex für den SSF-Prozess am Beispiel der Bioethanolgewinnung im Rahmen eines Gesamtkonzeptes zur Verwertung des Kohlenhydrat- und Ligninanteiles aus Weizenstroh

Letzel, Anne-Catrin<sup>1</sup>; Bertau, Martin<sup>1</sup>; Spindler, Daniel<sup>2</sup>; König, Swetlana<sup>2</sup>; Kerns, Gerhard<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg/Sa. (<http://tu-freiberg.de/fakult2/tech/index.html>)

<sup>2</sup> Sächsisches Institut für Angewandte Biotechnologie e.V., Leipzig ([www.SIAB-biotechnologie.de](http://www.SIAB-biotechnologie.de))

## Einleitung und Zielstellung

Die Gewinnung von Bioethanol der sog. 2. Generation auf Basis von Lignocellulose-Rohstoffen, die nicht in Konkurrenz zu Nahrungsmitteln stehen, konnte bisher trotz umfangreicher internationaler Forschungsaktivitäten wirtschaftlich noch nicht umgesetzt werden. Die biotechnische Nutzung des Kohlenhydratanteiles in Lignocellulose-Rohstoffen erfordert eine Vorbehandlung der Lignocellulose, um durch Aufbrechen der Ligninstruktur den enzymatischen Abbau zu intensivieren. Für den Prozess der simultanen Verzuckerung und Vergärung sind Enzymkomplexe notwendig, die eine - substratbezogen - optimale Zusammensetzung der Einzelkomponenten und eine möglichst hohe Resistenz gegenüber Ethanol aufweisen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein *Penicillium verruculosum*-Cellulasekomplex im Vergleich zu der weltweit verwendeten *Trichoderma reesei*-Cellulase für die Verzuckerung des Celluloseanteiles in Weizenstroh untersucht. Hierfür kamen verschiedene Verfahren zum Aufschluss des Weizenstrohs zur Anwendung, mit dem Ziel, eine komplexe Verwertung zu realisieren, also auch die stoffliche Nutzung des Ligninanteiles zu ermöglichen [1].

## Material und Methoden

### Enzymkomplexe

Für die Abbauntersuchungen diente ein Cellulasekomplex der Mutante *P. verruculosum*-M28-10 im Vergleich mit der Cellulase des Produktionsstammes *T. reesei*-M18.2. Der *P. verruculosum*-Stamm weist eine partiell ausgeschaltete C-Katabolitrepression auf, wird jedoch noch nicht als Produktionsstamm verwendet.

### Aufschluss des Weizenstrohs

In Anlehnung an den sog. Natural-Pulping-Prozess [2] wurde gehäckseltes Weizenstroh mit 75%-iger Ameisensäure unter Zugabe von 3% Wasserstoffperoxid 1 Stunde bei ca. 106°C am Rückfluss gekocht. Die Cellulosefraktion wurde mittels Separation und das Lignin wurde durch Ausfällen mit Wasser aus der Ameisensäurefraktion abgetrennt. Für Vergleichsuntersuchungen erfolgte ein Säureaufschluss mittels Schwefelsäure, 45 min bei 121°C im Autoklav, sowie ein alkalischer Aufschluss mittels Natronlauge. Das Flottenverhältnis betrug 25:1.

### Hydrolyse der Weizenstroh-Pulpe

Die Cellulaseaktivität wurde auf 15 IU (Filterpapieraktivität) je g Stroh eingestellt; 68 h Inkubationszeit bei 37 °C und 160 rpm. Die Hydrolysatzusammensetzung wurde mittels HPLC bestimmt.

### Simultane Verzuckerung und Fermentierung (SSF)

Der SSF-Prozess wurde mit dem *P. verruculosum*-Enzymkomplex und der Hefe *Kluyveromyces marxianus* bei 37°C durchgeführt. Die Fermentationen erfolgten im Batch-Prozess mit einem Substratanteil von 10% (w/v) im Bioreaktor mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 1 Liter.

### Einfluss von Lignin auf den *P. verruculosum*-Cellulasekomplex

Zur Realisierung eines Substratüberschusses wurde der Enzymkomplex auf ca. 2 IU/ml Filterpapieraktivität eingestellt und mit 30 g/L Lignin (Kraftlignin INDULIN-AT) bei 35°C 5 min bzw. 30 min inkubiert. Die Auswertung erfolgte an Hand der Differenz der gemessenen Enzymaktivitäten.

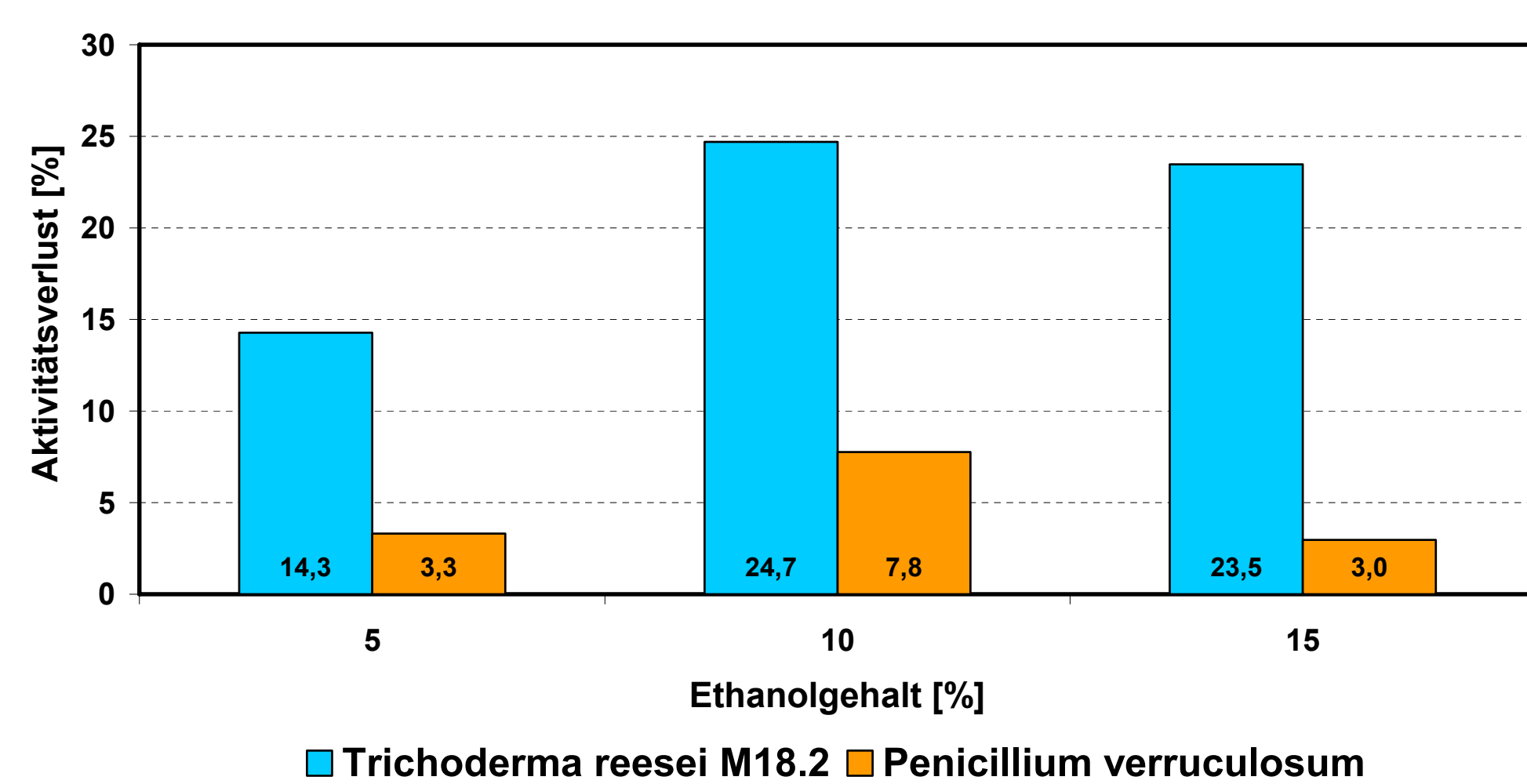


Abb. 2: Vergleich der Ethanolresistenz von *T. reesei*- und *P. verruculosum*-Cellulase beim Abbau von mikrokristalliner Cellulose (MKC)

### Wirkung von Lignin auf den *P. verruculosum*-Cellulasekomplex

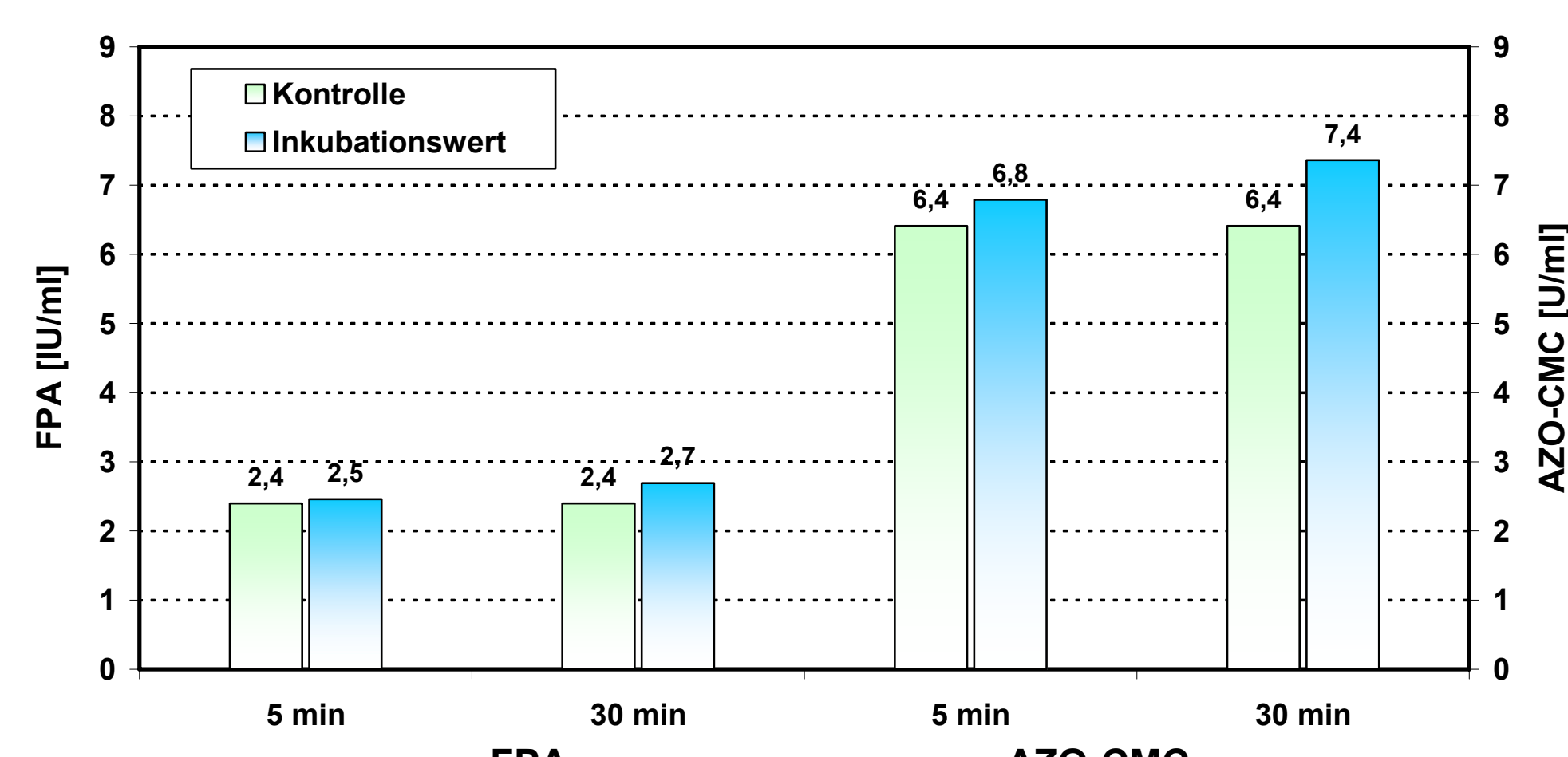


Abb. 4: Sorption / Inhibition von *P. verruculosum*-Cellulase durch Lignin (3% Kraftlignin INDULIN-AT; 30°C)

## Ergebnisse

Der *P. verruculosum*-Cellulasekomplex ist für den SSF-Prozess zur Gewinnung von Ethanol aus vorbehandeltem Stroh geeignet und weist gegenüber dem *T. reesei*-Cellulasekomplex signifikante Vorteile auf. Diese zeigen sich in einer höheren Resistenz gegenüber Ethanol und in der Zusammensetzung des Hydrolysates (Abb. 1-3). Auch wird die *P. verruculosum*-Cellulase praktisch nicht am Lignin adsorbiert bzw. inhibiert (Abb. 4). Der *P. verruculosum*-Stamm produziert einen Cellulasekomplex mit einer im Vergleich zu *T. reesei* höheren spezifischen Aktivität gegenüber mikrokristalliner Cellulose (MKC) und einem höheren Anteil  $\beta$ -Glucosidase (z.B. [3], [4]).

Der Organosolv-Aufschluss - in Anlehnung an das sog. Natural-Pulping-Verfahren (NP) - erwies sich als geeignet für den nachfolgenden SSF-Prozess. Die Ligninfraktion konnte nahezu vollständig abgetrennt werden. Bezogen auf Stroh-Trockenmasse wurden ca. 44% Pulpe und 19,5% Lignin erhalten, was der Strohzusammensetzung nahe kommt. Das Lignin lag in einer weiterverarbeitbaren Form vor (vgl. Foto). Im Verlauf der Hydrolyse von NP-Stroh kam es zu einem erheblichen Absinken des pH-Wertes, weshalb dieser nachreguliert werden musste.



Unbehandeltes Stroh (A), nach dem NP-Verfahren aufgeschlossenes Stroh (B) Lignin nach dem NP-Verfahren aus Stroh gewonnen (C)

## Diskussion und Ausblick

Der *P. verruculosum*-Enzymkomplex ist für die Verzuckerung der Cellulose im SSF-Prozess gut geeignet und bietet gegenüber dem etablierten *T. reesei*-Enzymkomplex den Vorteil eines insgesamt höheren Hydrolysegrades in kürzerer Zeit ohne Anreicherung von Cellobiose. Zur Realisierung der Wirtschaftlichkeit muss die Produktion der *P. verruculosum*-Cellulase optimiert werden. Die maximale Enzym-Exkretionsrate des *P. v.*-Stammes-M28-10 von 15 mg Enzymprotein je Stunde und Gramm Mycel ist mit den *T. r.*-Produktionsstämmen vergleichbar. Zur Realisierung dieser Leistung im technischen Maßstab ist jedoch die C-Katabolitrepression mittels genetischer Methoden auszuschalten.

Der Natural-Pulping-Prozess erweist sich als ein geeignetes Verfahren für den Biomasseaufschluss und könnte in Zukunft eine Alternative zu den bisher etablierten Vorbehandlungsmethoden darstellen. Es wurden Hydrolysegrade von 60-88% erzielt, in Abhängigkeit vom verwendeten Enzymkomplex und dem pH-Wert. Da das Natural-Pulping-Verfahren für die Papierindustrie entwickelt wurde, war der Einsatz konzentrierter Säure gerechtfertigt. Im Zuge der Ethanolherstellung muss die Kosteneffektivität dieses Verfahrens verbessert werden. In weiterführenden Arbeiten müsste einerseits das Flottenverhältnis optimiert und andererseits der Säureanteil bzw. Säurekonzentration verringert werden. Ebenso könnten die Variation der Vorbehandlungsdauer und die Zugabemenge von Wasserstoffperoxid zu einer Kostensenkung beitragen. Beim Lignin bietet sich eine stoffliche Verwertung zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses an. Es bestehen bereits Forschungsaktivitäten zur Herstellung von Biopolymeren auf Ligninbasis (vgl. [www.era-ib-lignin.eu](http://www.era-ib-lignin.eu)).

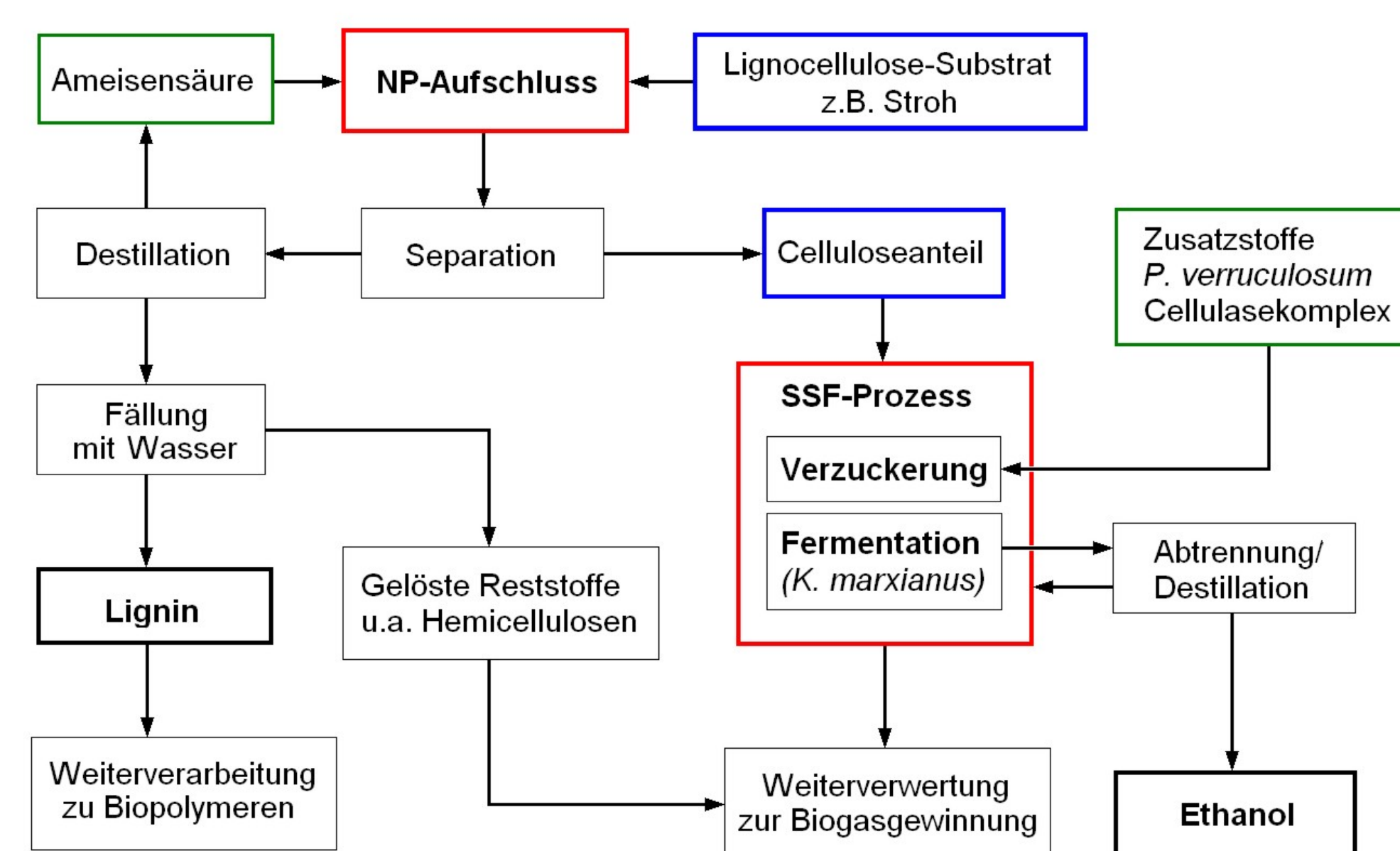


Abb.5: Schema des Gesamtprozesses

## Referenzen:

- Letzel, Anne-Catrin. Herstellung von Bioethanol mittels simultaner Verzuckerung und Fermentierung (SSF) von Lignocellulose. 2009, Diplomarbeit, TU Bergakademie Freiberg
- S. Siegle, Chem. Technik, 1996, 48 (4), 221-227.
- Bönsch, K. Molekularbiologische Untersuchungen zur C-Katabolitrepression von extrazellulären Enzymen an *Penicillium verruculosum*. Diss. 2003, Universität Leipzig
- Castellanos, O.; Sinitsyn, A. P.; Ermolova, O. V.; Popova, N. N.; Gutierrez, B.; Antonova, V. A.; Berlin, A.; Kerns, G.M. V. Lomonosov Moscow State Univ., Moscow, Russia. Biokhimiya (Moscow) (1995), 60 (10), 1609-1617
- M. B. Sainz, In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, 2009, 45, 314-329.

Untersuchungen, inwieweit dies durch Reste inkorporierter Ameisensäure bedingt ist, stehen noch aus.

Im SSF-Prozess wurde eine Ethanolausbeute von 64,8% nach 93 Stunden erreicht, wobei die hauptsächliche Ethanolmenge bereits in den ersten 24 Stunden gebildet wurde. Simultan zur Ethanolbildung fand die Glycerolbildung statt, die etwa einem Zehntel der produzierten Ethanolmenge entsprach. Eine Interaktion der Hefe mit dem Enzym ließ sich durch das Medium ausschalten. Durch Zugabe einer alternativen Proteinquelle, z.B. Schlempe, blieb die Aktivität des Enzyms erhalten.

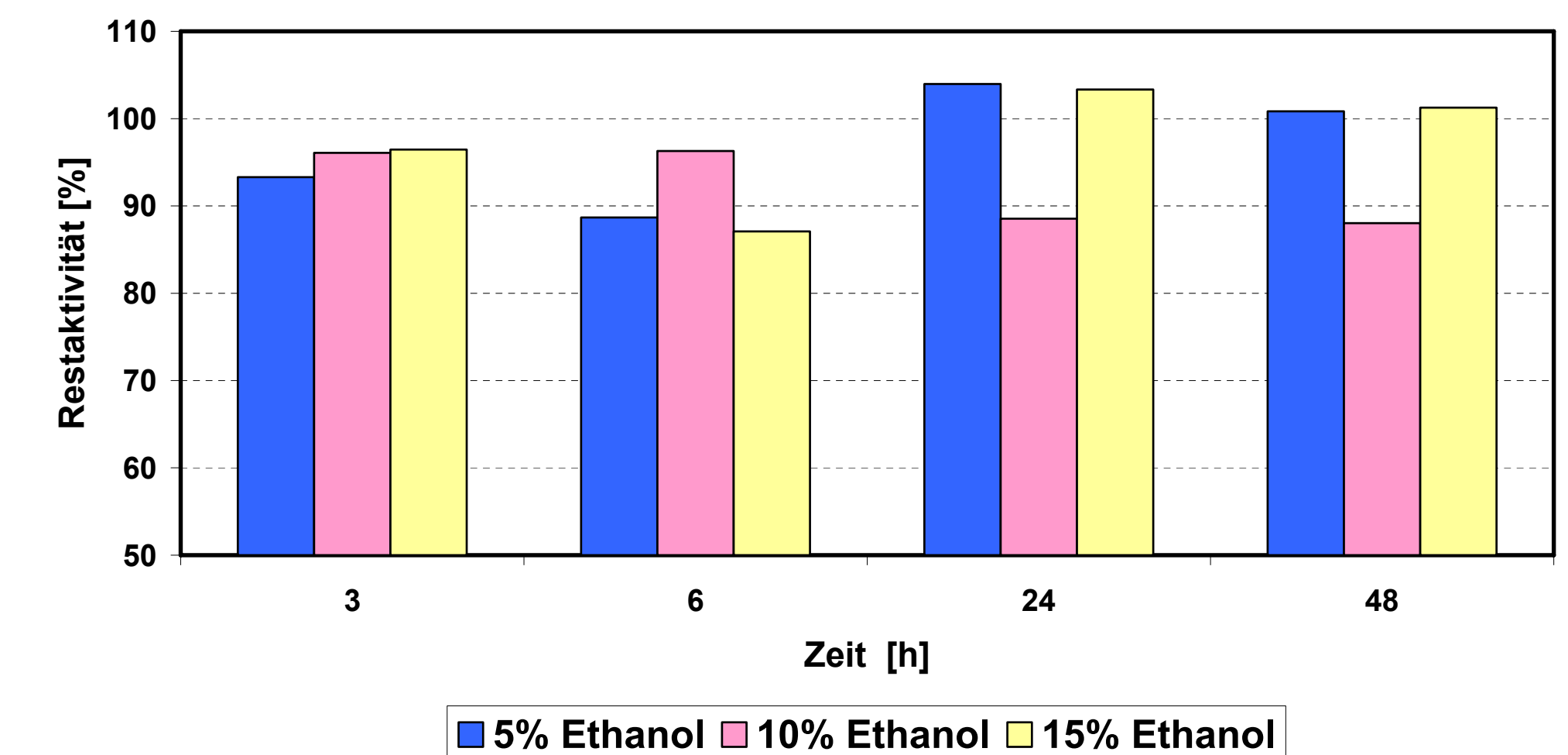
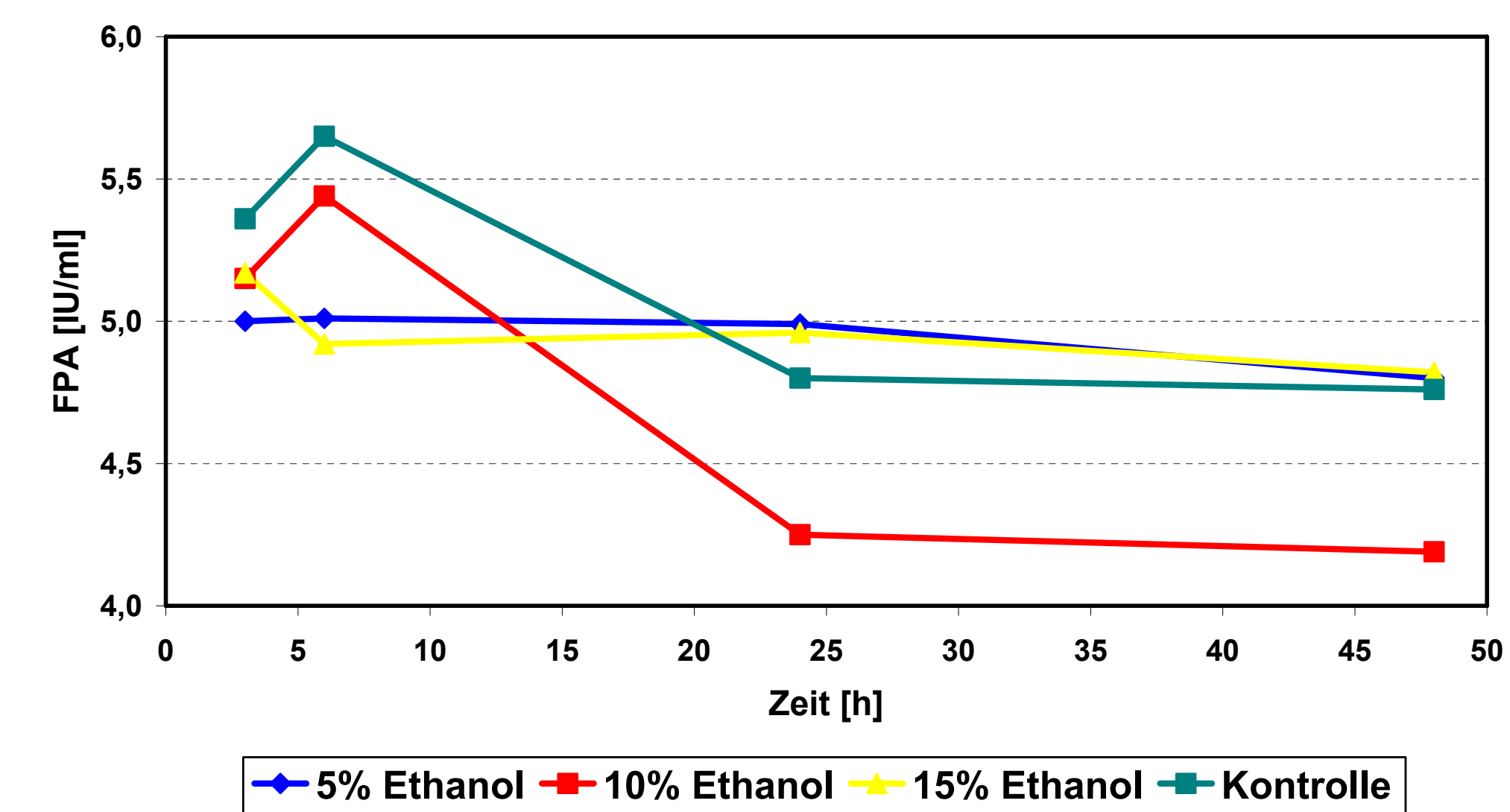


Abb. 1: Aktivität des *P. verruculosum*-Cellulasekomplexes in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration bei 30°C und MKC als Substrat

- Aktivitätsverlauf innerhalb 48h (oberes Diagramm)
- Restaktivität im Vergleich zur Kontrolle innerhalb 48h (unteres Diagramm)

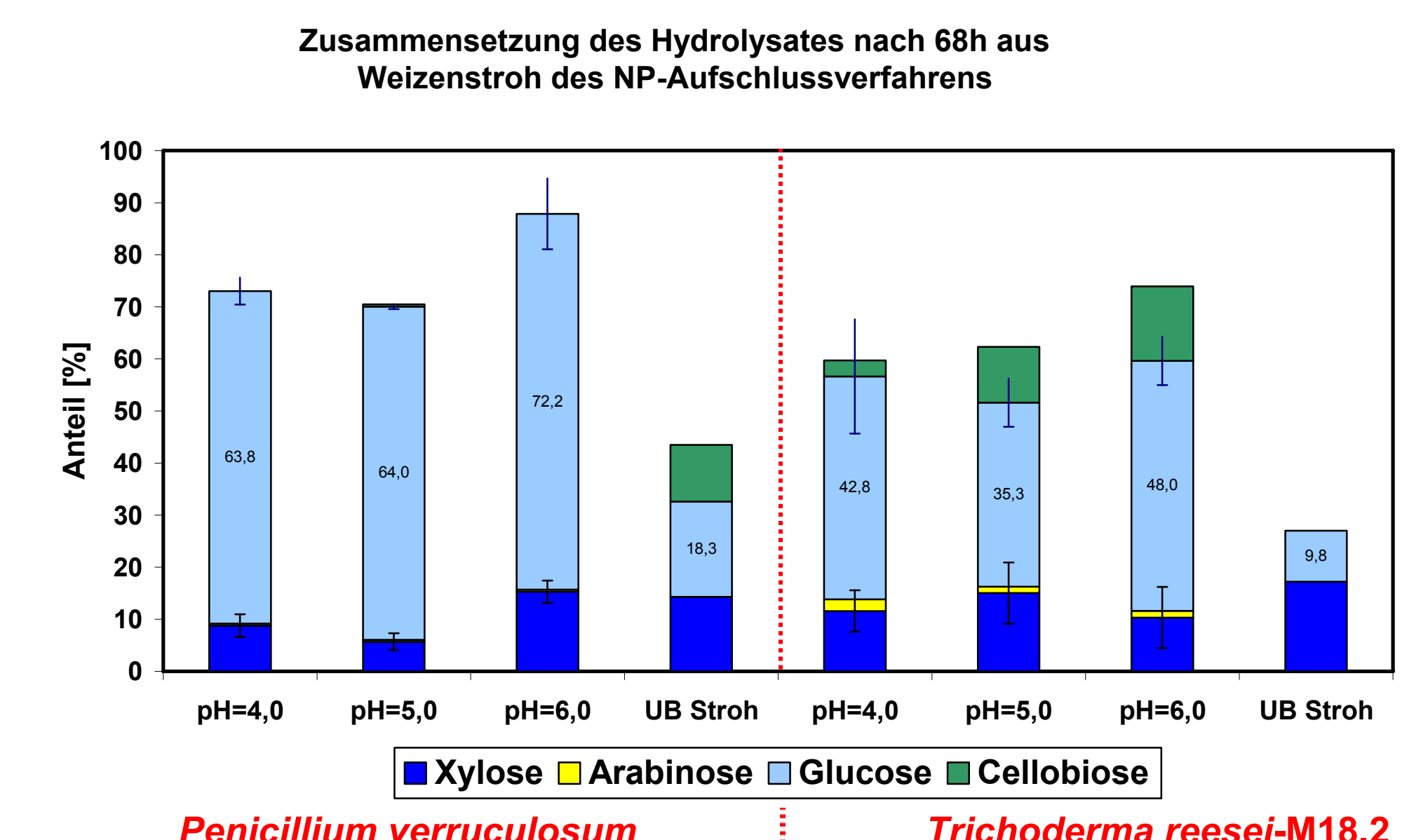
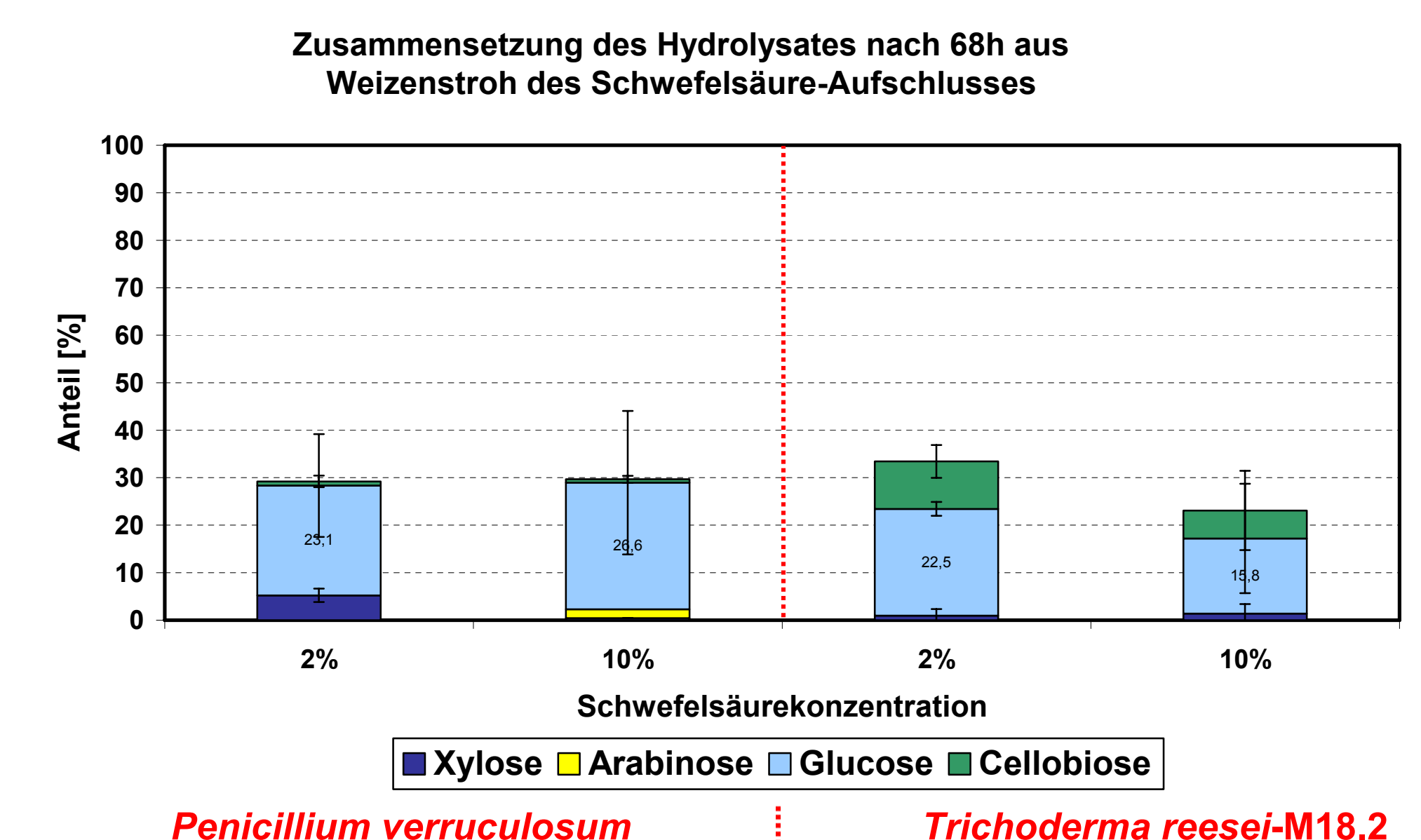


Abb. 3: Vergleich von *T. reesei*- und *P. verruculosum* Cellulase, Vergleich des NP-Aufschlusses mit dem Schwefelsäureaufschluss