



Dipl.-Ing. Kateryna Wöss

# **Kernresonanzspektroskopie zellulosischer Substrate**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der technischen Wissenschaften

eingereicht an der

**Technischen Universität Graz**

Betreuer

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hansjörg Weber

Institut für Organische Chemie

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Dissertation identisch.

---

Datum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Die Zeit im Kompetenzzentrum Holz während meiner Doktorarbeit war für mich eine sehr glückliche und schöne Zeit. Allen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, bin ich dafür sehr dankbar.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. Hedda Weber und Herr Prof. Dr. Hansjörg Weber bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich immer unterstützt haben, und sich sogar in ihrer Freizeit mit meinen Ergebnissen befasst haben.

Ich danke auch Danuta Mozdyniewicz, welche mir zu Beginn meiner Dissertation stets zur Seite stand.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Daniel Voraberger, der für mich trotz Zeitmangel und vielen Aufträgen die Viskoseproben hergestellt hat.

Danke an Matthias Mihalic, der sich für die Korrektur meiner Arbeit viele Abende Zeit genommen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Pascal Olschowski, welcher mir nicht nur bei Bastelarbeiten geholfen hat, viele Computertricks, Tricks mit Geräten gezeigt hat, die HPLC Analysen durchgeführt hat, sondern auch zugehört hat, falls ich bei schwierigen Fragen laut nachgedacht habe.

Ich möchte mich weiters bei allen Kollegen bedanken die oben nicht erwähnt wurden, aber zum Schaffen guter Zusammenarbeit und zu einem tollen Betriebsklima beigetragen haben.

## Zusammenfassung

Ablaugen aus der Zellstoffindustrie bieten eine alternative Zuckerquelle für die mikrobielle Umsetzung, bei der es zu keiner Konkurrenz mit der Nahrungsmittelerzeugung kommt. Es können daraus wertvolle Substanzen wie Ethanol, Butanol, Polyhydroxyalkanoate etc. hergestellt werden. Diese Ablaugen enthalten aber auch eine Reihe von Verbindungen, die eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen haben und eine mögliche Fermentation stören. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Phenolen, Furanderivaten, organischen Säuren und Alkoholen aus der Sulfitablauge auf das Zellwachstum des Ethanolproduzenten *Thermoanaerobacter mathranii*, des Butanolproduzenten *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* und des PHB-Produzenten *Halomonas halophila* untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Gruppen von Mikroorganismen relativ hohe Resistenzen gegen organische Säuren und Alkohole zeigen. Die Furanderivate sowie ein- und mehrwertige Phenole wirkten sogar fördernd auf das Wachstum von Mikroorganismen. Viele substituierte Phenole verursachten eine Hemmung des Zellwachstums, wobei schon geringe Differenzen in deren Struktur große Unterschiede in der inhibierenden Wirkung ergaben. Es wurde auch die Kombination aus potentiellen Inhibitoren auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* untersucht. Diese Substanzen wiesen keine synergistischen Effekte auf.

Weiter wurde der Fermentationsprozess von *Thermoanaerobacter mathranii* bei der Zugabe von potentiellen Inhibitoren mittels in situ  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie untersucht. In situ NMR Versuche zeigten, dass die fermentative Bildung von Ethanol durch *Thermoanaerobacter mathranii* in direkter Korrelation mit dessen Wachstum steht. Phenol erhöht das Wachstum und die Ethanolproduktion, während Coniferylaldehyd und Ferulasäure eine negative Wirkung darauf haben. Es wurde bewiesen, dass solche Substanzen, welche für die Mikroorganismen unschädlich sind, ihre Struktur während der Fermentationsvorgänge nicht ändern. Dagegen verändern sich die phenolischen Verbindungen, welche einen negativen Effekt auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii* aufweisen. Coniferylaldehyd wird zu Coniferylalkohol reduziert.

Schließlich wurden verschiedene Entgiftungstechniken der Sulfitablauge getestet, um die effizientesten Methoden zur Abtrennung von inhibierenden Substanzen zu ermitteln und so effizientere Fermentationen zu ermöglichen. Dafür wurde das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* nach Zugabe von verschiedenen Mengen von Sulfitablauge untersucht, welche nach unterschiedlichen Techniken entgiftet wurde. Die Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase als Katalysator war die effektivste Methode zur Entgiftung der Ablauge. Die Vorbehandlung mit Lignin und Aktivkohle zeigte ebenfalls gute Ergebnisse. Die Wirkung von Ionenaustauschern war weniger bedeutend, wobei die Vorbehandlung mit Anionenaustauscher effektiver als mit Kationenaustauscher war. Alkalibehandlungen verbesserten das Wachstum von den getesteten Mikroorganismen nur unwesentlich, wobei die Behandlung mit Calciumhydroxid effizienter als die Behandlung mit Ammoniumhydroxid war. Die Zugabe von Magnesiumhydroxid zeigte fast keine positive Auswirkung auf die Zelldichte gegenüber der unbehandelten Ablauge.

Es wird eine Methode zur Bestimmung von  $\gamma$ -Werten und – noch viel wichtiger – zur Bestimmung der Substituentenverteilung des im Viskoseprozess hergestellten Zellulosexanthogenates präsentiert. Die Methode basiert auf der Stabilisierung von Xanthogenatgruppen der Zellulosekette durch Derivatisierung mit 4-Methylbenzylbromid und der Analyse des erhaltenen Produktes mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie. Durch Dekonvolution der Spektren ergibt sich ein sehr schnelles Verfahren zur



Verfolgung von Änderungen von Xanthogenatgruppenverteilung (Xanthogenierung an der zweiten, dritten und sechsten Position der Anhydroglukoseeinheit) während des Reifevorgangs, welche mit den anderen für die Charakterisierung des Zellulosexanthogenates üblichen Techniken nicht möglich ist. Diese Methode ergab brauchbare Ergebnisse auch für die niedersubstituierten Viskosen mit  $\gamma$ -Werten von ca. 25. Die in unseren Experimenten ermittelten  $\gamma$ -Werte stimmten gut mit jenen mittels IR Spektroskopie und Iodometrischer Titration erhaltenen Werten überein.

## Abstract

Process lyes from the pulp industry provide an alternative carbon source for fermentative utilization, which does not compete with the food chain. Useful substances such as ethanol, butanol, polyhydroxyalkanoates, etc. can be produced therefrom. In addition to the desirable high amounts of mono- and oligomeric sugars, process lyes also contain decomposition products of lignosulfonates which can have inhibitory effects on the microorganisms. The first part of this study addresses the effect of organic acids, phenols, furan derivatives and alcohols on ethanol producer *Thermoanaerobacter mathranii*, butanol producer *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* and PHA producer *Halomonas halophila*. It was found that all three strains have a relatively high resistance to organic acids and alcohols. Furan derivatives and monohydric and polyhydric phenols have a positive effect on the growth of the mentioned microorganisms. Many phenolic compounds caused inhibition of cell growth, although minimal differences in their structure lead to major differences in the inhibitory effect. The effect of mixtures of potential inhibitors on the growth of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* was also investigated. However, no synergistic effects were observed.

Furthermore the fermentation process of *Thermoanaerobacter mathranii* after the addition of potential inhibitors was investigated by in situ  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. In situ NMR experiments showed that the influence of inhibitors is similar for the bacterial growth as well as for the ethanol formation. The addition of phenol has a positive influence on the growth of *Thermoanaerobacter mathranii* and leads to an improvement of the fermentation efficiency. The addition of coniferyl aldehyd and ferulic acid decreases the growth and the production of ethanol. It has been proved that substances which are harmless for the microorganism remain unchanged during fermentation. On the other hand, the phenolic compounds which have a negative effect on the growth of *Thermoanaerobacter mathranii* change its structure. Coniferyl aldehyde was reduced to coniferyl alcohol throughout the interaction with living cells.

Finally the spent sulphite liquor (SSL) was detoxified through different detoxification technologies, which help to selectively remove toxic substances and thereby improve fermentation. For determining the most effective method of the SSL detoxification the growth of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* was observed after the addition of different amounts of detoxified SSL. The comparison of these techniques shows that the detoxification with hydrogen peroxide and peroxidase as a catalyst is the most effective method for the detoxification of the SSL. The second best method is the detoxification with activated carbon and lignin. The effect of ion exchangers is less significant, whereby the detoxification with anion exchangers yields better results than with cation exchangers. The comparison of the alkaline pretreatments shows that the treatment with calcium hydroxide is more effective than the treatment with ammonium hydroxide and magnesium hydroxide. The addition of magnesium hydroxide shows almost no positive effect on the cell density compared to the untreated spent liquor.

A method for the determination of the  $\gamma$ -value and, more importantly, the distribution of xanthate groups on cellulose xanthate produced during the viscose process is presented. The method is based upon stabilization of xanthate groups attached to the cellulose chain by reaction with 4-methylbenzyl bromide and analysis of the resulting product by liquid-state  $^1\text{H}$  NMR. Careful analysis of the proton-spectrum using deconvolution gave a very fast method for the measurement of the  $\gamma$ -value which compared well with the data obtained by IR spectroscopy. In addition it could be shown that the distribution of the xanthate groups on the anhydroglucose monomeric unit (xanthation at position 2,

3 or 6) changes significantly during ripening. The method gave useful results even for viscose with low  $\gamma$ -values of about 25.

## Inhalt

Vom Baum bis zur Faser .....	1
Teil I: Biotechnologische Nutzung der Nebenströme aus der Zellstoffindustrie .....	2
1. Einleitung und Theorie .....	3
1.1. Sulfatverfahren .....	3
1.2. Sulfitverfahren .....	4
1.3. Zusammensetzung von Ablaugen aus der Zellstoffindustrie .....	7
1.4. Nutzung von Reststoffen aus der Zellstoffindustrie .....	9
1.4.1. Ethanolgewinnung .....	11
1.4.2. Butanolgewinnung .....	13
1.4.3. PHA-Gewinnung .....	14
1.5. Potentiell inhibierende Substanzen in den Sulfitablaugen .....	16
1.6. Entgiftungstechniken der Sulfitablauge .....	20
1.6.1. Biologische Verfahren .....	20
1.6.2. Physikalische Verfahren .....	22
1.6.3. Chemische Verfahren .....	23
1.6.4. Vergleich verschiedener Entgiftungstechniken .....	24
2. Resultate .....	25
2.1. Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf das Wachstum von Mikroorganismen .....	25
2.1.1. Inhibitorversuche mit Ethanolproduzenten .....	25
2.1.2. Inhibitorversuche mit PHB-Produzenten .....	30
2.1.3. Inhibitorversuche mit Butanolproduzenten .....	34
2.1.4. Überblick über die durchgeführten Inhibitorversuche .....	39
2.2. Synergistische Effekte .....	39
2.3. Verfolgung des Fermentationsprozesses von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> mittels in situ <sup>1</sup> H NMR Spektroskopie .....	43
2.3.1. In situ <sup>1</sup> H NMR Spektroskopie .....	44
2.3.2. Messungen der optischen Dichte .....	44
2.3.3. Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf die Fermentation von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	46
2.3.4. Änderung von potentiellen Inhibitoren während der Fermentation von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	47
2.3.4.1. Wechselwirkung von Coniferylaldehyd mit <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	47
2.3.4.2. Wechselwirkungen von Ferulasäure, Vanillin, Syringaldehyd, Gallussäure, Phenol und Pyrogallol mit <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	53

2.3.4.3. Wachstumsverhalten von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> nach der Zugabe von Coniferylaldehyd .....	59
2.4. Entgiftung der Sulfitablauge durch verschiedene Vorbehandlungstechniken.....	60
2.4.1. In situ <sup>1</sup> H NMR Vorversuche mit Peroxidase .....	60
2.4.2. Analyse von Zucker aus der Sulfitablauge .....	67
2.4.3. Prüfung von verschiedenen Vorbehandlungstechniken auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	68
Teil II: Bestimmung von $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels Flüssig <sup>1</sup> H NMR Spektroskopie .....	72
1. Einleitung und Theorie .....	73
1.1. Viskoseprozess .....	73
1.2. Bestimmung von $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels NMR Spektroskopie .....	74
2. Resultate .....	77
2.1. Synthesen .....	77
2.1.1. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid und Acetylierung mit Acetylchlorid..	77
2.1.2. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid und Phosphorylierung mit 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (2-Cl-TMDP) .....	78
2.2. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid .....	78
2.3. pH-Wert-Optimierung der Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid .....	80
2.4. $\gamma$ -Wert Bestimmung .....	83
2.5. Verteilung der Xanthogenatgruppen .....	84
2.6. Änderung der Xanthogenatgruppenverteilung im Reifeprozess .....	85
3. Experimenteller Teil .....	86
3.1. Chemikalien .....	86
3.2. Methoden.....	87
3.2.1. Messungen der optischen Dichte.....	87
3.2.2. Analyse von Zucker aus der Sulfitablauge mittels HPAEC-PAD .....	87
3.2.3. NMR Spektroskopie .....	87
3.2.4. IR Spektroskopie (Baldinger et al. 2003) .....	88
3.2.5. Iodometrische Titration (Zellcheming Merkblatt 1972).....	88
3.3. Inhibitorversuche mit Ethanolproduzenten .....	89
3.3.1. Medium .....	89
3.3.2. Kultivierung der Mikroorganismen .....	89
3.3.3. Inhibitorscreening .....	89

3.4. Inhibitorversuche mit PHB-Produzenten .....	90
3.4.1. Medium .....	90
3.4.2. Kultivierung der Mikroorganismen .....	90
3.4.3. Inhibitorscreening .....	90
3.5. Inhibitorversuche mit Butanolproduzenten.....	91
3.5.1. Medium .....	91
3.5.2. Kultivierung der Mikroorganismen .....	91
3.5.3. Inhibitorscreening .....	91
3.6. Synergistische Effekte .....	91
3.7. Fermentationsprozess von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> mittels in situ <sup>1</sup> H NMR Spektroskopie .....	92
3.8. Entgiftung der Sulfitablauge durch verschiedene Vorbehandlungstechniken.....	93
3.8.1. In situ <sup>1</sup> H NMR Vorversuche mit Peroxidase .....	93
3.8.1.1. Gallussäure-Versuch 1.....	93
3.8.1.2. Gallussäure-Versuch 2.....	93
3.8.1.3. Coniferylaldehyd-Versuch .....	93
3.8.2. Entgiftung mit Peroxidase .....	93
3.8.3. Entgiftung mit Anionenaustauscher.....	93
3.8.4. Entgiftung mit Kationenaustauscher.....	94
3.8.5. Entgiftung mit Aktivkohle.....	94
3.8.6. Entgiftung mit Lignin .....	94
3.8.7. Entgiftung mit Calciumhydroxid.....	94
3.8.8. Entgiftung mit Magnesiumhydroxid.....	94
3.8.9. Entgiftung mit Ammoniumhydroxid.....	94
3.8.10. Prüfung von verschiedenen Entgiftungstechniken auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	94
3.9. Bestimmung von $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels NMR Spektroskopie.....	95
3.9.1. Synthesen .....	95
3.9.1.1. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid.....	95
3.9.1.2. Acetylierung von allylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit Acetylchlorid .....	96
3.9.1.3. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid.....	96
3.9.1.4. Phosphorylierung von benzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (2-Cl-TMDP).....	97
3.9.1.5. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid .....	97

3.9.2. pH-Wert-Optimierung der Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid .....	98
3.9.2.1. Vorversuche zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid .....	98
3.9.2.2. Derivatisierung von Cellobiose mit 4-Methylbenzylbromid bei unterschiedlichen pH-Werten .....	98
3.9.2.3. Regenerierung von Zellulose in saurem Milieu .....	98
3.9.3. Dekonvolution .....	98
4. Schlussfolgerungen .....	99
Abkürzungen .....	101
Abbildungsverzeichnis .....	102
Tabellenverzeichnis .....	107
Literaturverzeichnis .....	108

## Vom Baum bis zur Faser

Als häufigstes Biopolymer und nachwachsender Rohstoff hat Zellulose (Abb. 1) eine große Bedeutung in allen Bereichen unseres Lebens.

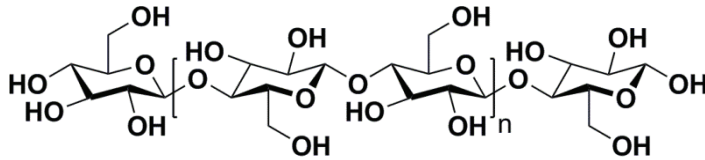


Abbildung 1: Zellulosestruktur.

Mit Baumwolle, Holz, Leinen und Hanf bietet uns die Natur reichlich Material für Zellulosefasern. Baumwolle ist zurzeit die bedeutendste Naturfaser, welche in der Textilindustrie weltweit eingesetzt wird. Ihre Anbauregionen liegen in wasserarmen Gebieten mit warmem Klima. Gleichzeitig erfordert eine erfolgreiche Kultivierung der Baumwolle einen enormen Wasserverbrauch und einen übermäßigen Einsatz von Pestiziden, was massive Umweltprobleme zur Folge hat (Klemm et al. 2005; Smole et al. 2013; Sixta 2006). Viskosefasern aus Holz sind eine Alternative zu Baumwollfasern. Ihre Herstellung hinterlässt einen geringeren Wasser- und Kohlendioxid-Fußabdruck als die Produktion von Baumwolle (Hämmerle 2011; Shen und Patel 2010).

In dieser Arbeit wird der lange Weg vom Baum bis zur fertigen Faser beschrieben, wobei zwei thematische Schwerpunkte gesetzt werden. Im ersten Teil liegt der Fokus auf der maximalen Ausnützung der Nebenströme aus der Zellstoffindustrie durch den Einsatz von Biotechnologie für die Gewinnung von Ethanol, Butanol und Polyhydroxybutyraten aus in Prozessabläufen enthaltenen Zuckern. Der zweite Schwerpunkt liegt auf der Kontrolle des Viskoseprozesses durch Ermittlung der Substituentenanzahl und ihrer Verteilung in Viskose mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie.



## **Teil I:**

### **Biotechnologische Nutzung der Nebenströme aus der Zellstoffindustrie**

## 1. Einleitung und Theorie

Im ersten Schritt zur Faserherstellung wird die reine Zellulose (Chemiezellstoff) gewonnen, wofür die restlichen Teile des Holzes entfernt werden müssen. Es handelt sich um Hemicellulose, Lignin und Extraktstoffe, dazu gehören Harze, Fette, Wachse, Farbstoffe und mineralische Bestandteile (Abb. 2). Ihre Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von der Art des Holzes (Heinze 1998; Götze 1967). Zur Entfernung dieser Bestandteile muss das Holz zuerst zerkleinert werden. Die Hackschnitzel werden anschließend chemisch aufgeschlossen. Die zwei wichtigsten Techniken dafür sind das alkalische Sulfatverfahren und das Sulfidverfahren.

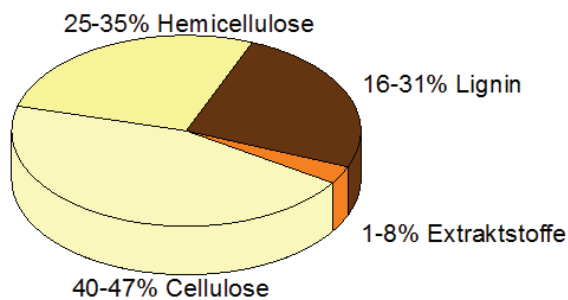


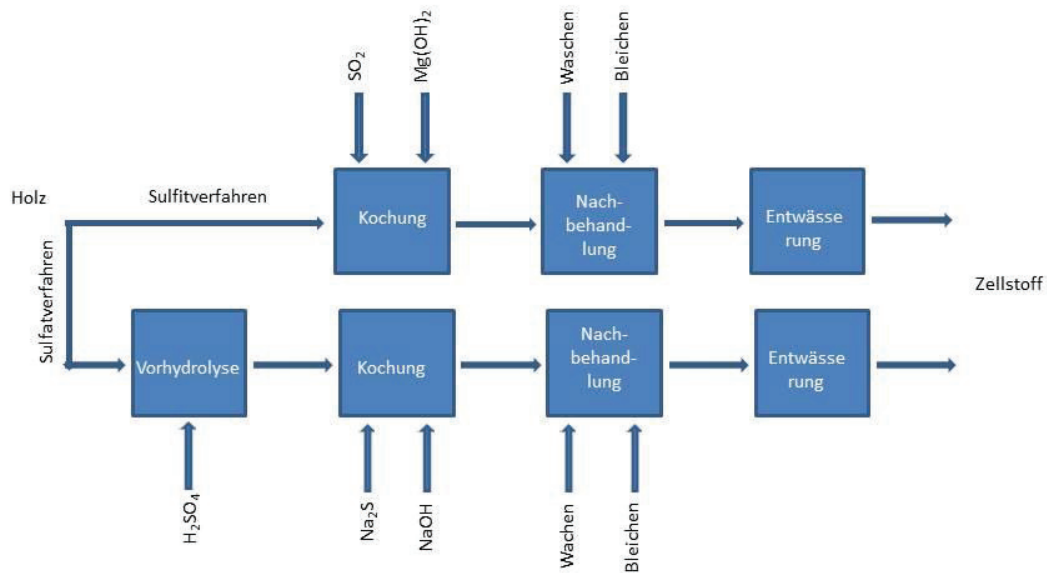
Abbildung 2: Chemische Zusammensetzung von Holz.

### 1.1. Sulfatverfahren

Im Sulfatverfahren (Abb. 3) wird das zerkleinerte Holz aufgeschlossen, wofür üblicherweise Natronlauge und Natriumsulfid verwendet werden. Das Lignin wird nucleophil gespalten und geht in das lösliche Alkalilignin über, welches von dem Zellstoff leicht abgetrennt werden kann. Nach diesem Verfahren gewonnener Zellstoff enthält noch große Mengen an Hemicellulose und kann zur Papierherstellung verwendet werden.

Für die Herstellung von Chemiezellstoff muss die Hemicellulose in einem Vorhydrolyseschritt entfernt werden. Dafür wird Schwefelsäure bzw. Essigsäure eingesetzt, die letztere entsteht aus dem Holz durch Abspaltung von Acetylgruppen während einer Dampfbehandlung bei 170 °C. Der Polymerisationsgrad der Hemicellulose wird durch die Vorhydrolyse gesenkt, was ihre Extraktion ermöglicht.

Das Sulfatverfahren ist ein schnelles und effektives Verfahren mit einer relativ einfachen Chemikalienrückgewinnung. Auch minderwertiges und harzreiches Holz ist für das Verfahren geeignet. Der Zellstoff nach dem Sulfatverfahren weist eine hohe Festigkeit auf. Nachteilig ist der relativ hohe Restligninanteil im Zellstoff, was eine starke Bleiche erfordert.

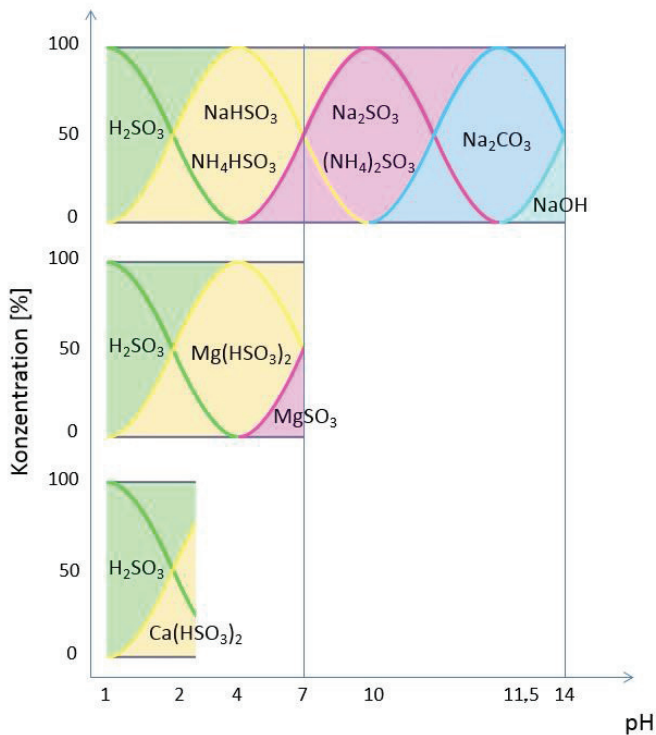


**Abbildung 3: Schema des Sulfat- und Sulfitverfahrens. Der Vorhydrolyseschritt im Sulfatverfahren ist optional und ist nur bei der Chemiezellstoffgewinnung erforderlich.**

## 1.2. Sulfitverfahren

Trotz allen Vorteilen des Sulfatverfahrens wird Chemiezellstoff viel häufiger nach dem Sulfitverfahren hergestellt (Abb. 3). Im Sulfitverfahren werden Schwefeldioxid und verschiedene Hydroxide eingesetzt: Calciumhydroxid, Magnesiumhydroxid, Natriumhydroxid und Ammoniumhydroxid. Beim Einleiten von Schwefeldioxid ins Wasser entsteht Schwefelige Säure, welche nach der Zugabe einer Base als Hydrogensulfit bzw. Sulfit vorliegt. Welches Anion in der Kochlauge vorhanden ist, hängt vom pH-Wert ab. Durch Basenzugabe steigt der pH-Wert, es bildet sich zuerst Hydrogensulfit. Die weitere Zugabe von Base verursacht die Entstehung von Sulfit.

Bei dem Einsatz von Calciumhydroxid darf der pH-Wert nicht über 2,8 steigen, sonst fällt Calciumhydrogensulfit aus. Trotz diesem großen Nachteil wurde früher fast ausschließlich diese preisgünstige Base verwendet. Aufgrund der heutzutage durchgeführten Rückgewinnung von Chemikalien hat die Anwendung von Calciumhydroxid ihre Bedeutung verloren. Bei dem Einsatz von Magnesiumhydroxid kann der pH-Wert auf 4-5 erhöht werden, oberhalb von diesem Bereich fällt Magnesiumsulfit aus. Bei der Verwendung von Ammoniumhydroxid und Natriumhydroxid besteht keine Limitierung durch den pH-Wert der Kochlauge, da Ammonium- und Natriumsalze eine sehr hohe Löslichkeit aufweisen. Natriumhydrogencarbonat bzw. Natriumcarbonat sind relativ günstige Chemikalien und können zusätzlich der Kochlauge zugegeben werden, um die während der Kochung gebildeten organischen Säuren zu neutralisieren (Abb. 4) (Rydholm 1965).



**Abbildung 4: pH Existenzbereiche von während der Kochung vorhandenen Substanzen: Schwefelige Säure, Hydrogensulfit, Sulfit und Carbonat.**

Das Lignin wird im Sulfitverfahren sulfoniert, es entstehen wasserlösliche Ligninsulfonsäuresalze, die sogenannten Lignosulfonate. Im sauren Milieu findet eine teilweise Hydrolyse der Hemicellulosen statt. Die Polysaccharidketten werden in wasserlösliche Monomere gespalten. Aufgrund der niedrigen Löslichkeit von Harzsäuren unter sauren Bedingungen können für den Prozess nur harzarme Holzarten verwendet werden, aus denen Zellstoffe mit einer niedrigeren Festigkeit entstehen. Der im Sulfitverfahren erhaltene Chemiezellstoff hat einen niedrigen Ligninanteil und daher einen sehr hohen Reinheitsgrad.

Je nach eingesetztem Hydroxid unterscheidet man zwischen saurem, neutralem, alkalischem Sulfitverfahren, Bisulfitverfahren, Anthrachinon-katalysiertem Sulfitverfahren und Mehrstufen-Sulfitverfahren, wobei für die Herstellung von Chemiezellstoff üblicherweise das saure und manchmal das Mehrstufen-Sulfitverfahren eingesetzt wird. Das erste Verfahren bietet einen preislichen Vorteil und seine Durchführung ist technisch weniger aufwendig als das Mehrstufen-Sulfitverfahren. In Tabelle 1 werden all diese Techniken zusammengefasst.

Im sauren Sulfitverfahren wird die Kochung mit einem Überschuss von Schwefeldioxid durchgeführt. Als Base werden Magnesiumhydroxid, Natriumhydroxid bzw. Ammoniumhydroxid verwendet. Beim Einsatz von Magnesiumhydroxid werden die höchsten Zellstoffausbeuten mit einem hohen Weißgrad erreicht. Allerdings ist dieser Prozess mit langen Kochzeiten und hohen Temperaturen verbunden. Durch Aufschluss mit Natriumhydroxid erhaltener Zellstoff hat eine hohe Festigkeit. Der Einsatz von Ammoniumhydroxid erfordert sehr kurze Kochzeiten. Der dadurch gewonnene Zellstoff hat einen niedrigeren Weißgrad und erfordert daher einen höheren Einsatz von Bleichchemikalien.

Im Bisulfitverfahren wird der Aufschluss mit äquivalenten Mengen von Schwefeldioxid und üblicherweise Magnesiumhydroxid, manchmal auch Natrium- bzw. Ammoniumhydroxid, bei einem pH-Wert von 3,5-5,5 und hohen Temperaturen durchgeführt. Der dadurch erzeugte Zellstoff enthält noch viel Restlignin und muss daher gebleicht werden.

Im Neutralsulfitverfahren werden Schwefeldioxid sowie Natrium- bzw. Ammoniumhydroxid eingesetzt. Trotz hoher Kochtemperaturen bleibt mehr als die Hälfte des Lignins und der Hemicellulosen im Zellstoff. Der Zellstoff nach dem Neutralsulfitverfahren ist ein klassischer Rohstoff für die Herstellung von Wellpappkartons.

Im alkalischen Sulfitverfahren werden Schwefeldioxid und vorwiegend Natriumhydroxid als Base verwendet. Für den Aufschluss bei pH 9-13 können zahlreiche Holzarten eingesetzt werden. Der entstehende Zellstoff ist gut bleichbar und hat eine ähnlich hohe Festigkeit wie Sulfatzellstoff. Nachteilig sind die technische Aufwendigkeit dieses Verfahrens und die problematische Chemikalienrückgewinnung.

Im mit Anthrachinon-katalysierten Sulfitverfahren werden Schwefeldioxid und meistens Natriumhydroxyd mit bzw. ohne Methanol als Lösungsmittel unter Zugabe von Anthrachinon verwendet. Die Reaktion läuft bei pH 9-13 ab. Anthrachinon verhindert die Abbaureaktion von Polysacchariden unter alkalischen Bedingungen, daher kann die Kochung bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, was den Prozess wesentlich beschleunigt. In diesem Verfahren gewonnener Zellstoff zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Festigkeit und hohe Ausbeute aus.

Im Mehrstufen-Sulfitverfahren werden verschiedene Techniken kombiniert, z.B. wird nach dem Verfahren unter neutralen Bedingungen ein Schritt im sauren Milieu geschaltet, oder dem Bisulfitverfahren folgt die Kochung unter alkalischen Bedingungen. Aufgrund der hohen Löslichkeit von Natriumsalzen wird Natriumhydroxid als Base bei diesen Aufschlüssen verwendet. Das Mehrstufen-Sulfitverfahren ist eine sehr effektive Möglichkeit zur Zellstoffgewinnung, bei dem die Nachteile eines Prozesses durch die Vorteile des anderen ausgeglichen werden können. Dadurch werden sehr hochwertige Zellstoffe gewonnen. Dieses Verfahren ist allerdings technisch viel aufwendiger als alle anderen oben erwähnten Techniken.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Sulfitverfahrentechniken.**

Verfahren	Base	pH	T [°C]	t [min]	Produkte	Vorteile	Nachteile
saures Sulfit-verfahren	Ca(OH) <sub>2</sub> , Mg(OH) <sub>2</sub> , NaOH, NH <sub>4</sub> OH	1-2	125- 143	180- 420	Chemiezellstoff, grafische Papiere	helle Zellstoffe	begrenzte Zahl von Holzarten als Rohstoff, niedrige Festigkeit des Zellstoffs, niedrige Ausbeuten
Bisulfit-verfahren	Mg(OH) <sub>2</sub> , NaOH, NH <sub>4</sub> OH	3-5	150- 170	60- 180	grafische Papiere	hohe Ausbeuten	hoher Restligninanteil
neutrales Sulfit-verfahren	NaOH, NH <sub>4</sub> OH	5-7	160- 180	25- 180	Wellpappe	hohe Ausbeuten	hoher Restligninanteil
alkalisches Sulfit-verfahren	NaOH	9-13	160- 180	180- 300	Papier	breite Palette an Holzarten als Rohstoff, hohe Festigkeit des Zellstoffs	technisch aufwendig, problematische Chemikalien-rückgewinnung
Anthrachinon-katalysiertes Sulfit-verfahren	NaOH	9-13	170- 175	150- 240	Papier	kurze Aufschlusszeit, breite Palette an Holzarten als Rohstoff, hohe Festigkeit des Zellstoffs, hohe Ausbeuten	technisch aufwendig
Mehrstufen-Sulfit-verfahren	NaOH	1-10	135- 180	60- 180	Chemiezellstoff, fettgedichte Papiere	sehr flexibel	technisch aufwendig

### 1.3. Zusammensetzung von Ablaugen aus der Zellstoffindustrie

Die Ablaugen aus der Zellstoffindustrie enthalten eine breite Palette von Abbauprodukten der Hemicellulosen, des Lignins und weiterer Holzbestandteile. Dazu gehören Monosaccharide, Zuckersäuren, organische Säuren, Lignosulfonatsalze, Extraktstoffe und deren Abbauprodukte. Die chemische Zusammensetzung von Kochlaugen ist abhängig vom Verfahren, nach dem sie hergestellt werden, den Holzarten und den Chemikalien, welche für die Kochung verwendet werden.

Der Anteil an Zuckern in der Sulfitablauge ist mehr als dreimal so hoch wie der Zuckeranteil der Sulfatablauge (Tab. 2 und 3). Letzterer ist für die Herstellung von Papierzellstoff sehr vorteilhaft, da die im Zellstoff verbleibenden Hemicellulosen zu höheren Ausbeuten und Papierfestigkeiten führen (Sixta 2006). Für diese Arbeit, in der die Verwendung von Monosacchariden aus den Kochlaugen als Substrat für die mikrobielle Herstellung von verschiedensten Verbindungen untersucht werden soll, sind die zuckerarmen Sulfatablaugen dagegen weniger relevant, daher wird hier größere Aufmerksamkeit der Sulfitablauge gewidmet.

Sulfitablauge ist eine dunkelbraune Flüssigkeit, welche aus Lignosulfonaten, Ligninabbauprodukten (wie z.B. Vanillinsäure und andere substituierte Phenole), Kohlenhydraten (Mono- und Oligosaccharide) und deren Abbauprodukten (wie z.B. Furfural oder Essigsäure) und aus anorganischen Salzen (wie Sulfiten und Sulfaten) besteht (Marques et al. 2009; Rydholm 1965; Sjöström 1993; Petersen et al. 2014).

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Sulfitablauge aus verschiedenen Holzarten nach saurem Sulfitverfahren.**

	Norwegische Fichte	Gesamttrockenmasse [%]			
		Fichte	Birke	Espe	Eukalyptus
Lignin	55				46
Kohlenhydrate	28	23	31	31	25
Arabinose	1	1		2	1
Xylose	6	5	21	24	16
Mannose	12	11	6	3	1
Galaktose	5	3	1		4
Glukose	4	3	1	1	2
Rhamnose					1
Aldonsäuren	5				
Glukuronsäure		1	2	1	
Essigsäure	4				6
Extraktstoffe	4				1
Furfural					2
Andere Komponenten	4				

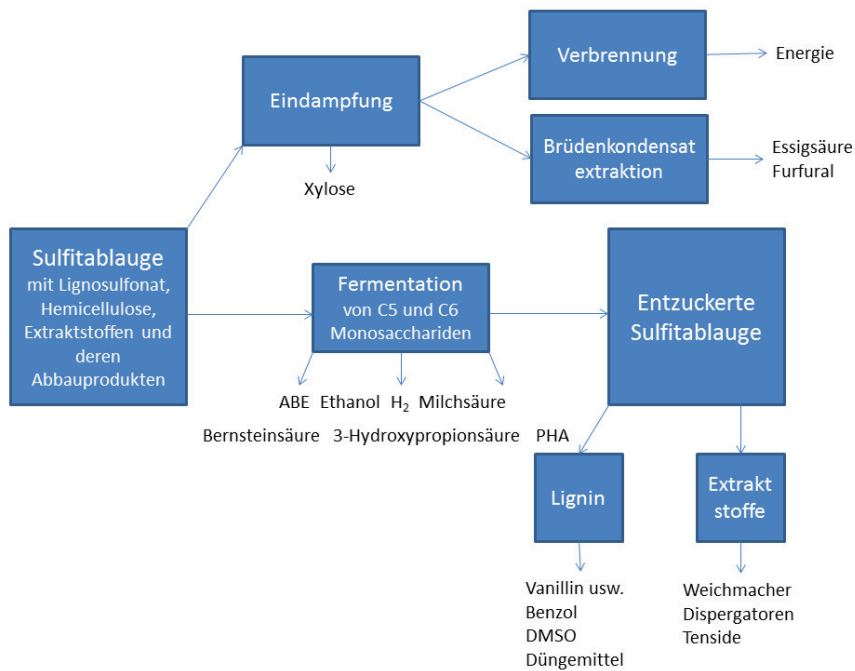
**Tabelle 3: Zusammensetzung der Sulfatablauge.**

	Gesamttrockenmasse [%]	
	Kiefer	Birke
Lignin	33	27
Aliphatische Carbonsäuren	31	32
Ameisensäure	6	4
Essigsäure	4	9
Glykolsäure	2	2
Milchsäure	3	2
2-Hydroxybutansäure	1	5
3,4-Dideoxypentansäure	2	1
3-Deoxypentansäure	1	1
Xyloisosaccharinsäure	1	2
Glucoisosaccharinsäure	7	3
Andere organische Bestandteile inkl. Hemicellulosen	8	12
Anorganische Bestandteile	28	29

#### 1.4. Nutzung von Reststoffen aus der Zellstoffindustrie

Derzeit werden jährlich ca. 130 Mio. Tonnen Holz für die Herstellung von Chemiezellstoff weltweit eingesetzt. Damit fallen relativ große Mengen Prozessabläugen an, welche zurzeit größtenteils thermisch verwertet werden. Die Abläuge bestehen zu einem großen Teil aus Lignonsulfonat, enthalten aber auch zu einem beträchtlichen Anteil Monosaccharide, die aus den Holz-Hemicellulosen stammen. Im Sulfiterverfahren entstehende Essigsäure, Xylose und Furfural werden inzwischen zurückgewonnen und vermarktet. Die Monosaccharide der Abläuge stellen ein optimales Ausgangssubstrat für verschiedene biotechnologische Verfahren dar. Die fermentative Entzuckerung von Abläugen und weitere Verwertung von Lignosulfonat-Bestandteilen und Extraktstoffen würde einen weiteren Beitrag zur Nachhaltigkeit dieses Prozesses leisten. Lignin mit seinem hohen Brennwert kann nicht nur als Energiequelle genutzt werden, was heutzutage seine Hauptanwendung darstellt, sondern auch als Düngemittel, Rohstoff für Klebstoffe, Aktivkohle und eine Reihe von Chemikalien wie Vanillin, verschiedene Phenole, Dimethylsulfoxid, Benzol, und Acetylen. Aus Extraktstoffen werden Weichmacher, Dispergatoren und Tenside gewonnen. Durch die fermentative Verwertung von Kohlenhydraten aus Kochabläugen können Bioenergieträger wie Ethanol, Butanol und Wasserstoff gewonnen werden. Auch die mikrobielle Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten (PHA), Milchsäure, Bernsteinsäure und 3-Hydroxypropionsäure, welche die Basis für die Herstellung verschiedenster Biopolymere darstellen, würde den Prozesshorizont sehr erweitern (Abb. 5) (Sjöde et al.; Cheng et al. 2011; Adsul et al. 2011; Ren et al. 2016; Villegas und Gnansounou 2008; Guldt 2012).





**Abbildung 5: Möglichkeiten der Nutzung von Sulfitablauge.**

Trotz der derzeit niedrigen Ölpreise ist es umso wichtiger, die Forschung zu alternativen Treibstoffen und Basischemikalien voranzutreiben, um beim Versiegen der fossilen Rohstoffquellen alternative Technologien in anwendbarer Form zur Verfügung zu haben. Durch die Bioenergieerzeugung aus Reststoffen der Zellstoffindustrie werden erneuerbare Rohstoffquellen genutzt und es kommt zu einer Verringerung des Energie- und Ressourceneinsatzes und der damit verbundenen negativen Umwelteinwirkungen durch fossile Treibstoffe. Weltweit werden Bioenergeträger aus den verschiedensten Substraten mit teilweise umstrittener Herkunft bereits großtechnisch hergestellt. Der Ansatz zur Anwendung nachhaltiger akzeptierter Herstellungsverfahren bzw. Ressourcen ist ein wichtiger Schritt zur Erhöhung des biogenen Anteils im Treibstoffsektor und gleichzeitig zur Lösung des Flächenkonkurrenzdilemmas (Fatehi 2013; González-García et al. 2009; Borrion et al. 2012; Mussatto et al. 2010; Frederick et al. 2008).

Derzeit ist Ethanol der Hauptbiokraftstoff, der weltweit verwendet wird. Seine Gewinnung hat ein hohes Potential, da die Anwendung von Ethanol immer stärker verbreitet wird (Galbe und Zacchi 2002). Die Herstellung von Biobutanol ist eine attraktive Alternative zur Bioethanolherstellung. Bioethanol ist in seiner Eignung als Kraftstoffadditiv beschränkt hinsichtlich seines Energieinhaltes, der Mischbarkeit mit fossilem Diesel bzw. Benzin und hinsichtlich seines direkten Einsatzes in konventionellen Antrieben ohne deren Adaption. Dagegen kann Butanol sowohl mit Ottokraftstoffen in allen Verhältnissen gemischt oder gänzlich ersetzt werden als auch mit Dieselmotoren bis zu einem Anteil von 50 % gemischt werden. Hinzu kann Butanol in konventionellen Motoren ohne Modifikationen verwendet werden. Biobutanol selbst kann aber nicht nur als Treibstoff eingesetzt werden, sondern auch als Plattformchemikalie für die chemische Industrie (Kaltschmitt et al. 2016; Salemme et al. 2016).

Ein weiteres innovatives Produkt stellen Polyhydroxyalkanoate (PHAs) dar. PHAs sind Polyester, welche intrazellulär durch Bakterien als Energiespeicher oder Reservestoff gebildet werden. Sie sind biologisch abbaubar sowie untoxisch und daher für die Herstellung von Verpackungen in der Lebensmittelindustrie, Nahtmaterialien, Implantate im medizinischen Bereich und für

pharmazeutische Depotpräparate perfekt geeignet. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist Polyhydroxybutyrat (PHB). PHB ist ein Homopolymer der Hydroxybuttersäure. Es zeigt eine absolut lineare isotaktische Struktur. Das Polymer ist hochkristallin (60-70 %) und daher für viele Anwendungen zu spröde. Dieser Nachteil kann durch Polymerisation mit Comonomeren beseitigt werden. Die Copolymere haben eine größere technische Bedeutung. Die industrielle Gewinnung von PHB steckt noch in den Kinderschuhen, in der Zukunft wird aber ein starkes Wachstum des Marktanteils der PHAs erwartet (Endres und Siebert-Raths 2011; Akiyama et al. 2003; Wang et al. 2014; Weng et al. 2011).

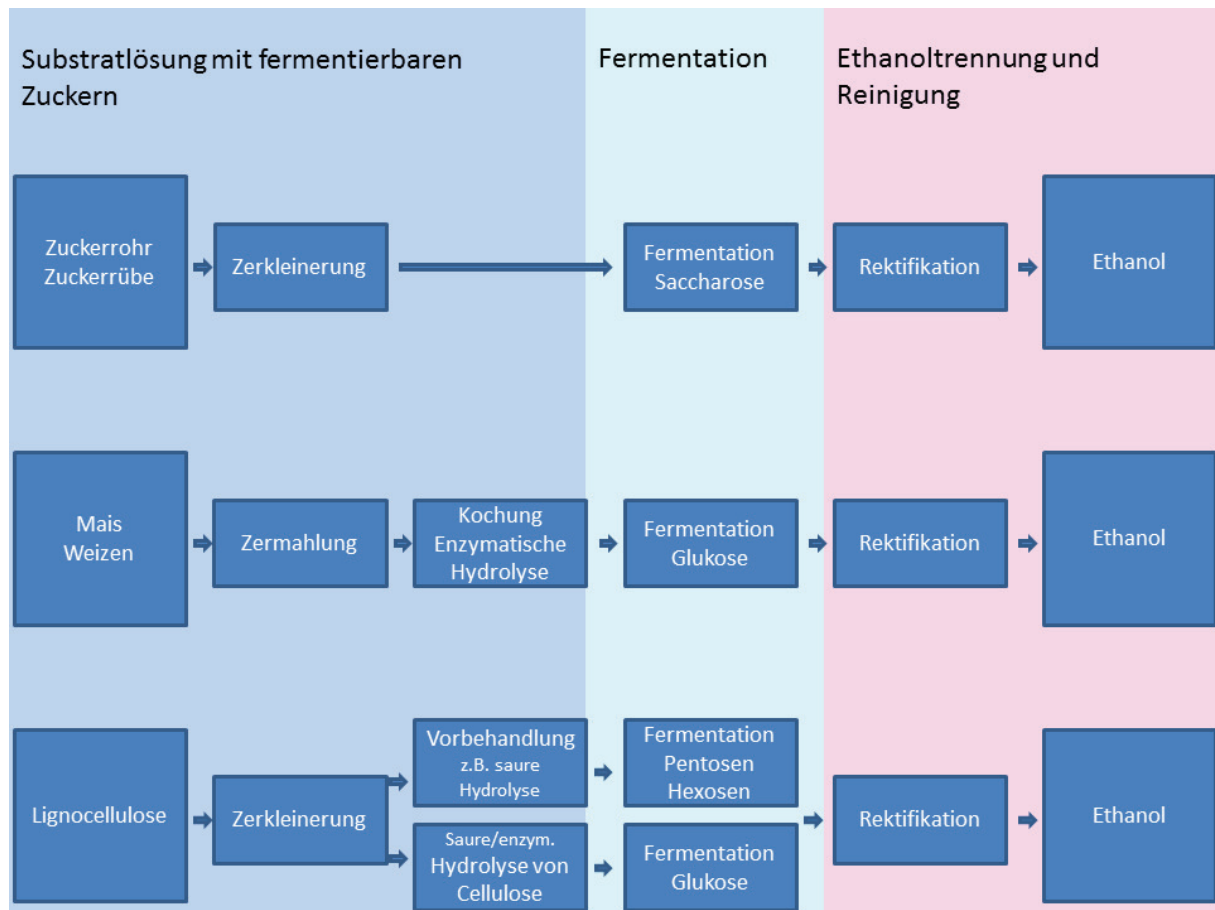
#### **1.4.1. Ethanolgewinnung**

Etwa 95 % des Ethanols werden heute aus Landwirtschaftsprodukten hergestellt. Von diesen entfallen 40 % auf Rohstoffe wie Zuckerrohr und Zuckerrüben und 60 % auf Stärke. Kraftstoff-Ethanol kann fermentativ direkt aus Monosacchariden gewonnen werden sowie aus Polysacchariden (Zellulose und Stärke), welche zuerst in Monosaccharide umgewandelt werden müssen. Somit können die Kohlenhydratquellen in drei Hauptgruppen klassifiziert werden: einfache Zucker (Zuckerrohr, Zuckerrüben, Sorghumhirse, Molke und Melasse), Stärke (Mais, Weizen und Maniok) und Lignozellulose (Holz, Stroh, landwirtschaftliche und pflanzliche Reste).

Die Ethanolproduktion wird in der Regel in drei Schritte eingeteilt: Gewinnung einer Substratlösung mit fermentierbaren Zuckern, fermentative Erzeugung von Ethanol sowie Produkttrennung und Reinigung durch Rektifikation. In Abhängigkeit vom Rohmaterial erfordert der erste Schritt unterschiedliche Verfahren, die weiteren Verfahrensstufen sind für alle Ausgangssubstrate ähnlich. (Abb. 6).

Die simpelste Methode stellt der Einsatz von einfachen Zuckern als Substrat dar, wobei Ethanol direkt aus dem Saft von Zuckerrohr und Zuckerrüben oder aus Melasse mit Hilfe von Hefen hergestellt werden kann. Außer der Zerkleinerung des Rohmaterials benötigt diese Technik keine weiteren Behandlungen. Stärke kann von Hefen nicht verwertet werden, daher müssen Mais und Weizen nach der Zermahlung durch Kochung geliert und enzymatisch mit  $\alpha$ -Amylase und Amyloglucosidase in Glukosemonomere gespalten werden.

Die wichtigsten Prozessstufen der Ethanolgewinnung aus lignocellulosischem Material sind die Vorbehandlung der Zellulose, welche die mechanische Zerkleinerung, Dampfexplosion sowie Behandlung mit Säuren, Laugen oder Lösungsmittelextraktion, bzw. saure oder enzymatische Hydrolyse von Zellulose umfasst, und die weitere Fermentation, Ethanoltrennung und Reinigung durch Rektifikation. Durch die Vorbehandlung von lignocellulosischem Substrat (z.B. Hydrolyse mit verdünnten Säuren) werden die Hemicellulosen in ihre Monomere (Pentosen und Hexosen) gespalten, welche fermentativ in Ethanol umgewandelt werden. Nach der Vorbehandlung verbleiben in der Festphase Zellulose und Lignin. Zellulose kann weiter durch saure oder enzymatische Hydrolyse in Glukose gespalten werden, welche ebenfalls zu Ethanol fermentiert wird. Trotz hoher Produktionskosten wegen des technischen Aufwands verglichen mit der Ethanolherstellung aus Zuckerrohr, Zuckerrübe und Stärke, sind Polysaccharide aus Lignozellulose (Zellulose und Hemicellulose) als Ausgangsmaterial für die Ethanolproduktion von großem Interesse. Es wird prognostiziert, dass in naher Zukunft Lignozellulose zum Hauptrohstoff der Ethanolgewinnung wird (Mussatto et al. 2010; Brethauer und Wyman 2010; Parisutham et al. 2014; Sanchez und Cardona 2008; Cardona und Sanchez 2007; Sun und Cheng 2002).



**Abbildung 6: Drei Stufen der Ethanolproduktion aus unterschiedlichen Substraten.**

Ein effizientes Verfahren zur Gewinnung von Ethanol durch Fermentation von allen in Zellstoffablaugen enthaltenen Zuckern wurde noch nicht entwickelt. Die Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Zymomonas mobilis* sind sehr robust gegen Abbauprodukte von Lignin und Holzextraktstoffen, welche in den Ablaugen zahlreich vorhanden sind, können aber nur Hexosen verstoffwechseln (Tesfaw und Assefa 2014; Batt et al. 1986; Olsson und Hahn-Hägerdal 1996). *Pichia stipitis* könnte auch Pentosen verwerten, ist aber relativ empfindlich gegenüber allen anderen Substanzen aus der Lauge (Xavier et al. 2010; Ferrari et al. 1992; Stoutenburg et al. 2011; Tran und Chambers 1985). Es wurde versucht diese Problematik gentechnisch zu lösen, indem *Saccharomyces cerevisiae* Fremdgene eingepflanzt wurden, um den Abbau von Pentosen zu ermöglichen. Der Einsatz von genmodifiziertem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm führte zur Verbesserung der Ethanolausbeuten von bis zu 130 % für die Fermentation der Sulfitablauge aus Hartholz und bis zu 20 % für die Sulfitablauge aus Weichholz verglichen mit nicht genmodifizierten Hefen (Helle et al. 2004; Helle et al. 2008; Pasha et al. 2007). Ein weiterer genereller Nachteil von Hefen ist, dass ihre optimale Wachstumstemperatur bei 25-30 °C liegt, was ideale Bedingungen für bakterielle Kontaminationen (besonders mit Laktobazillen) bietet. Außerdem ist wertvolle Prozessenergie nötig, um die Ablauge von 160 °C auf 30 °C zu kühlen. Zur Gewinnung von Ethanol muss die Ablauge erneut auf 80 °C aufgeheizt werden (Fatehi 2013; Mussatto et al. 2010). Das Problem kann durch den Einsatz von thermophilen Mikroorganismen gelöst werden. Das Temperaturoptimum für das Wachstum des thermophilen Stammes *Thermoanaerobacter mathranii* liegt z.B. bei 65 °C, was das Wachstum der meisten (in der Regel mesophilen) Mikroorganismen unterbindet. Für die Destillation von Ethanol muss die Lösung nur um 15 °C statt um 50 °C erhitzt werden (Abb. 7) (Bryan 2009). Ein weiterer

Vorteil dieser Kultur ist ihre gute Verwertung der meisten Zucker aus den Sulfitaflaugen. *Thermoanaerobacter mathranii* ist ein relativ unempfindlicher Stamm gegen Abbauprodukte von Lignin und Holzextraktstoffen, welcher die Zugabe von bis zu 2,7 % Trockengehalt der Sulfitaflauge und 4,7 % Trockengehalt der mit Aktivkohle behandelten Sulfitaflauge toleriert (Weissgram et al. 2015b; Rainey und Oren 2006; Larsen et al. 1997).

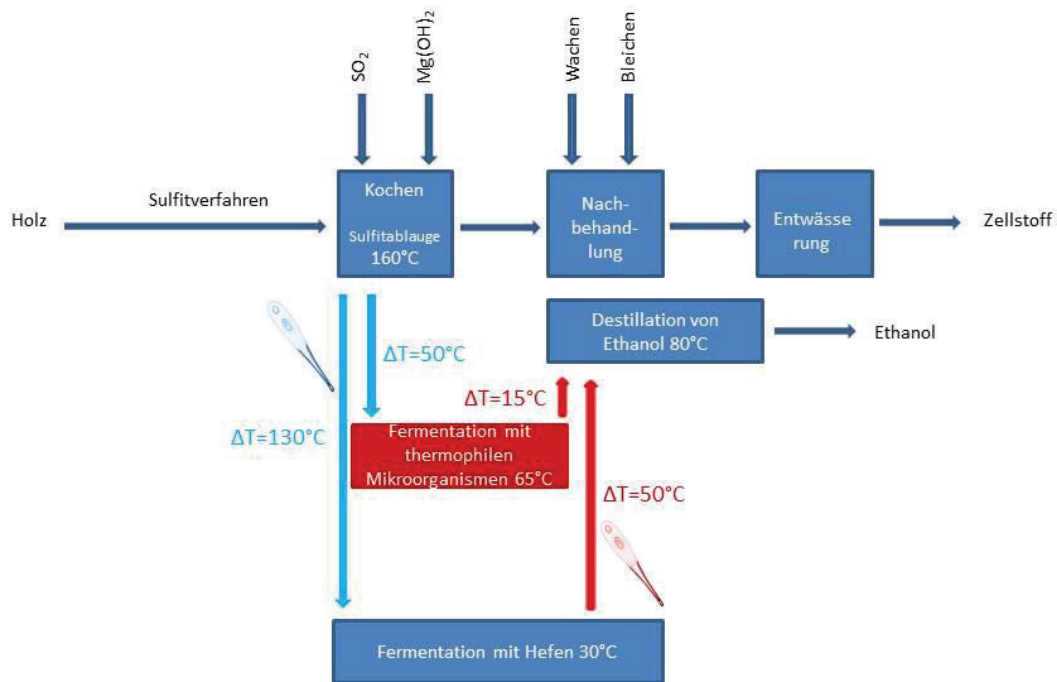


Abbildung 7: Energetische Vorteile des Einsatzes von thermophilen Mikroorganismen bei der Ethanolherstellung im Vergleich zu herkömmlichen Hefen.

#### 1.4.2. Butanolgewinnung

Die biotechnologische Herstellung von Butanol wurde schon 1861 durch Louis Pasteur beschrieben und erreichte durch den Weizmann-Prozess (Aceton-Butanol-Ethanolgärung - ABE) Anfang des 20. Jahrhunderts ihren Höhepunkt (Dunford 2012). Dieses Verfahren basierte auf stärkehaltigen Substraten und verlor aufgrund des Erdölbooms wieder an Bedeutung. Neben Stärke gibt es eine Reihe von weiteren Substraten, welche für die ABE-Fermentation geeignet sind. Im Gegensatz zu Hefen, welche nur Mono- oder Disaccharide zu Ethanol vergären können, sind viele Clostridienarten in der Lage auch komplexere Substrate wie Zellulose und hauptsächlich auf Pentosen basierende Hemicellulose abzubauen. Somit sind sie für die Fermentation von Reststoffen der Zellstoffindustrie wie beispielsweise Sulfitaflauge perfekt geeignet (Tashiro et al. 2004; Fatehi 2013; Survase et al. 2011; Lee et al. 2008; Freier-Schröder et al. 1989; Liu et al. 2015; Ramey und Yang 2004). *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* und *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sind die am besten untersuchten Vertreter der Mikroorganismen, welche zur ABE-Produktion fähig sind. In vorangegangenen Projekten wurden mehrere ABE-

produzierende Clostridienstämme getestet. Aufgrund der sehr guten Butanolausbeute wurde in dieser Arbeit *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* eingesetzt.

Die Abb. 8 erklärt am Beispiel von *Clostridium acetobutylicum* die Stoffwechselwege der ABE-Fermentation. Hier ist gut zu sehen, dass an der fermentativen Umsetzung von Zuckern zu Aceton, Butanol und Ethanol mehrere Stoffwechselwege beteiligt sind, die auf komplexe Weise miteinander interagieren. Die ABE-Fermentation besteht aus zwei Phasen: der acidogenen (säurebildenden) und der solventogenen (Lösungsmittelbildenden) Phase. Die Zucker werden zunächst über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Während der Acidogenese findet eine Phase exponentiellen Zellwachstums statt. In diesem Stadium werden ausschließlich Säuren, insbesondere Laktat, Acetat und Butyrat, gebildet sowie Wasserstoff und Kohlendioxid. Erst mit dem Übergang zur stationären Phase setzt die Solventogenese, das heißt die Produktion von Aceton, Butanol und Ethanol ein. Die H<sub>2</sub>-Produktion geht dabei zurück. Hierbei werden auch die zuvor gebildeten Säuren wieder aufgenommen und zu Aceton, Butanol und Ethanol verstoffwechselt (Aristilde et al. 2015; Amador-Noguez et al. 2011; Lee et al. 2008; Gheshlaghi et al. 2009; Dusseaux et al. 2013; Ramey und Yang 2004; Schuster et al. 1998).

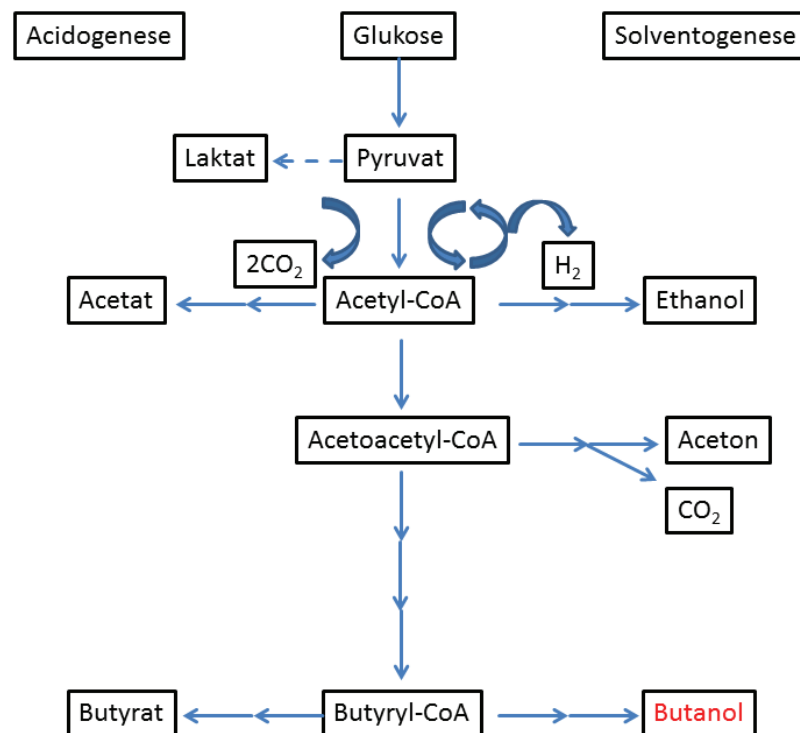


Abbildung 8: Stoffwechselwege von *Clostridium acetobutylicum* bei der ABE-Fermentation.

### 1.4.3. PHA-Gewinnung

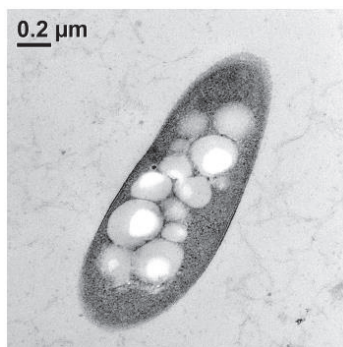
Grundsätzlich sind drei verschiedene Möglichkeiten zur Gewinnung von PHA bekannt. Dazu gehören bakterielle Fermentation, Synthese in genmodifizierten Pflanzen und enzymatische Katalyse in zellfreien Systemen.

Mit Hilfe der Gentechnik können die PHA-Synthesegene in Nutzpflanzen eingebaut werden. Der PHA-Gehalt in den genmodifizierten Pflanzen beträgt bis zu 10 % Trockengehalt der Pflanze. Allerdings

müssen die PHA-Ausbeuten verdoppelt und die Monomerzusammensetzung weiter optimiert werden, um nach dieser Technik eine rentable und wettbewerbsfähige PHA-Gewinnung zu gewährleisten.

In-vitro-PHA-Synthese kann auch in zellfreien Systemen enzymatisch durchgeführt werden. Der Einsatz dieser Methode benötigt keine Entfernung von Nebenprodukten, da dadurch nur reine Polymere entstehen. Wegen hoher Kosten der eingesetzten Enzyme und Substrate wird diese Methode nur für Forschungszwecke verwendet.

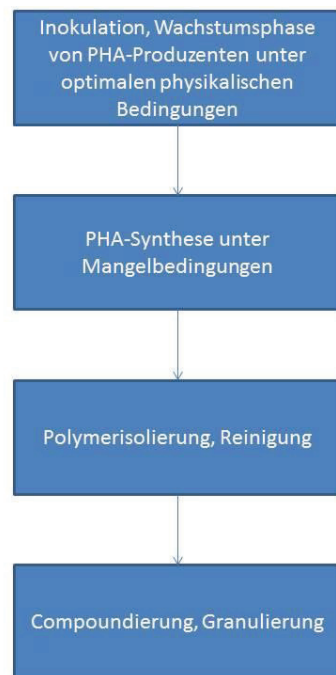
Bakterielle Fermentation von PHA ist zurzeit die einzige für die Industrie relevante Methode. Inokulation ist der erste Fermentationsschritt. Dabei befinden sich Mikroorganismen, welche für die Polymerherstellung in der weiteren Prozessstufe verwendet werden, in der Wachstumsphase bei optimalen physikalischen Bedingungen. Die eigentliche PHA-Synthese findet unter Mangelbedingungen, z. B. Phosphorlimitierung, bei gleichzeitigem Überangebot an Kohlenstoff statt. In dieser Phase hören Bakterien auf zu wachsen und sich zu vermehren. PHA wird intrazellulär gespeichert und kann bis zu 90 % Trockenzellgewicht enthalten (Abb 9). Die Molmasse des erzeugten Polymers variiert zwischen 100.000 und 500.000 g/mol, wobei unter speziellen Bedingungen Polymere mit Molmassen bis zu 1.000.000 g/mol gewonnen werden können.



**Abbildung 9: TEM Aufnahme einer *Halomonas halophila* Probe, die PHB beinhaltet.**

Der Gesamtfermentationsprozess dauert normalerweise ca. zwei Tage. Als Kohlenhydratquelle können nicht nur Zuckersubstrate dienen, sondern auch Alkohole (z.B. Methanol, Glycerin etc.), Alkane (Hexan oder Dodecan), pflanzliche Öle und organische Säuren. In den Fermentationsprozess involvierte Enzyme wirken völlig unspezifisch, daher kann die Länge von Polymerketten bzw. die Bildung von Copolymeren durch die Zugabe von verschiedenen Substraten reguliert werden. Es gibt oft keine räumliche Trennung zwischen den Prozessschritten während des Wachstums von Mikroorganismen und der PHB-Generation. Die Umstellung der Fermentationsbedingungen erfolgt in einem einzigen Fermenter. Die Fermentation wird üblicherweise in Batch- oder in Fed-Batch-Verfahren durchgeführt. Danach werden die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration vom Kulturmedium getrennt und zerkleinert, und das Rohpolymer wird isoliert. Die PHA-Extraktion kann mit Chloroform, Methylenchlorid, Dichlorethan und Propylencarbonat, aber auch lösungsmittelfrei durchgeführt werden. Alle erwähnten Lösungsmittel haben eine negative Auswirkung auf die Ökobilanz des PHA-Herstellungsverfahrens. Aus diesem Grund werden alternative Lösungsmittel gesucht, welche den besten Kompromiss zwischen der Effizienz, dem ökologischen Faktor und der Polymererhaltung darstellen. Lösungsmittelfreie Verfahren basieren auf enzymatischem Zellaufschluss, meistens in Kombination mit thermischer Behandlung durch Wasserdampf und zusätzlicher Verwendung von verschiedenen Detergenzien sowie anschließender Mikrofiltration und

Zentrifugation. Das Polymer kann auch durch Behandlung von Zellen mit überkritischem Kohlendioxid gewonnen werden. Im letzten Schritt findet eine Compoundierung und Granulierung des PHA-Pulvers statt (Abb. 10).



**Abbildung 10: Vier Prozessstufen der PHA-Gewinnung.**

Mehr als 300 verschiedene Mikroorganismen sind als PHA-Produzenten bekannt. Für industrielle Anwendungen ist ein Großteil dieser Mikroorganismen aufgrund der niedrigeren Produktionsraten von PHA, der aufwändigen Produktextrahierung, der nicht ausreichenden Molmasse der erzeugten Polymere sowie des Spektrums der für die Fermentation einsetzbaren Kohlenstoffquellen nicht geeignet (Endres und Siebert-Raths 2011; Mendez-Vilas 2010).

Einige halophile Mikroorganismen sind imstande große PHB-Mengen zu produzieren (Maskow 2008; Lafferty und Braunegg 1984). Diese Mikroorganismen tolerieren hohe Natriumchlorid-Konzentrationen. Ihre Umstellung auf Salze, welche in Prozesslaugen aus der Zellstoffindustrie vorhanden sind, würde einen effektiven Weg zur PHB-Herstellung aus den in diesen Abläugen enthaltenen Zuckern öffnen. Fermentationen in einer salzreichen Umgebung verringern das Kontaminationsrisiko und ersparen die zusätzlichen Chemikaliengaben zu Prozessabläugen. Die Vorversuche zur Umstellung vom halophilen Stamm *Halomonas halophila* auf Magnesiumsalze waren bis jetzt aber erfolglos. Dieser Stamm wurde für diese Arbeit verwendet, da er bei der Zugabe von bis zu 6,6 % Trockengehalt der Sulfitablauge in der Lage war PHB zu produzieren (Weissgram et al. 2015a). Außerdem ist *Halomonas halophila* nicht patentiert.

### **1.5. Potentiell inhibierende Substanzen in den Sulfitabläugen**

Es ist bekannt, dass manche Substanzen aus der Sulfitablauge die Fermentationsprozesse inhibieren können (Xavier et al. 2010; Klinke et al. 2001). Die potentiellen Inhibitoren unterteilen sich in organische Säuren, Phenole, Furanderivate, Holzextraktstoffe und metallische Kationen (Abb. 11). Zu den Furanderivaten gehören Furfural und Hydroxymethylfurfural, welche durch die Zersetzung von Pentosen und Hexosen entstehen. Bei einem weiteren Abbau entstehen Ameisensäure und

Lävulinsäure. Diese zählen gemeinsam mit der Essigsäure zu den organischen Säuren. Essigsäure stammt aus dem Acetylxytan. Phenole kommen entweder schon als Extraktstoffe im Holz vor oder werden beim Abbau von Lignin gebildet. Metallische Kationen stammen aus Alkali- und Erdalkalihydroxiden, welche als Aufschlussreagenzien im Sulfitverfahren eingesetzt werden (Marques et al. 2009; Jonsson und Martin 2016; Klinke et al. 2004; Clark und Mackie 1984; Larsson et al. 1999b).

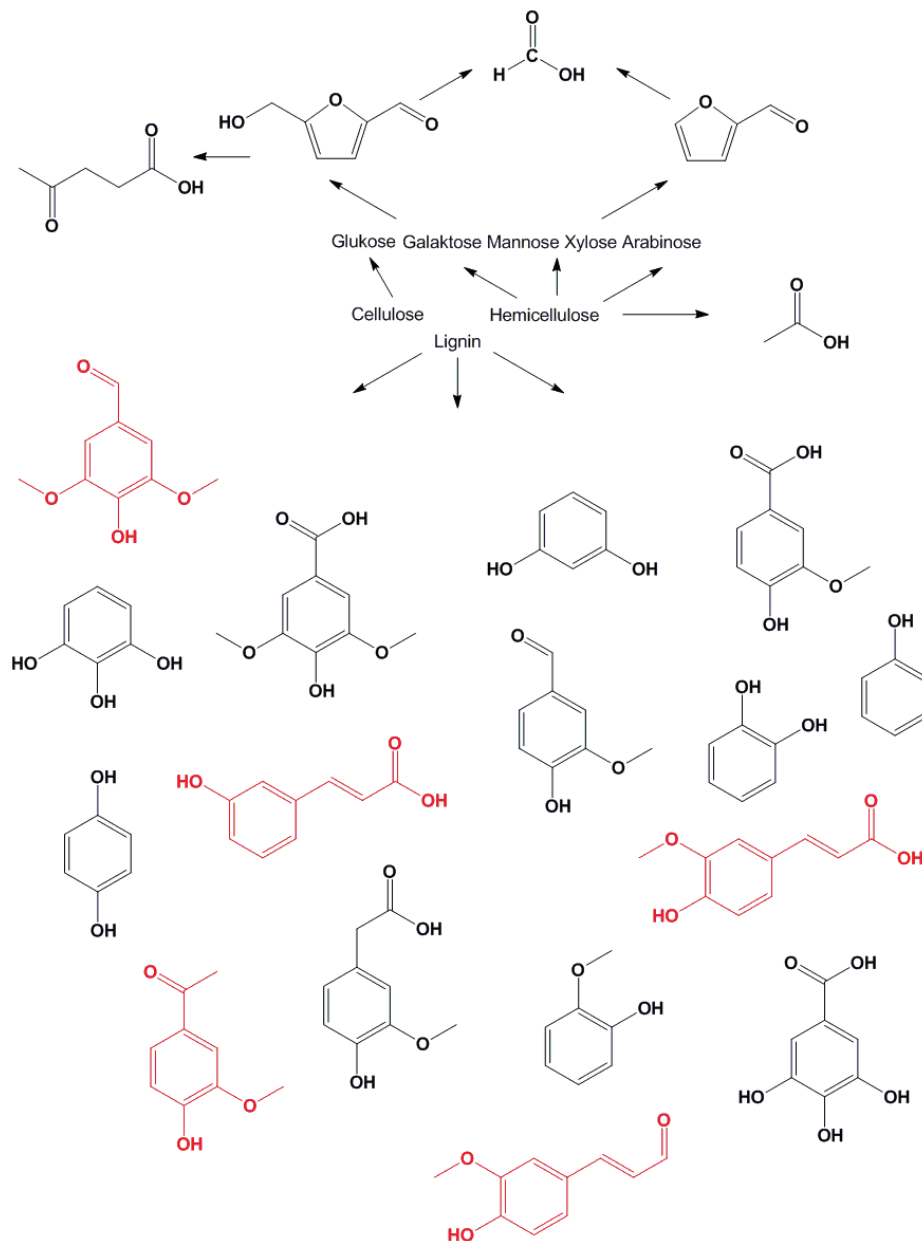


Abbildung 11: Bildung von potentiell inhibierenden Substanzen in der Sulfitablaue (Substanzen mit besonders toxischer Wirkung sind rot markiert (Kapitel 2.1. Teil I)).

Die Auswirkungen dieser Stoffe auf Mikroorganismen differieren allerdings je nach Literaturstelle. Beispielsweise identifizierten Palmqvist et al. und Adeboye et al. die löslichen Ligninkomponenten als Hauptinhibitoren bei Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum*. Qureshi et al. wiederum zeigten, dass Furfural und Hydroxymethylfurfural (HMF) in Konzentrationen von 0,50 g/l bzw. 1,00 g/l die ABE-Produktion durch *Clostridium beijerinckii* nahezu um das Dreifache erhöhen. Pampulha et al. berichteten, dass die hemmende Wirkung von organischen Säuren pH-abhängig ist, da diese in



undissoziierter Form schädlich auf die Zellen wirken. Es gibt darüber hinaus auch Arbeiten, in denen eine Synergie zwischen einzelnen Hemmstoffen beschrieben ist (Palmqvist et al. 1999; Ferrari et al. 1992; Adeboye et al. 2014; Canilha et al. 2012; Pampulha und Loureiro-Dias 1989; Klinke et al. 2004; Clark und Mackie 1984; Ezeji et al. 2007; Heipieper et al. 1994; Stratford et al. 2009; Mills et al. 2009; Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000a; Stratford et al. 2013; Qureshi et al. 2012).

Die Frage, warum viele dieser Substanzen so schädlich auf die Zellen wirken, während die anderen absolut harmlos sind und manche sogar das Zellwachstum positiv beeinflussen, konnte bis jetzt noch nicht beantwortet werden. Es gibt mehrere Hypothesen, die einander oft widersprechen. Meistens wurden die zerstörenden Mechanismen von Inhibitoren beschrieben. Es gibt aber keine Erklärung, warum manche Verbindungen das Wachstum von Mikroorganismen fördern können (Adeboye et al. 2014; Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000b; Park et al. 2001; Heipieper et al. 1992).

Im Laufe der Evolution spielte Wasser eine wichtige Rolle für die Zellen. Mit Wasser mischbare niedere Alkohole und organische Säuren sind Fermentationsprodukte vieler Mikroorganismen. Zellen entwickelten im Evolutionsprozess Schutzmechanismen und können relativ hohe Konzentrationen dieser natürlichen Produkte tolerieren (Ingram und Buttke 1985). Ganz anders sieht die Situation bei Phenolen aus. Diese Verbindungen treten selten in hohen Konzentrationen unter natürlichen Bedingungen auf. Wahrscheinlich ist das der Grund, warum schon kleine Mengen dieser Substanzen sehr schädlich auf die Zellen wirken. Die Arbeitsgruppe von Heipieper untersuchte die Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Klassen von organischen Verbindungen und ihrer Wirkung auf Mikroorganismen. Es wurde festgestellt, dass Substanzen mit log P Werten von 1 bis 5 sehr toxisch für die Zellen sind, während Verbindungen mit log P Werten unter 1 und über 5 meistens harmlos sind (log P gibt das Verhältnis der Konzentrationen einer Chemikalie in einem Zweiphasensystem aus 1-Octanol und Wasser an). Zu der ersten Klasse gehören Phenole, zu der zweiten Alkohole und organische Säuren (Heipieper et al. 1994; Sangster 1997).

Verschiedene Arbeitsgruppen vertreten unterschiedliche Meinungen, wie die Mechanismen der Wechselwirkung von Phenolen mit Zellen ablaufen. Viele Autoren behaupten, dass die Inhibierung des Zellwachstums keinen metabolischen oder chemischen Ursprung hat. Eine Erklärung dafür ist das Lösen der Phenole in der Zellmembran, sodass aromatische hydrophobe Domänen von Phenolen sich zwischen hydrophoben Enden der Fettsäuren einlagern, und die hydrophilen Hydroxyl-, Carboxyl- und Carbonyl-Gruppen sich zu hydrophoben Teilen der Phospholipide ausrichten. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Phenole Zellmembranen zerstören, was die Hemmung des Zellwachstums oder den Tod von Zellen verursacht, da die intrazellulären Bestandteile freigesetzt werden (AL-Adham et al. 1998; Hugo 1967; Kitagawa et al. 1990; Guan et al. 2011; Giordano et al. 2007).

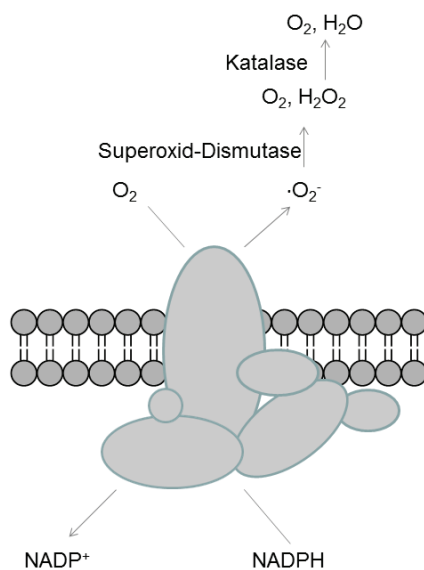
Hugo et al. beschreiben, wie durch Zugabe von Chlorhexidin der Auslauf des intrazellulären Materials bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* ausgelöst wird. Sie vermuten, dass Chlorhexidin mit Proteinanteilen der Membran wechselwirkt. Dadurch ändert sich die Membrandurchlässigkeit, was zum Verlust von intrazellulärem Kalium und Phosphaten und zur Änderung der Funktion bestimmter membranassoziierter Enzyme und Transportsysteme führt (Hugo und Longworth 1965).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass bestimmte aromatische Substanzen die energieabhängigen Stoffwechselmechanismen hemmen. 2,4-Dinitrophenol und Tetrachlorsalicylanilid (TCS) hindern die energieabhängige Phosphat- und Aminosäure-Aufnahme und die Assimilation von Aminosäuren und

Glukose in das Zellmaterial bei *Staphylococcus aureus*. Die energieunabhängige Aufnahme von Phosphat und Aminosäuren bleibt dagegen unverändert (Hotchkiss 1944; Hamilton 1968; Pinchot 1967).

Viele membranaktive antibakterielle Wirkstoffe führen zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien. Offenbar beeinflussen Phenole entweder die oxidative Ebene oder Substratebene der Phosphorylierung. Eine weitere Vermutung ist die Hemmung der Energienutzung bei Stoffwechselreaktionen durch Phenole (Lardy und Elvehjem 1945; Rigoulet et al. 1996; Mitsuda et al. 2014; Rottenberg 1990; Wynn und Fore 1965, Reuben 1984, 1984).

Petronio beschäftigte sich mit der Hemmung von NADPH-Oxidase durch Apocynin. NADPH-Oxidase katalysiert die Reaktion, bei der NADPH zur  $\text{NADP}^+$  in der Zelle oxidiert wird, wobei die Elektronen auf die Außenseite der Membran übertragen werden, wo Hyperoxide gebildet werden. Diese sind für die Zellen schädlich und werden durch das Enzym Superoxid-Dismutase in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid überführt. Das Wasserstoffperoxid reagiert weiter mit Hilfe von Katalase zu Sauerstoff und Wasser (Abb. 12). Apocynin ist ein relativ schwacher Radikalfänger, dafür hat es eine hohe Kapazität als Abfangmittel für das entstehende Wasserstoffperoxid. Die Apocynin-Moleküle reagieren mit Wasserstoffperoxid unter Bildung von Apocynindimeren, diese Reaktion wird durch zelluläre Peroxidasen (Myeloperoxidase) katalysiert. Die gebildeten Dimerisierungsprodukte von Apocynin hemmen die NADPH-Oxidase (Petronio et al. 2013).



**Abbildung 12: Funktion der NADPH-Oxidase: NADPH wird zur  $\text{NADP}^+$  oxidiert, die Elektronen werden auf die Außenseite der Membran übertragen, dort werden Hyperoxide gebildet, welche durch das Enzym Superoxid-Dismutase in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid überführt werden. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit Hilfe von Katalase zu Sauerstoff und Wasser.**

In dieser Arbeit wird versucht die Mechanismen der Inhibierung von Phenolen aufzuklären, in dem die Strukturänderungen von potentiellen Inhibitoren während des Wachstums von Mikroorganismen mittels <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie verfolgt werden. Auf diese Weise werden Substanzen untersucht, welche eine stark hemmende Wirkung aufweisen, sowie Substanzen, die für die Zellen harmlos sind bzw. positiv auf das mikrobielle Wachstum wirken.

## 1.6. Entgiftungstechniken der Sulfitablauge

Um in einem hemmenden Hydrolysat zu fermentieren, gibt es mehrere Möglichkeiten. Bei einem Fed-Batch Prozess werden die Inhibitoren nur in kleinen Mengen zugesetzt, dabei werden die hemmenden Konzentrationen nicht erreicht. Es können auch solche Mikroorganismen ausgewählt werden, die sehr resistent gegenüber den Hemmstoffen sind. In manchen Fällen erfolgt eine Adaption an die Hemmstoffe. Durch den Einsatz von Gentechnik können die Toleranzeigenschaften des Stammes verbessert werden. In vielen Fällen erfolgt durch eine Vorbehandlung die Abtrennung der Hemmstoffe (Mussatto und Roberto 2004; Olsson und Hahn-Hägerdal 1996).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, für Ethanol-, Butanol- und PHB-Produktion relevante Mikroorganismen einem umfassenden Inhibitorscreening mit Furanderivaten, organischen Säuren, Alkoholen und verschiedenen Phenolderivaten zu unterziehen, um die Verbindungen zu identifizieren, welche die Mikroorganismen tatsächlich hemmen. Danach wird eine aus dem Sulfitverfahren stammende Ablauge durch verschiedene Vorbehandlungstechniken entgiftet, um ganz gezielt diese Komponenten zu entfernen, wodurch die Fermentation wesentlich verbessert werden kann.

Die Entgiftungsmethoden für Hydrolysate von lignozellulosehaltigen Materialien sind vielfältig. Je nach Ausgangsmaterial und Art der Hydrolyse werden biologische, chemische, physikalische bzw. auch kombinierte Verfahren angewandt (Mussatto und Roberto 2004; Alvira et al. 2010; Klinke et al. 2004).

### 1.6.1. Biologische Verfahren

Eine wichtige Herausforderung bei der Fermentation von lignozellulosehaltigen Ablaugen ist die Entfernung von phenolischen Substanzen, die für Wachstum von Mikroorganismen besonders hemmend wirken. Biologische Entgiftungstechniken sind dafür am besten geeignet. Die Hydrolysate können mit spezifischen Enzymen oder ganzen Zellen behandelt werden.

Die enzymatischen Entgiftungen gehören zu den effektivsten Methoden für die Entfernung von Phenolen aus Lignozellulose-Aufschlüssen. Meistens werden dafür unterschiedliche Laccasen und Peroxidasen eingesetzt (Tab 4). Die Arbeitsgruppen von Chandel und Martin beschäftigten sich mit der Ethanolherstellung aus Zuckerrohrbagasse. Chandel et al. setzten für die Fermentation den Stamm *Candida shehatae* NCIM 3501 ein. Um inhibierende Phenole zu reduzieren, wurde Laccase aus *Cyathusc stercoreus* verwendet. Die Menge von Phenolen wurde dadurch um 77,7 % herabgesetzt (Chandel et al. 2007). Martin et al. gewannen Ethanol mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Die störenden Phenole wurden mittels Phenoloxidase Laccase aus *Coriolus (Trametes) versicolor* um 80 % reduziert (Martin et al. 2002). In der Arbeit von Jönsson wurde Wirkung der Enzyme Laccase und Lignin Peroxidase aus *Trametes (Coriolus, Polyporus) Versicolor* auf Hydrolysate der Salweide bei der Ethanolfermentation mittels *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Es wurden Tests mit Laccase, Lignin Peroxidase und einer Kombination aus Laccase und Lignin Peroxidase durchgeführt. Die Versuche mit Laccase zeigen die besten Ergebnisse (Jönsson et al. 1998). Moreno et al. beschäftigten sich mit Entgiftung von Weizenstroh-Maische durch Behandlung mit Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* und Laccase aus *Thapsia villosa* für die Ethanolfermentation mittels *Kluyveromyces marxianus*. Sie entfernten bis zu 94 % der Phenole (Moreno et al. 2012). Larsson et al. verwendeten das Fichte-Hydrolysat als Substrat für die Ethanolfermentation mit *Saccharomyces cerevisiae*. Zur Verbesserung der Fermentation entfernten sie die phenolischen Verbindungen durch enzymatische Entgiftung mit Phenoloxidase Laccase aus *Trametes Versicolor* (Larsson et al. 1999). Cho. et al.

verwendeten als Modellsubstanzen sechs phenolische Verbindungen, welche die Butanolproduktion inhibierten. Durch die Verwendung von Peroxidase aus *Coprinus cinereus* wurde eine vollständige Entfernung dieser Phenole erreicht, was die Butanolausbeuten wesentlich erhöhte (Cho et al. 2009).

**Tabelle 4: Überblick über die enzymatische Entgiftung von Flüssigströmen aus dem Lignozelluloseaufschluß.**

Hydrolysat	Enzym	Effekt	Referenz
Zuckerrohrbagasse	Laccase aus <i>Cyathusc stercoreus</i>	selektive Entfernung von phenolischen Verbindungen (77,5 %); geringer Verlust an Zucker; höhere Ethanolausbeuten	(Chandel et al. 2007)
Zuckerrohrbagasse	Phenoloxidase Laccase aus <i>Coriolus (Trametes) versicolor</i>	Reduktion von Phenolen (80 %); Verbesserung der Ethanolfermentation	(Martin et al. 2002)
Salweide	Laccase und Lignin Peroxidase aus <i>Trametes (Coriolus, Polyporus) Versicolor</i>	selektive, vollständige Entfernung von phenolischen Monomeren; Verbesserung der Ethanolfermentation	(Jönsson et al. 1998)
Weizenstroh-Maische	Laccase aus <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> und Laccase aus <i>Thapsia villosa</i>	Reduktion von Phenolen (94 %); Verbesserung der Ethanolfermentation	(Moreno et al. 2012)
Fichte	Phenoloxidase Laccase aus <i>Trametes Versicolor</i>	Spezifische Entfernung von phenolischen Verbindungen; höhere Ethanolausbeuten	(Larsson et al. 1999)
6 Phenole als Modellkomponenten: p-Cumarsäure, Ferulasäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Syringaldehyd und Vanillin	Peroxidase aus <i>Coprinus cinereus</i>	Reduktion von Phenolen (100 %), Verbesserung der Butanolproduktion	(Cho et al. 2009)

Manche Mikroorganismen sind in der Lage Lignin sowie Furfural, HMF und Essigsäure in der Lignozellulose abzubauen. In der Natur, unabhängig von aeroben oder anaeroben Bedingungen, nehmen mehrere Kulturen von Mikroorganismen am Ligninabbauprozess teil, aus diesem Grund werden für die mikrobiellen Entgiftungen meistens Mischkulturen verwendet. Nach dieser Technik vorbehandelte Lignozellulosesubstrate können in weiteren Prozessstufen einfacher in fermentierbare Zucker hydrolysiert werden, was eine geringere Zugabe von Säuren und niedrigere Temperaturen erfordert, außerdem wird die Hydrolysezeit dadurch verkürzt. Die Verwendung von Mikroorganismen hat den Nachteil, dass diese auch den für die weiteren Fermentationen nötigen Zucker verstoffwechseln (Lopez et al. 2004; Ravindran und Jaiswal 2016; Bernardes 2011).

Die Anwendung von verschiedenen Pilzen zur Entgiftung von lignozellulosehaltigen Substraten bekam in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit einiger Forscher. Es wurden viele Pilze untersucht,

welche in der Natur Holzfäule verursachen. Viele diese Pilze können Lignin abbauen (Ravindran und Jaiswal 2016; Bernardes 2011). Der filamentöse Pilz *Trichoderma reesei* wurde direkt zur Entgiftung von Hemicellulosenhydrolysaten eingesetzt und bewirkte eine 30 %-ige Reduktion der bei 280 nm absorbierenden Komponenten, dazu gehören Essigsäure, Furfural und Benzoesäurederivate (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000b; Larsson et al. 1999a; Palmqvist et al. 1997). Pereira et al. entgifteten Sulfitablauge aus Eukalyptus mit dem thermophilen Schimmelpilz *Paecilomyces variotii*. Der Einsatz dieses Pilzes führte zur Entfernung solcher Substanzen wie Essigsäure, Gallussäure und Pyrogallol. Auch bei der Verwendung von Pilzen wurde eine starke Abnahme von Zuckern in der Abblauge beobachtet (Pereira et al. 2012).

### 1.6.2. Physikalische Verfahren

Zu den physikalischen Entgiftungstechniken gehören Vakuumeindampfung und Membrantrennverfahren.

Vakuumeindampfung dient zur Entfernung von flüchtigen Störkomponenten wie z.B. Vanillin, Essigsäure, Furanderivaten etc. Schwerflüchtige toxische Ligninderivate und Extraktstoffe bleiben in der Lösung und müssen durch Verwendung zusätzlicher Trennstufen beseitigt werden (Larsson et al. 1999a; Vertes et al. 2010; Rodrigues et al. 2001).

Ein sehr effizientes Verfahren zur Entfernung von organischen Säuren, Furanderivaten und Phenolen aus lignozellulosischen Hydrolysaten stellt das Membrantrennverfahren dar. Das Prinzip der Membranextraktion ist in der Abb. 13 dargestellt. Das lignozellulosische Hydrolysat wird durch Hohlfasermodule aus einem Bündel hydrophober Membranen aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) bzw. Polypropylen gepumpt. Als Lösungsmittel können n-Heptan, Trioctyl/Decylamin in Octanol, Oleylalkohol sowie ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden (Grzenia et al. 2010; Grzenia et al. 2012; Bernardes 2011; Abels et al. 2013; Grzenia et al. 2008).

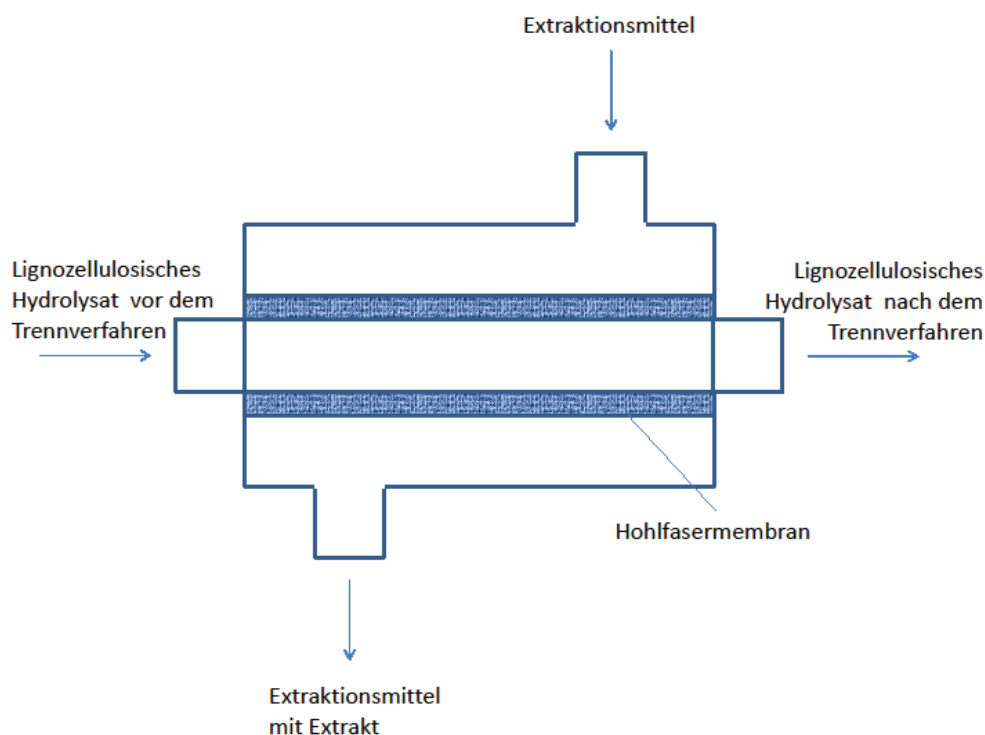


Abbildung 13: Prinzip des Membrantrennverfahrens zur Auftrennung eines lignozellulosischen Hydrolysats.

### 1.6.3. Chemische Verfahren

Chemische Entgiftungen von lignozellulosehaltigen Ablaugen umfassen sehr viele Methoden (Tab 5). Eine kostengünstige und effektive Methode ist die Festphasenextraktion von Ablaugen mit Lignin, von welchem große Mengen als Nebenprodukt während der Herstellung von Zellstoff entstehen. Seine hydrophoben Eigenschaften machen die Abtrennung von aromatischen Anteilen und Furanderivaten möglich (Björklund et al. 2002; Nilvebrant et al. 2001). Die Entgiftung durch Behandlung mit Aktivkohle basiert auf ihrem Absorptionsvermögen (Helle et al. 2008; Converti et al. 2000; Rodrigues et al. 2001; Alves et al. 1998; Stoutenburg et al. 2011). Parajo et al. verringerten damit die Konzentrationen von Phenolen und Essigsäure in Säurehydrolysaten (Parajo et al. 1997). Auch Ionenaustauscherharze wurden untersucht, wobei gezeigt wurde, dass Anionenaustauscher effektiver sind als Kationenaustauscher, d.h. dass höhere Mengen von ionischen und ungeladenen potentiellen Inhibitoren entfernt werden können. Der Einsatz eines Anionenaustauschers verursacht einen unerwünschten Zuckerverlust von bis zu 75 %, dieser kann durch Zugabe von Natriumsulfat auf 1 % reduziert werden. Kationenaustauscher haben dagegen keinen Einfluss auf die Zuckerkonzentration. (Nilvebrant et al. 2001; Larsson et al. 1999a; Zhuang et al. 2009; Fernandes et al. 2012; Stoutenburg et al. 2011; Wickramasinghe und Grzenia 2008). Eine Alkalibehandlung mit Metallhydroxiden ist ebenfalls eine wichtige Entgiftungsmethode, welche den Gehalt an Furanderivaten und Phenolen in Ablaugen stark reduziert; die genauen Mechanismen dieser Behandlung sind noch nicht ganz aufgeklärt. Der Nachteil der Entgiftung mit Calciumhydroxid ist der Verlust von in Ablaugen enthaltenen Zuckern (bis zu 7,6 %) (Ranatunga et al. 2000; Larsson et al. 1999a; Helle et al. 2008; Martinez et al. 2001; Martinez et al. 2000; Cantarella et al. 2004; Millati et al. 2002; Bernardes 2011; Chandel et al. 2007; Bernardes 2011; Converti et al. 2000; Stoutenburg et al. 2011).

**Tabelle 5: Überblick über die chemischen Entgiftungstechniken von Flüssigströmen aus dem Lignozelluloseaufschluss.**

Hydrolysat	Entgiftungstechnik	Effekt	Referenz
Säurehydrolysat von Fichte	Lignin	Entfernung von phenolischen Verbindungen (53 %) und Furanderivaten (68 %)	(Björklund et al. 2002)
Säurehydrolysat von Eukalyptus, Sulfitablauge	Aktivkohle	Reduktion von Phenolen und Essigsäure	(Helle et al. 2008)
Säurehydrolysat von Fichte	Ionenaustauscherharze	Entfernung von Phenolen, organischen Säuren und Furanderivaten	(Nilvebrant et al. 2001; Larsson et al. 1999)
verdünnte lignocellulose Säurehydrolysate	Alkalibehandlung	Reduktion von Phenolen und Furanderivaten	(Larsson et al. 1999; Ranatunga et al. 2000)

#### 1.6.4. Vergleich verschiedener Entgiftungstechniken

Biologische Entgiftungsverfahren erfordern im Gegensatz zu physikalischen und chemischen Verfahren keine hohen Temperaturen, Drücke oder Zugabe von unterschiedlichen Chemikalien und sind deshalb sehr umweltfreundliche Prozesse. Nachteilig sind die mäßige Kontrolle über den Reaktionsablauf und die langen Reaktionszeiten sowie ein mikrobieller Zuckerabbau. Physikalische Entgiftungstechniken gehören zu einfachen und schnellen technisch durchführbaren Verfahren. Die Eindampfung hat den Nachteil, dass nur die leichtflüchtigen Verbindungen entfernt werden. Diese Technik hat zudem einen hohen Energiebedarf. Alle chemischen Verfahren sind sehr einfach durchführbar. Bei der Verwendung von Lignin und Aktivkohle können diese nach der Entgiftung verbrannt werden, wodurch Prozessenergie gewonnen werden kann. Die chemischen Verfahren haben unterschiedliche Mechanismen, manche dieser Verfahren führen zu einem leichten unerwünschten Zuckerverlust (Tab. 6).

**Tabelle 6: Vergleich verschiedener Entgiftungstechniken.**

Entgiftung durch	Vorteile	Nachteile
Mikroorganismen/Pilze	niedriger Energiebedarf, kostengünstig	Zuckerabbau, Limitierung der Prozesskontrolle, langer Reaktionsablauf
Enzyme	niedriger Energiebedarf, sehr selektive Reaktionen, einfaches Verfahren	langer Reaktionsablauf
Eindampfung	schnelles, einfaches Verfahren	hoher Energiebedarf, hohe Kosten, schwerflüchtige Verbindungen bleiben in Prozesslauge
Membrantrennverfahren	einfaches Verfahren	teure Technik
Lignin	kostengünstiges, schnelles, einfaches Verfahren	
Aktivkohle	kostengünstiges, schnelles, einfaches Verfahren, kein Zuckerverlust	
Ionenaustauscherharze	schnelles, einfaches Verfahren	leichter Zuckerverlust
Alkalibehandlung	kostengünstiges, schnelles, einfaches Verfahren	leichter Zuckerverlust

## 2. Resultate

### 2.1. Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf das Wachstum von Mikroorganismen

In diesem Teil der Arbeit wurde die Wirkung von verschiedenen potentiell inhibierenden Substanzen aus der Sulfitablauge auf das Zellwachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*, *Halomonas halophila* und *Clostridium saccharoperbutylaceticum* untersucht. Diese Versuche wurden mit Furanderivaten, organischen Säuren, Alkoholen und Phenolen durchgeführt. Die Konzentrationen von Furanderivaten, organischen Säuren und Alkoholen entsprechen den Konzentrationen aus der Sulfitablauge, wobei für die Arbeit mit einzelnen Mikroorganismenstämmen die Ablaugen von unterschiedlichen Industriepartnern verwendet wurden. Aus diesem Grund gibt es minimale Konzentrationsunterschiede dieser Komponenten in unseren Versuchen. Die Stoffwechselprodukte im Fermentationsprozess von *Thermoanaerobacter mathranii* - Ethanol, Essigsäure und Milchsäure - wirken ab bestimmten Mengen hemmend auf die Bakterien. Es wurde getestet, welche Konzentrationen von diesen Substanzen für die Mikroorganismen letal sind. Für *Thermoanaerobacter mathranii* wurde die obere Konzentrationsgrenze von Furfural und für *Halomonas halophila* von Furfural und Hydroxymethylfurfural bestimmt. Die Sulfitablaugen enthalten Lignosulfonate, deren Wirkung ebenfalls auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii* getestet wurde.

Die Auswahl der phenolischen Testsubstanzen und deren Konzentrationen wurde der Literatur entnommen (Marques et al. 2009; Sixta 2006; Jonsson und Martin 2016; Rydholm 1965; Sjöström 1993; Björklund et al. 2002; Larsson et al. 1999c, Larsson et al. 1999a; Klinke et al. 2004; Clark und Mackie 1984). Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurden diese Phenole nach ihrer Funktionalität (Carbonyl-, Carboxyl-Funktionalität und ein- und mehrwertige Phenole) aufgeteilt. Die Wirkung von phenolischen Komponenten auf das Wachstum von Mikroorganismen wurde mit Hilfe einer einfachen Farbskala dargestellt: rot 0-33 % Wachstum, gelb 33-66 %, hellgrün 66-100 %, dunkelgrün >100 % (Tab. 7-12). Auch die Wirkung von Natrium Lignosulfonat auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii* wurde untersucht.

Um den Wachstumsverlauf der Mikroorganismen zu verfolgen, wurde die Änderung der Zelldichte einer Bakteriensuspension ermittelt. Zur Bestimmung der Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf das Bakterienwachstumsverhalten wurde  $\Delta OD$  (optische Dichte) der Positivkontrolle (Kultur im Medium mit Zuckerquelle) mit  $\Delta OD$  von Proben verglichen, bei denen Inhibitoren zugegeben wurden, wobei angenommen wurde, dass  $\Delta OD$  der Positivkontrolle einem Wachstum von 100 % entspricht.

#### 2.1.1. Inhibitorversuche mit Ethanolproduzenten

Untersuchungen der Wirkung der Furanderivate Furfural und Hydroxymethylfurfural auf die Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* zeigen, dass Furfural bis zu einer Konzentration von 0,94 mmol/l und Hydroxymethylfurfural bis zu einer Konzentration von 1,49 mmol/l nicht hemmend wirken und sogar einen fördernden Effekt auf das Zellwachstum haben; erst ab einer Konzentration von 4,68 mmol/l wirkt Furfural hemmend (Abb. 14). Das Screening von Alkoholen ergab, dass 4,68 mmol/l sowie 46,81 mmol/l Methanol eine positive Wirkung auf das Wachstum haben. Eine Konzentration von bis zu 17,15 mmol/l Ethanol ist nicht hemmend für die Mikroorganismen, 171,50 mmol/l Ethanol senken hingegen das Zellwachstum auf 19 % (Abb 15).



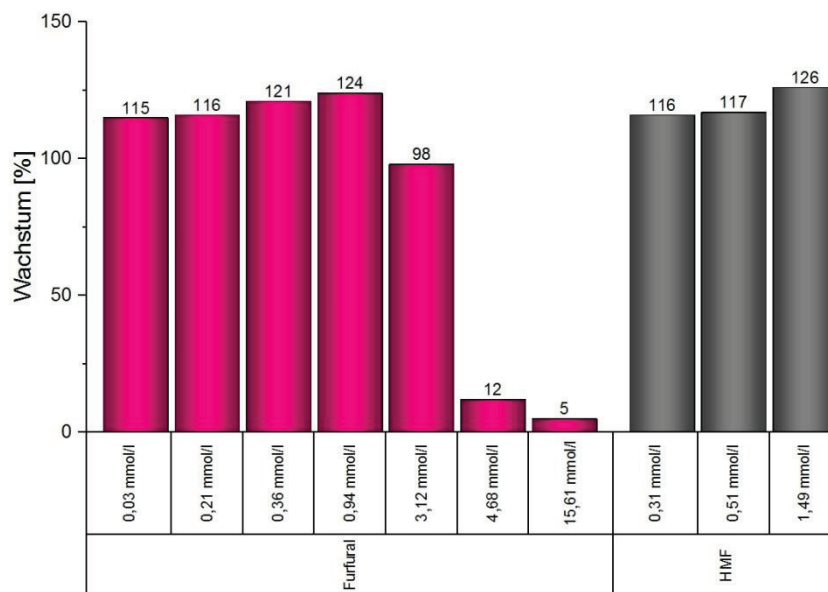


Abbildung 14: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.

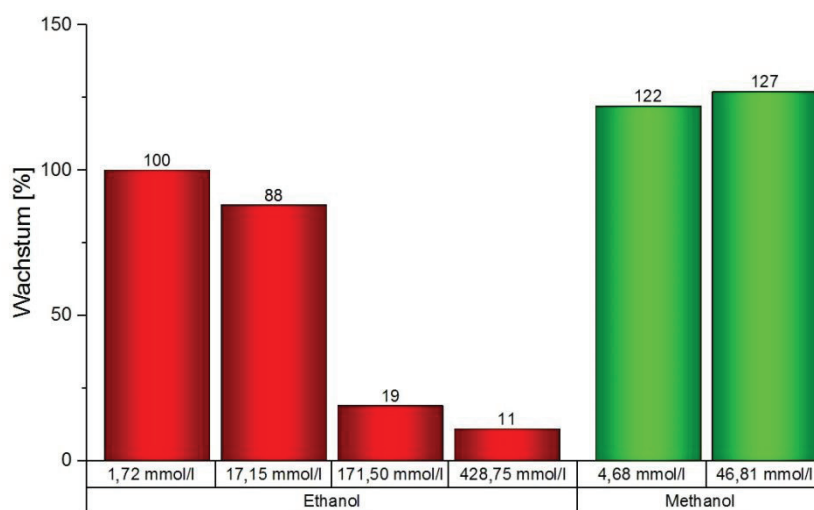


Abbildung 15: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.

Tests mit organischen Säuren zeigen, dass 0,24 mmol/l bis 2,84 mmol/l Buttersäure und 0,2 mmol/l bis 2,43 mmol/l Propionsäure nicht inhibierend auf die Zellen wirken und sogar einen leicht positiven Effekt auf das Wachstum von Mikroorganismen haben. Essigsäure wirkt bis zu einer Konzentration von 128,39 mmol/l nicht hemmend, ab 166,53 mmol/l wird das Zellwachstum um 39 % gehemmt. Bei einer Zugabe von 3,41 mmol/l Ameisensäure wird keine negative Wirkung beobachtet, ab 6,95 mmol/l sinkt die Zelldichte auf 77 % und ab 27,24 mmol/l auf 44 %. Lävulinsäure führt im Konzentrationsbereich von 6,95 mmol/l bis 10,77 mmol/l zu einer leichten Hemmung des Bakterienwachstums. 1,11 mmol/l Milchsäure stören das Wachstum nicht, 5,55 mmol/l wirken leicht schädlich, 1,1 mmol/l reduzieren das Wachstum auf 43 % (Abb. 16).

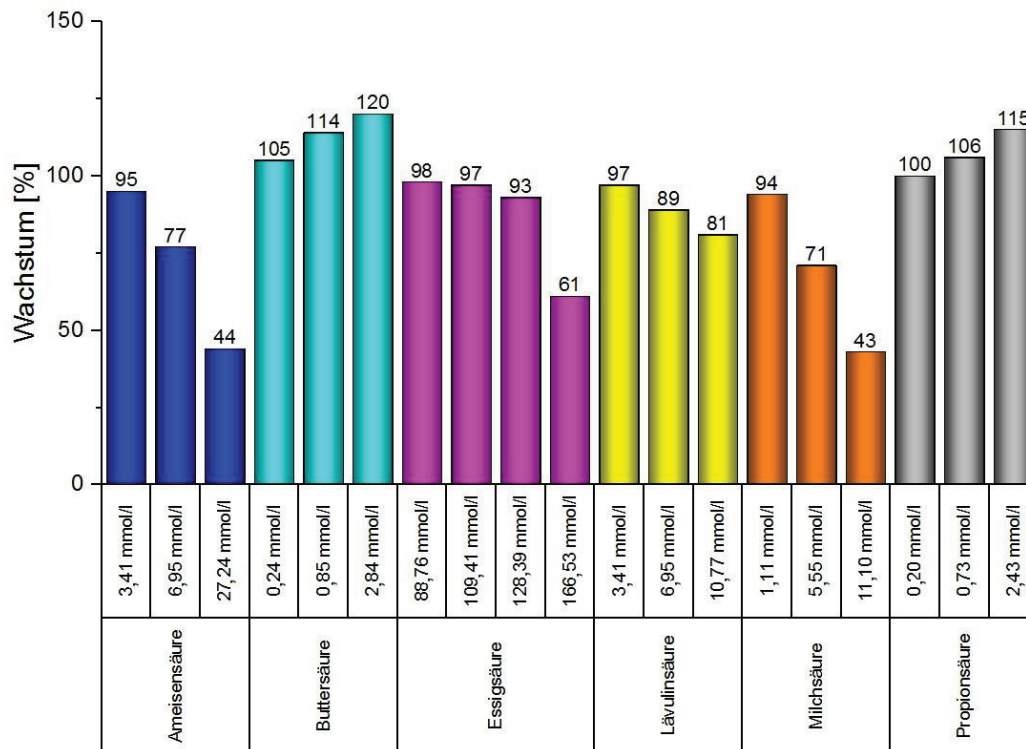


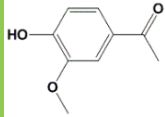
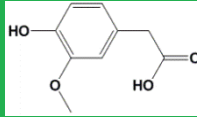
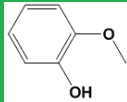
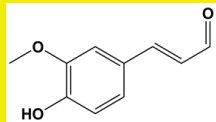
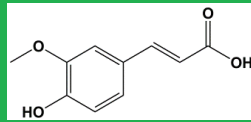
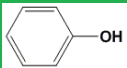
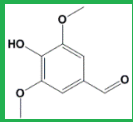
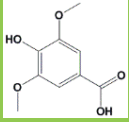
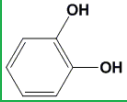
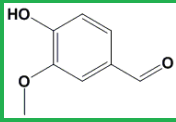
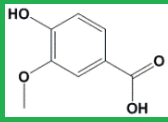
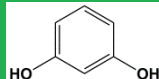
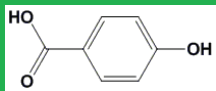
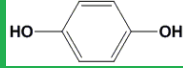
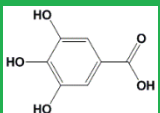
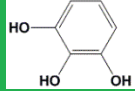
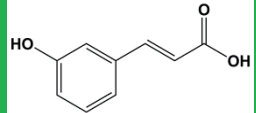
Abbildung 16: Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.

Ein- und mehrwertige Phenole sind für *Thermoanaerobacter mathranii* nicht schädlich, Resorcin, Hydrochinon und Pyrogallol weisen in Konzentrationen von 3 mmol/l bis 7 mmol/l sogar eine positive Wirkung auf. 3 mmol/l Guajacol, Phenol und Brenzcatechin fördern das Zellwachstum, 7 mmol/l dieser Substanzen verringern das Wachstum um 5 bis 10 %.

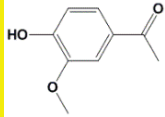
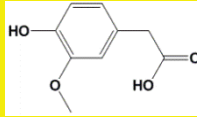
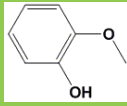
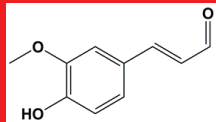
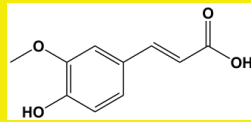
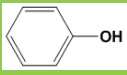
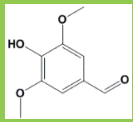
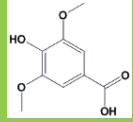
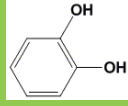
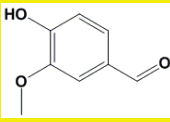
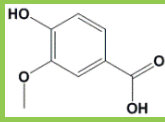
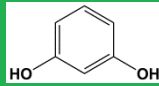
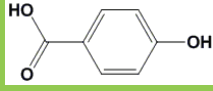
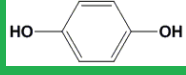
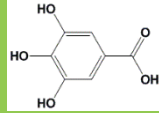
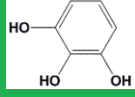
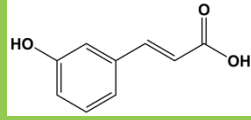
Außer Homovanillinsäure und Ferulasäure, welche in Konzentration von 7 mmol das Wachstum von Mikroorganismen auf 59 % bzw. 37 % senken, haben phenolische Verbindungen mit Carboxyl-Funktionalität keine starke negative Wirkung auf die Zellen. 7 mmol/l m-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure hemmen das Wachstum um 25-28 %, 7 mmol/l Gallussäure um 19 %, 7 mmol/l Vanillinsäure um 8 %. 3 mmol/l von allen diesen Substanzen (mit Ausnahme von Syringasäure, welche das Wachstum um 13 % hemmt) haben eine positive Wirkung auf Mikroorganismen und fördern ihr Wachstum um 10 bis 12 %.

Bei phenolischen Verbindungen mit Carbonyl-Funktionalität senkt Coniferylaldehyd schon bei einer Konzentration von 3 mmol/l die Zelldichte auf 63 %, bei einer Erhöhung der Konzentration auf 7 mmol/l beobachtet man nur noch 19 % des Wachstums. 7 mmol/l Vanillin vermindern die Zelldichte auf 65 %, 7 mmol/l Apocynin auf 49 %. 7 mmol/l Syringaldehyd verringern das Wachstum um 22 %, 3 mmol/l Apocynin um 8 %. 3 mmol/l Syringaldehyd und Vanillin fördern das Wachstum ca. um 10 %. (Tab 7 und 8).

**Tabelle 7: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.**

	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%]	91±0,09	112±0,001	110±0,02
Inhibitor	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%]	63±0,03	110±0,04	104±0,03
Inhibitor	Syringaldehyd	Syringasäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%]	111±0,01	87±0,09	103±0,05
Inhibitor	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%]	112±0,005	112±0,01	103±0,06
Inhibitor		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%]		110±0,01	122±0,01
Inhibitor		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%]		102±0,05	107±0,07
Inhibitor		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%]		112±0,02	
	0-33 %	67-100 %	101-145 %

**Tabelle 8: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.**

	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%]	49±0,04	59±0,06	93±0,07
Inhibitor	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%]	19±0,04	37±0,07	94±0,01
Inhibitor	Syringaldehyd	Syringasäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%]	78±0,04	75±0,02	90±0,06
Inhibitor	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%]	65±0,02	92±0,06	111±0,04
Inhibitor		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%]		72±0,04	147±0,03
Inhibitor		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%]		81±0,01	134±0,01
Inhibitor		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%]		73±0,02	
	0-33 %	34-66 %	67-100 %
			101-145 %

Die Sulfitablaugen erhalten 6,5-28 % Lignosulfonat, welches auch inhibierend auf die Mikroorganismen wirken kann, weswegen seine Wirkung auch auf die Mikroorganismen getestet wurde (Dence 1992). Die Versuche mit Natrium Lignosulfonat auf das Wachstumsverhalten von *Thermoanaerobacter mathranii* zeigen, dass 1 g/l bis 5 g/l Natrium Lignosulfonat positiv auf das Kulturwachstum wirken und das Wachstum um ca. 30 % fördern. 10 g/l Natrium Lignosulfonat

hemmen hingegen das Wachstum um 16 %. 25 g/l Natrium Lignosulfonat reduzieren die Zelldichte ca. um die Hälfte (Abb. 17).

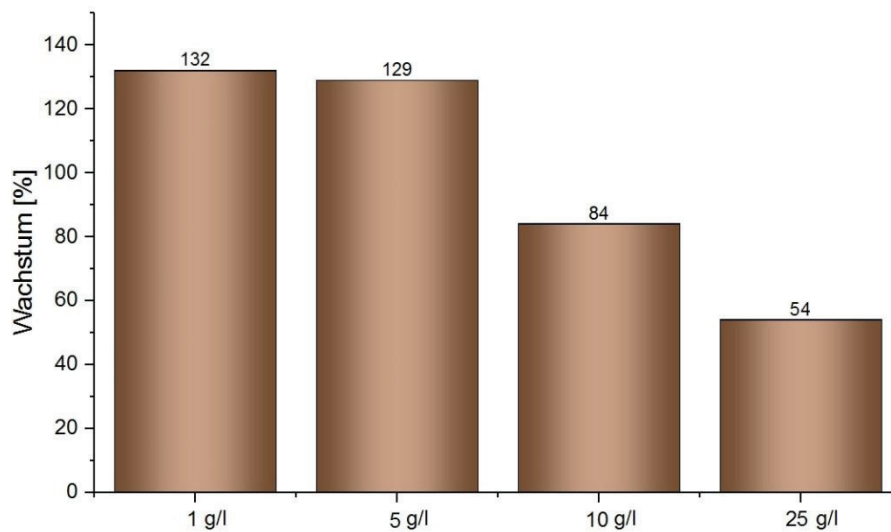


Abbildung 17: Einfluss von Natrium Lignosulfonat auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*.

### 2.1.2. Inhibitorversuche mit PHB-Produzenten

Untersuchungen der Wirkung von Furanderivaten auf die Fermentation von *Halomonas halophila* zeigen, dass Furfural bis zu einer Konzentration von 4,16 mmol/l nicht schädlich auf die Zellen wirkt. Ab 4,68 mmol/l senkt Furfural das Kulturwachstum auf 11 %. 0,31 mmol/l bis 12,69 mmol/l Hydroxymethylfurfural weisen keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Mikroorganismen auf (Abb. 18).

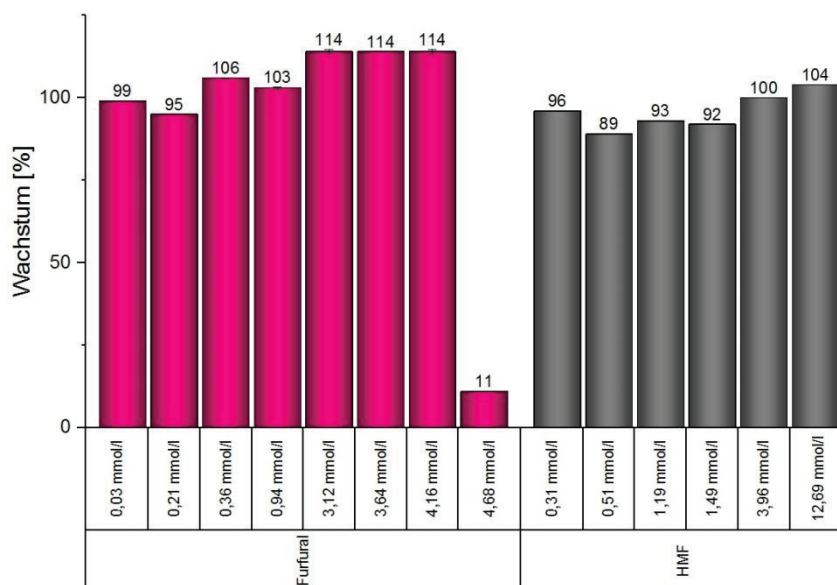


Abbildung 18: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von *Halomonas halophila*.

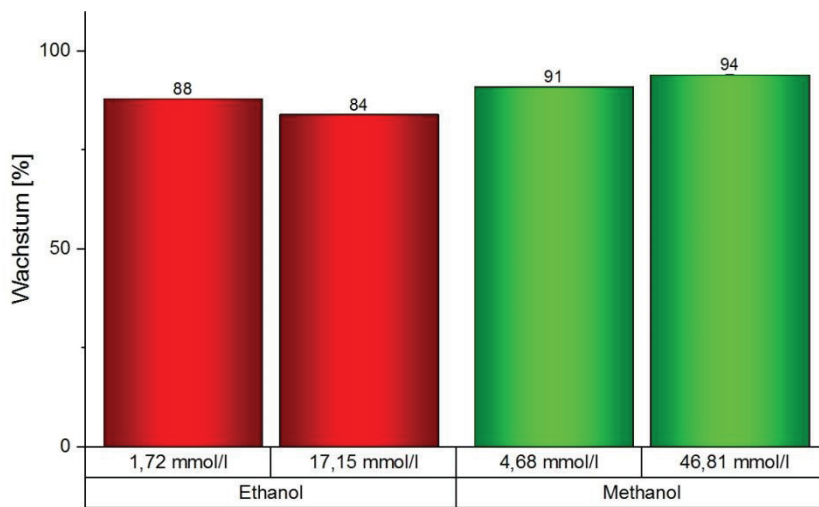


Abbildung 19: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von *Halomonas halophila*.

*Halomonas halophila* zeigten relativ hohe Resistenzen gegen organische Säuren (Abb. 20). 0,24 mmol/l bis 2,84 mmol/l Buttersäure, 0,2 mmol/l bis 2,43 mmol/l Propionsäure, 88,76 mmol/l bis 128,39 mmol/l Essigsäure und 3,45 mmol/l Lävulinsäure wirken sogar leicht fördernd auf das Wachstum von Mikroorganismen und verbessern das Wachstum um 1-17 %. 3,48 mmol/l bis 27,16 mmol/l Ameisensäure und 6,98 mmol/l bis 10,77 mmol/l Lävulinsäure verringern hingegen das Wachstum um 4-11 %.

Methanol in Konzentrationen von 4,68 mmol/l bis 46,81 mmol/l und Ethanol der Konzentration 1,72 mmol/l-17,15 mmol/l wirken leicht hemmend auf das Wachstum von Mikroorganismen. Sie senken das Zellwachstum um 6-16 % (Abb. 19).

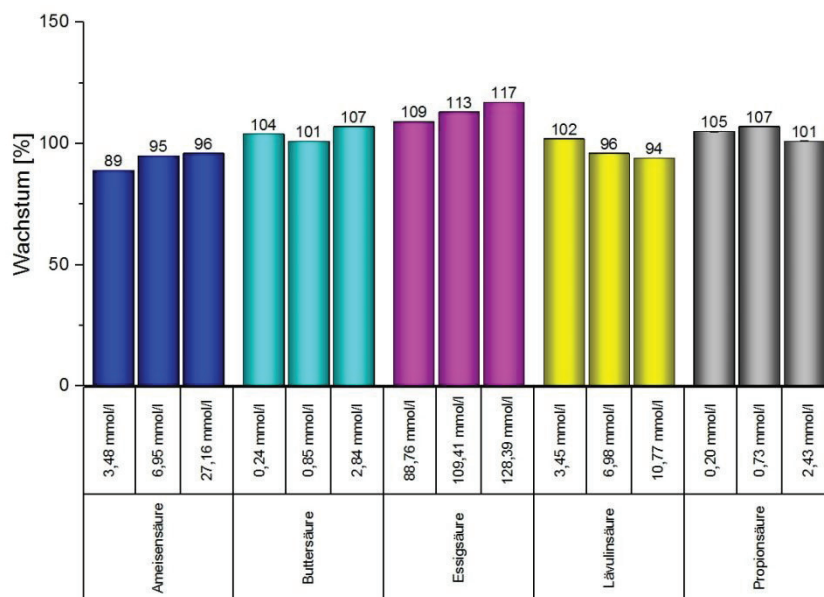


Abbildung 20: Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von *Halomonas halophila*.

Untersuchungen der Wirkung von ein- und mehrwertigen Phenolen auf das Wachstum von *Halomonas halophila* zeigen, dass 3 mmol/l Brenzcatechin und Hydrochinon das Wachstum um ca. 40 % verbessern. Diese Substanzen wirken ab der Konzentration von 7 mmol/l leicht hemmend, sie senken das Wachstum um ca. 10 %. 3 mmol/l Pyrogallol haben eine positive Wirkung auf die Mikroorganismen, ihr Wachstum steigt um 21 %. 7 mmol/l Pyrogallol verringern das Wachstum um ca. 30 %. 3 mmol/l Phenol sowie Guajacol wirken leicht inhibierend auf das Kulturwachstum, durch ihre Zugabe sinkt das Wachstum um ca. 20 %, eine Erhöhung der Konzentration von diesen Verbindungen auf 7 mmol/l reduziert das Wachstum bei Zugabe von Phenol auf 66 % und bei Zugabe von Guajacol auf 55 %. Eine Zugabe von 3 mmol/l Resorcin senkt das Wachstum um 6 %, eine Zugabe von 7 mmol/l um 10 %. Die Tests der Phenole mit Carboxylgruppen zeigen, dass p-Hydroxybenzoesäure für die Mikroorganismen nicht schädlich ist. 3 mmol/l Vanillinsäure, Homovanillinsäure und Syringasäure verringern das Bakterienwachstum um 10-15 %. Eine Erhöhung der Konzentration von Homovanillinsäure auf 7 mmol/l hat keinen Effekt auf das Wachstum, eine Erhöhung der Konzentration von Syringasäure auf 7 mmol/l verringert das Wachstum um 4 %. 7 mmol/l Vanillinsäure verringern die Zelldichte um ca. 20 %. Die Zelldichte sinkt bei einer Zugabe von 3 mmol/l Ferulasäure auf 85 % und bei einer Zugabe von 7 mmol/l auf 61 %. 3 mmol/l m-Cumarsäure und Gallussäure haben eine leicht inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum, das Zellwachstum sinkt durch ihre Zugabe auf 7-17 %. Eine Erhöhung der Säuren-Konzentration auf 7 mmol/l senkt das Wachstum auf 60 %. Phenole mit Carbonyl-Funktionalität wirken toxischer auf Zellen als entsprechende Phenole mit Carboxylgruppen. 3 mmol/l Coniferylaldehyd, Syringaldehyd und Vanillin haben eine leicht negative Wirkung auf das Zellwachstum. 3 mmol/l Apocynin senken das Wachstum auf 66 %. 7 mmol/l Coniferylaldehyd, Syringaldehyd, Vanillin und Apocynin inhibieren das Wachstum von Mikroorganismen ca. um die Hälfte (Tab. 9 und 10).

Tabelle 9: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Halomonas halophila*.

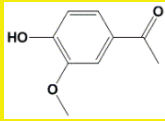
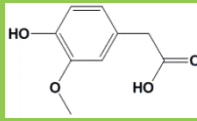
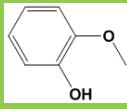
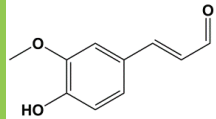
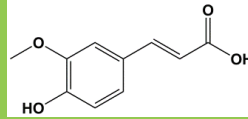
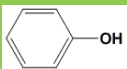
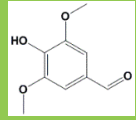
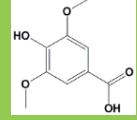
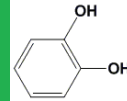
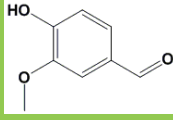
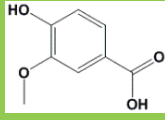
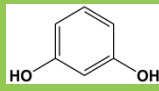
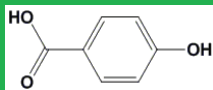
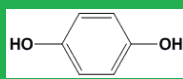
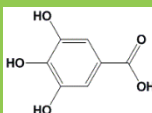
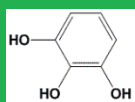
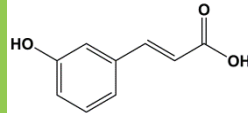
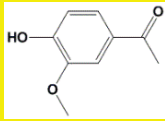
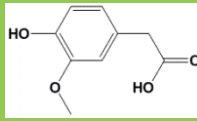
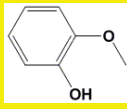
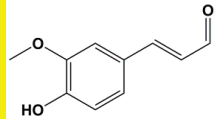
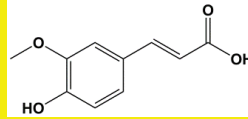
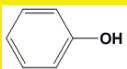
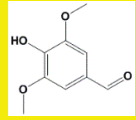
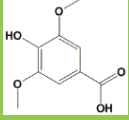
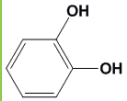
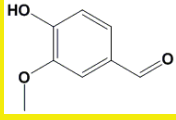
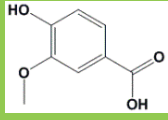
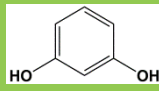
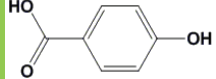
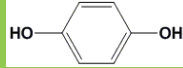
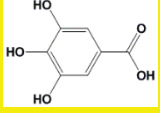
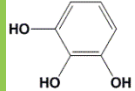
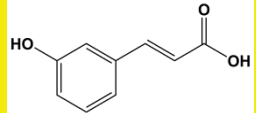
	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%]	66±0,02	90±0,16	78±0,00
Inhibitor	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%]	74±0,03	85±0,01	83±0,11
Inhibitor	Syringaldehyd	Syringensäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%]	74±0,04	91±0,20	139±0,05
Inhibitor	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%]	91±0,08	92±0,03	94±0,01
Inhibitor		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%]		101±0,12	141±0,18
Inhibitor		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%]		86±0,07	121±0,01
Inhibitor		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%]		93±0,02	
Wachstum [%]	0-33 %	67-100 %	101-145 %



Tabelle 10: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Halomonas halophila*.

	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor	54±0,02	91±0,01	55±0,04
Struktur	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor	42±0,01	61±0,13	66±0,02
Struktur	Syringaldehyd	Syringensäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor	61±0,04	96±0,20	92±0,16
Struktur	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor	55±0,04	83±0,10	90±0,02
Struktur		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor		97±0,04	88±0,43
Struktur		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor		58±0,04	68±0,04
Struktur		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%] Inhibitor		62±0,09	
Wachstum [%]	0-33 %	67-100 %	101-145 %
	34-66 %		

### 2.1.3. Inhibitorversuche mit Butanolproduzenten

Untersuchungen der Wirkung von verschiedenen Substanzen auf *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* zeigen, dass Alkohole und Furanderivate einen leicht fördernden Effekt auf das Zellwachstum haben (Abb. 21 und 22). 1,04 mmol/l bis 10,41 mmol/l Furfural verbessern das Wachstum um ca. 20 %, 0,4 mmol/l bis 5,15 mmol/l HMF um 5-8 %. 0,22 mmol/l bis 2,17 mmol/l

Ethanol sowie 4,68 mmol/l bis 18,73 mmol/l Methanol fördern das Wachstum um 6-10 %. Ameisensäure verursacht eine sehr leichte Verringerung der Zelldichte um 2 bis 9 %. Bis zu einer Konzentration von 112,41 mmol/l ist Essigsäure nicht schädlich für die Mikroorganismen. 149,88 mmol/l Essigsäure senken das Wachstum auf 64 % (Abb. 23).

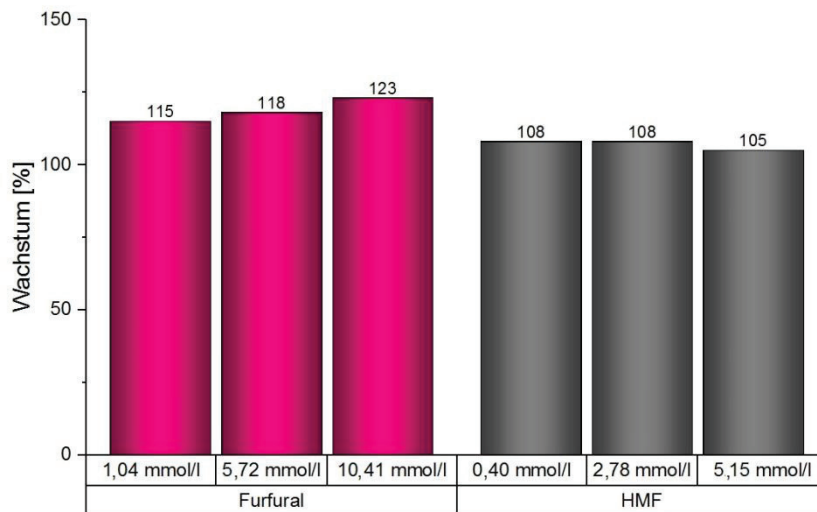


Abbildung 21: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

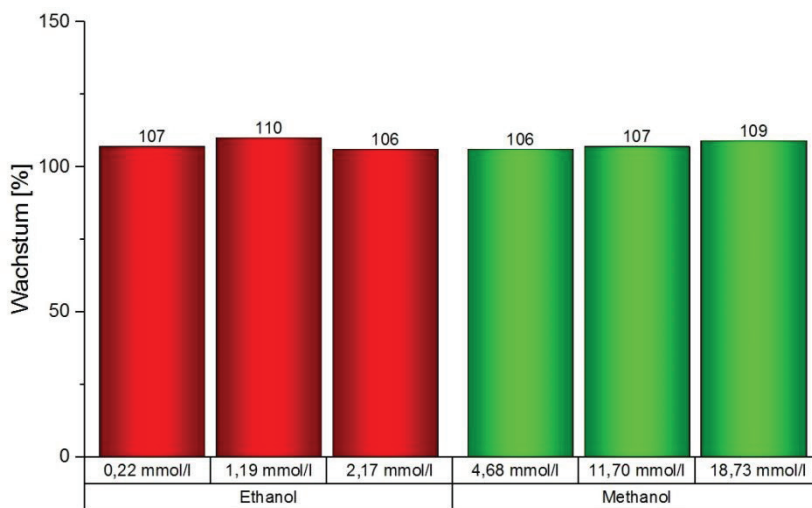
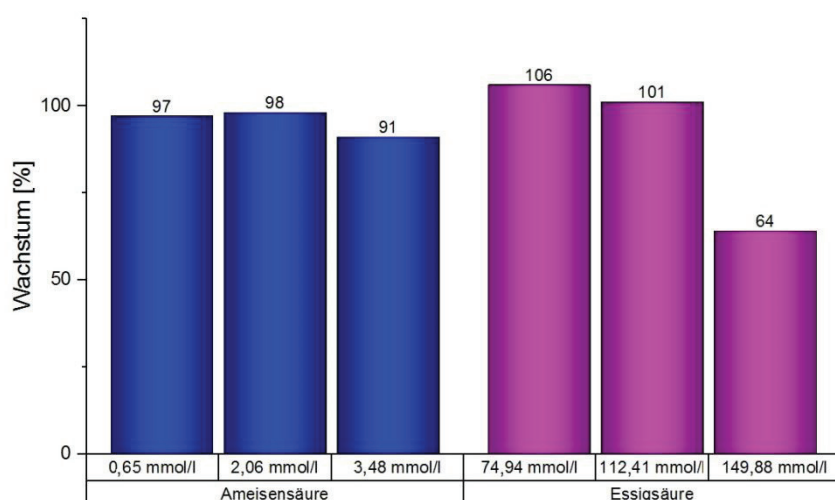


Abbildung 22: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.



**Abbildung 23:** Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Die Zugabe von ein- und mehrwertigen Phenolen wie Pyrogallol wirkt sich positiv auf *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* aus. 3 mmol/l Pyrogallol verbessern das Wachstum um 40 %, 7 mmol/l Pyrogallol um 9 %. 3 mmol/l Resorcin wirken untoxisch auf die Mikroorganismen, 7 mmol/l bewirken eine Senkung des Wachstums um 14 %. 3 mmol/l Phenol verringern das Wachstum um 20 %, 7 mmol/l um 11 %. 3 mmol/l Brenzcatechin und Hydrochinon hemmen das Wachstum um 5-7 %. Die Erhöhung der Konzentration von Brenzcatechin auf 7 mmol/l senkt das Wachstum um 32 %. 7 mmol/l Hydrochinon verringern das Zellwachstum um 20 %.

Die meisten Phenole mit Carboxyl-Gruppen weisen keine starke negative Wirkung auf die Mikroorganismen auf. Ausnahmen sind m-Cumarsäure, Ferulasäure und Vanillinsäure. 3 mmol/l m-Cumarsäure und Ferulasäure sowie 7 mmol/l Vanillinsäure senken das Wachstum ca. um die Hälfte. Die Erhöhung der Konzentration von m-Cumarsäure und Ferulasäure auf 7 mmol/l vermindert das Zellwachstum auf 15-20 %. 3 mmol/l Homovanillinsäure fördern das Wachstum um 8 %, 3 mmol/l und 7 mmol/l Hydroxybenzoesäure um 2 %. 3 mmol/l Syringasäure und Gallusäure hemmen das Wachstum um ca. 10 %, 7 mmol/l Syringasäure um 21 % und 7 mmol/l Gallusäure um 32 %. 3 mmol/l Vanillinsäure senken das Wachstum um 30 %, 7 mmol/l Homovanillinsäure um 7 %. Phenole mit Carbonyl-Funktionalität wirken am schädlichsten auf die Zellen. 3 mmol/l Apocynin, Syringaldehyd und Vanillin reduzieren das Wachstum von Mikroorganismen um ca. 20-40 %. 7 mmol/l Vanillin und Apocynin inhibieren das Wachstum von Mikroorganismen ca. um die Hälfte. 7 mmol/l Syringaldehyd verringern die Zellteilung auf 19 %. Zugabe von Coniferylaldehyd bewirkt den Tod der Mikroorganismen (Tab. 11 und 12).

Tabelle 11: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

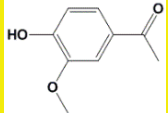
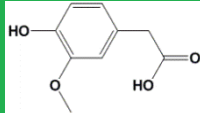
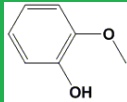
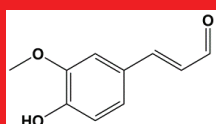
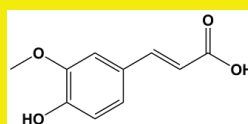
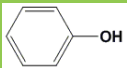
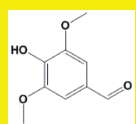
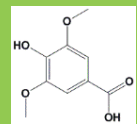
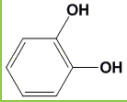
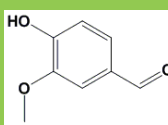
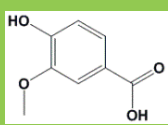
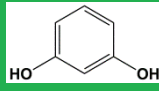
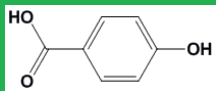
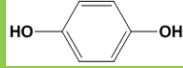
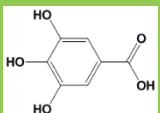
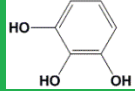
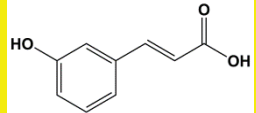
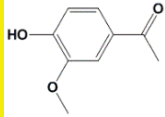
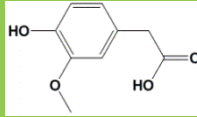
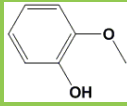
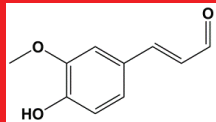
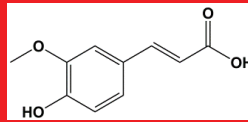
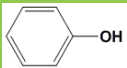
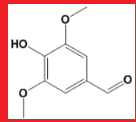
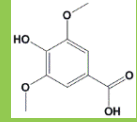
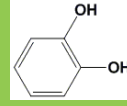
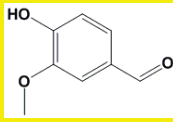
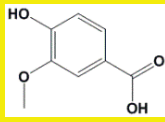
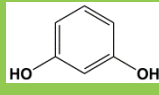
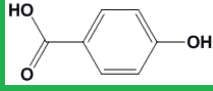
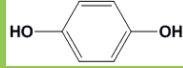
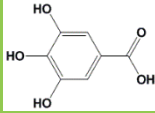
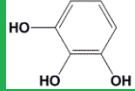
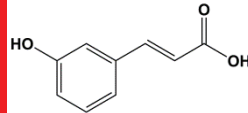
	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%]	64±0,01	108±0,05	124±0,05
Inhibitor	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%]	11±0,003	64±0,06	80±0,04
Inhibitor	Syringaldehyd	Syringasäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%]	63±0,03	88±0,03	93±0,04
Inhibitor	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%]	77±0,01	70±0,04	101±0,02
Inhibitor		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%]		102±0,03	95±0,02
Inhibitor		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%]		91±0,01	139±0,03
Inhibitor		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%]		40±0,04	
Wachstum [%]	0-33 %	67-100 %	101-145 %

Tabelle 12: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.

	Phenole mit Carbonyl-Funktionalität	Phenole mit Carboxyl-Funktionalität	Ein- und mehrwertige Phenole
Inhibitor	Apocynin	Homovanillinsäure	Guajacol
Struktur			
Wachstum [%]	42±0,04	93±0,02	90±0,03
Inhibitor	Coniferylaldehyd	Ferulasäure	Phenol
Struktur			
Wachstum [%]	2±0,005	15±0,00	89±0,01
Inhibitor	Syringaldehyd	Syringasäure	Brenzcatechin
Struktur			
Wachstum [%]	19±0,003	79±0,03	68±0,001
Inhibitor	Vanillin	Vanillinsäure	Resorcin
Struktur			
Wachstum [%]	49±0,04	45±0,04	86±0,03
Inhibitor		p-Hydroxybenzoesäure	Hydrochinon
Struktur			
Wachstum [%]		102±0,17	80±0,02
Inhibitor		Gallussäure	Pyrogallol
Struktur			
Wachstum [%]		68±0,01	109±0,02
Inhibitor		m-Cumarsäure	
Struktur			
Wachstum [%]		21±0,01	
Wachstum [%]	0-33 %	67-100 %	101-145 %

### 2.1.4. Überblick über die durchgeführten Inhibitorversuche

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die anaeroben Stämme *Thermoanaerobacter mathranii* und *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* und der aerobe Stamm *Halomonas halophila* bei der Zugabe von in der Sulfitablauge erhaltenen potentiellen Inhibitoren sich sehr ähnlich verhalten, wobei *Halomonas halophila* sich als robustester Stamm zeigt. Alle drei Stämme zeigen relativ hohe Resistenzen gegen organische Säuren und Alkohole. Furanderivate und ein- und mehrwertige Phenole wirken sogar leicht fördernd auf das Wachstum von Mikroorganismen. Derivatisierte Phenole sind dagegen schädlicher für die Zellen, wobei Phenole mit Carbonyl-Funktionalität toxischer als Phenole mit Carboxyl-Funktionalität sind. Coniferylaldehyd zeigt die höchste inhibierende Wirkung auf die Mikroorganismen.

### 2.2. Synergistische Effekte

Manche Autoren berichten, dass die Vielzahl von Hemmstoffen aus lignocellulosischen Hydrolysaten zu synergistischen Effekten zwischen ihnen führen kann. (Pampulha und Loureiro-Dias 1989; Ferrari et al. 1992; Palmqvist et al. 1999; Canilha et al. 2012; Martinez et al. 2001). Außer Einflüssen von einzelnen potentiellen Inhibitoren wurde die Kombination von mehreren Substanzen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* getestet. Im Mikromaßstab wurde die Wirkung von Pyrogallol, Phenol, Coniferylaldehyd und Kombinationen aus Phenol und Coniferylaldehyd, Coniferylaldehyd und Pyrogallol sowie Phenol und Pyrogallol auf das Zellwachstum untersucht (Abb. 24-26). Diese Substanzen wurden nach ihren inhibierenden Eigenschaften ausgewählt. In vorangegangenen Versuchen zeigten Phenol und Pyrogallol keine hemmende Wirkung auf das bakterielle Wachstum, Coniferylaldehyd zeichnete sich dagegen als starker Inhibitor aus.

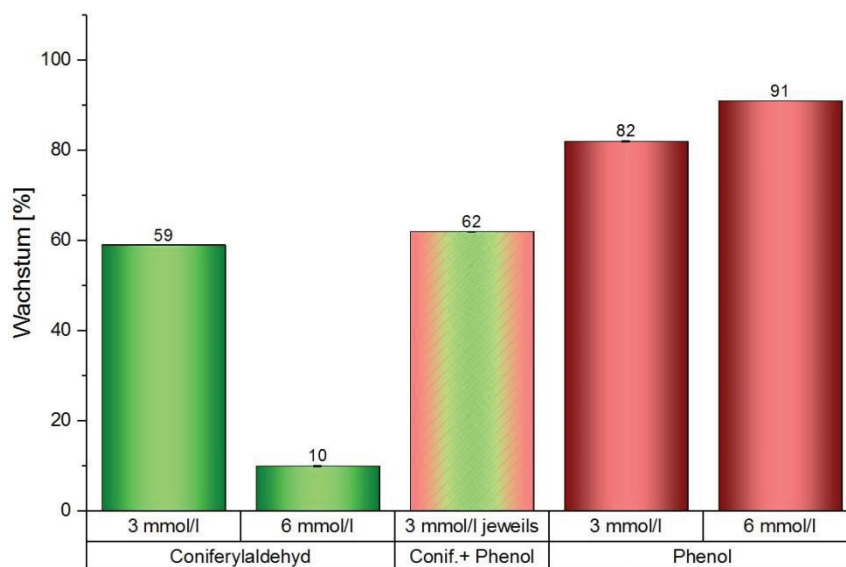
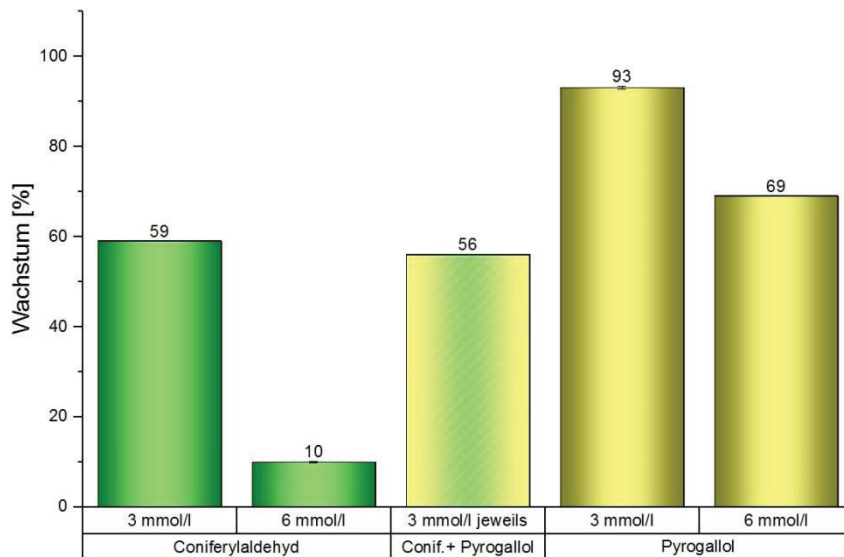
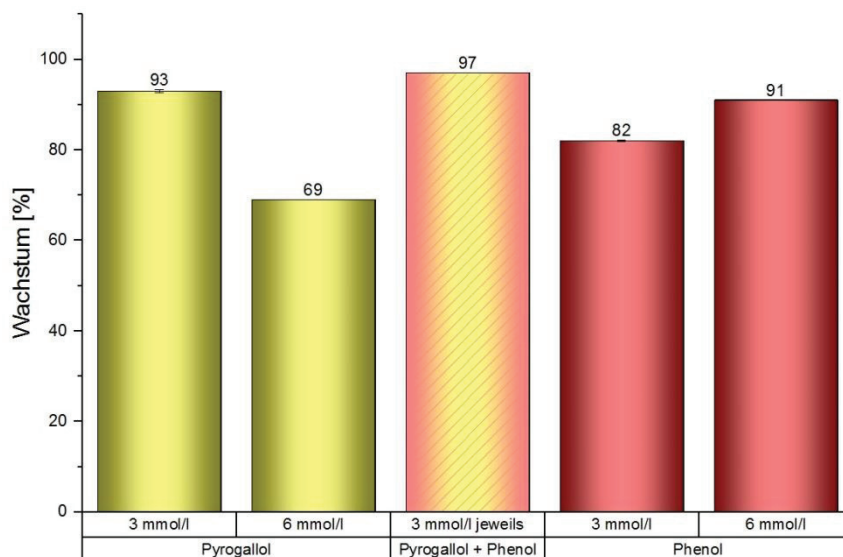


Abbildung 24: Einfluss von Phenol, Coniferylaldehyd und Mischung aus Phenol mit Coniferylaldehyd auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.



**Abbildung 25:** Einfluss von Pyrogallol, Coniferylaldehyd und einer Mischung aus Pyrogallol mit Coniferylaldehyd auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.



**Abbildung 26:** Einfluss von Pyrogallol, Phenol und einer Mischung aus Pyrogallol mit Phenol auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Weiter wurde der Einfluss von Furanderivaten (und Mischungen davon), organischen Säuren (und Mischungen davon) sowie Alkoholen (und Mischungen davon) auf das Zellwachstum getestet (Abb. 27-29). Danach wurde die Wirkung von einzelnen Substanzen (außer Coniferylaldehyd, welcher wegen seiner toxischen Wirkung auf die Bakterien ausgeschlossen wurde) mit der Wirkung von einem Gemisch aus diesen Substanzen verglichen (Abb. 30).

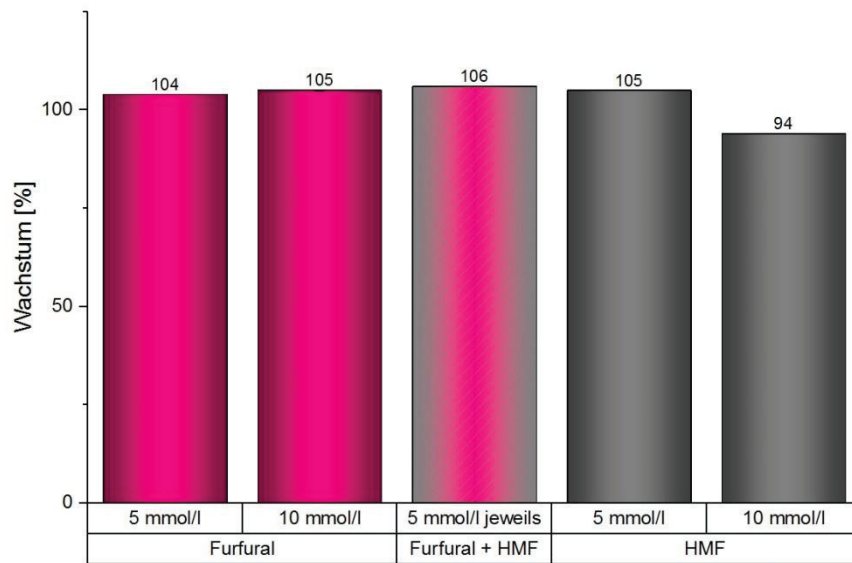


Abbildung 27: Einfluss von Furfural, HMF und einer Mischung aus Furfural mit HMF auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.

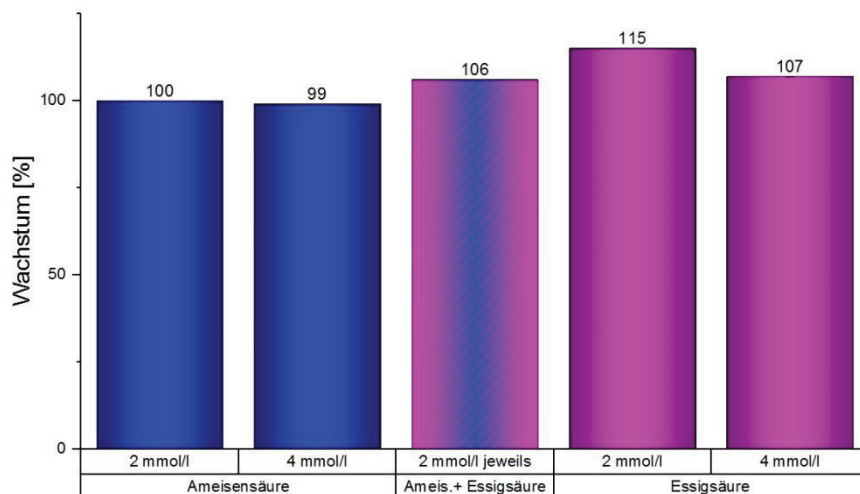


Abbildung 28: Einfluss von Ameisensäure, Essigsäure und einer Mischung aus Ameisensäure mit Essigsäure auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.



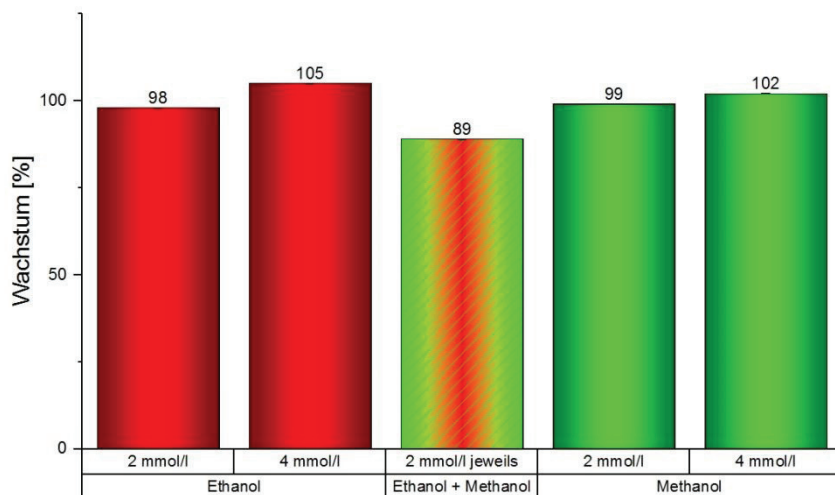


Abbildung 29: Einfluss von Ethanol, Methanol und einer Mischung aus Ethanol mit Methanol auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

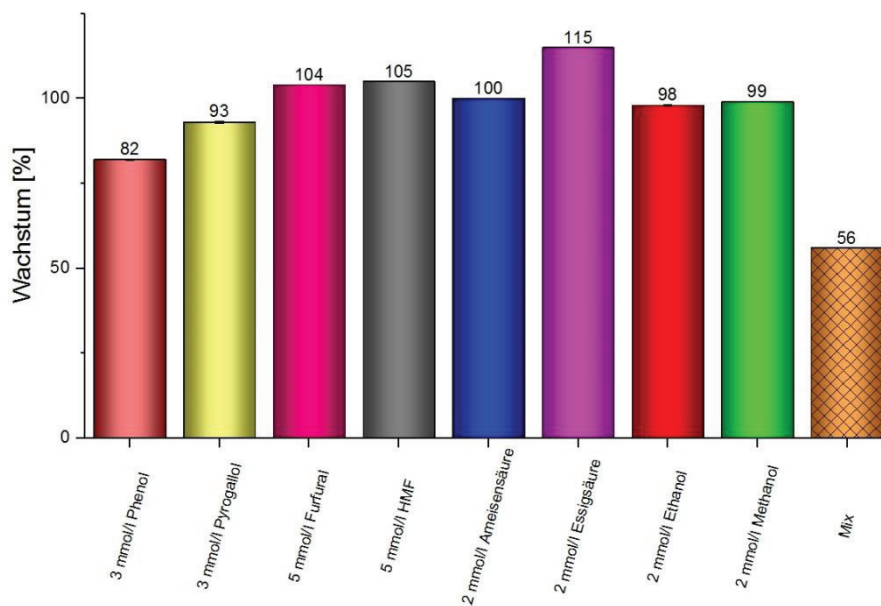


Abbildung 30: Einfluss von einzelnen Phenolen, Furanderivaten, organischen Säuren, Alkoholen sowie ihrer Mischung auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Der Vergleich des Zellwachstums nach der Zugabe von reinen einzelnen Verbindungen einer Klasse und von einer Mischung aus diesen Substanzen zeigt keine synergistischen Effekte zwischen diesen Substanzen. Ein Gemisch aus acht Komponenten (welche keine hemmende Wirkung auf die Mikroorganismen aufweisen) wirkt stärker inhibierend als einzelne Verbindungen. Um herauszufinden, ob tatsächlich synergistische Effekte im Spiel sind, oder der Grund dafür an der hohen Gesamtkonzentration dieser Verbindungen im Medium liegt, wurde der Versuch mit der Zugabe von acht potentiellen Inhibitoren wiederholt, wobei die Lösung ein mal 1:2 und ein mal 1:3 mit einem zuckerhaltigen Medium verdünnt wurde. Es wurde auch die Wirkung von dem Gemisch aus diesen acht Substanzen nach dem Weglassen von einzelnen Substanzgruppen sowie seiner 1:2 und 1:3 Verdünnungen auf das Wachstum von Mikroorganismen überprüft (Abb. 31).

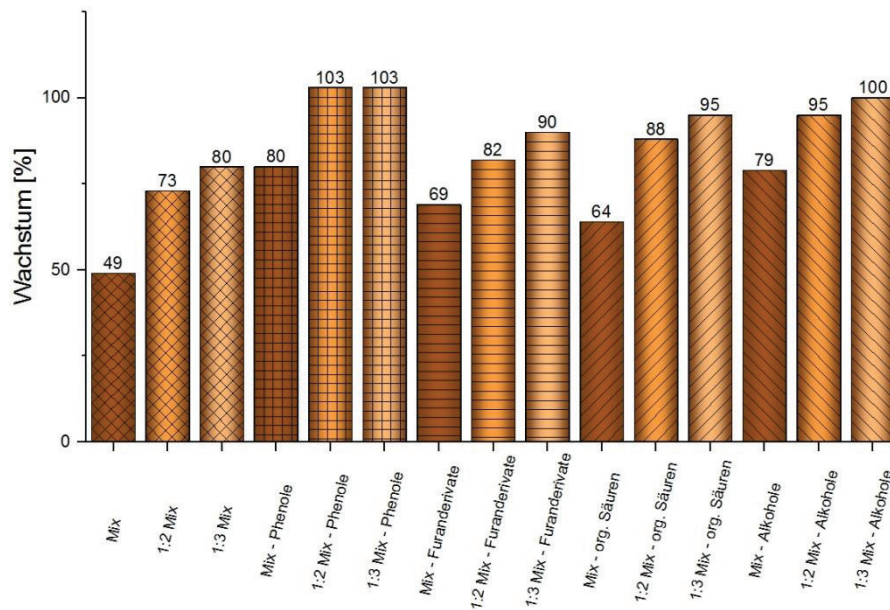


Abbildung 31: Einfluss von Gemischen aus jeweils 3 mmol/l Phenol und Pyrogallol, 5 mmol/l Furfural und HMF, 2 mmol/l Ameisensäure und Essigsäure und 2 mmol/l Ethanol und Methanol und seine 1:2 und 1:3 Verdünnungen sowie das Gemisch und seine 1:2 und 1:3 Verdünnungen nach dem Weglassen von einzelnen Substanzgruppen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Wie erwartet hemmten die Verdünnungen des Gemisches aus Phenolen, Furanderivaten, organischen Säuren und Alkoholen das Wachstum von Mikroorganismen schwächer als die konzentrierte Lösung. Nach dem Abzug von verschiedenen Substanzgruppen wurde ein besseres Wachstum als nach der Zugabe von allen vier Verbindungsgruppen beobachtet (die Gesamtkonzentration wird durch den Abzug von einer Gruppe verringert), es gibt aber keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Wachstumswerten nach dem Abzug von einzelnen Gruppen. Daraus schließt man, dass der Unterschied im Wachstum nach der Zugabe von einzelnen Verbindungen und ihrer Kombination nicht an der Synergie sondern nur an der höheren Konzentration dieser Verbindungen in der Lösung liegt.

### 2.3. Verfolgung des Fermentationsprozesses von *Thermoanaerobacter mathranii* mittels in situ $^1\text{H}$ NMR Spektroskopie

Zum tieferen Verständnis von in Zellen ablaufenden Prozessen in Anwesenheit von phenolischen Verbindungen beim Ethanolproduzenten *Thermoanaerobacter mathranii* wurde in situ  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie verwendet. Diese Technik erlaubt die Beobachtung der Mikroorganismen während ihres Wachstums direkt im NMR Röhrchen. Es wurde die Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* mit und ohne Zugabe von potentiell inhibierenden Substanzen untersucht, um besser zu verstehen, wie genau diese Substanzen auf die Zellen wirken. Als potentielle Inhibitoren wurden folgende Substanzen ausgewählt: Phenol - eine Verbindung, welche das Wachstum von Mikroorganismen fördert, Coniferylaldehyd und Ferulasäure - Substanzen mit ähnlicher Struktur, welche auf die Bakterien toxisch wirken.

### 2.3.1. In situ $^1\text{H}$ NMR Spektroskopie

Ein typisches Spektrum der Fermentationsprodukte von *Thermoanaerobacter mathranii* ist in Abb. 32 dargestellt. Die Signale im aromatischen Bereich bei 7,37-6,80 ppm stammen von Phenol. Die Peaks bei 5,24 ppm und 3,78-3,41 ppm wurden Glukose zugeordnet. Der große Peak bei 4,75 ppm ist das Wassersignal. Das Tripletts bei 1,17 ppm entspricht der Methylgruppe von Ethanol. Das Signal bei 0,00 ppm stammt von Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS), welches als Standard eingesetzt wurde.

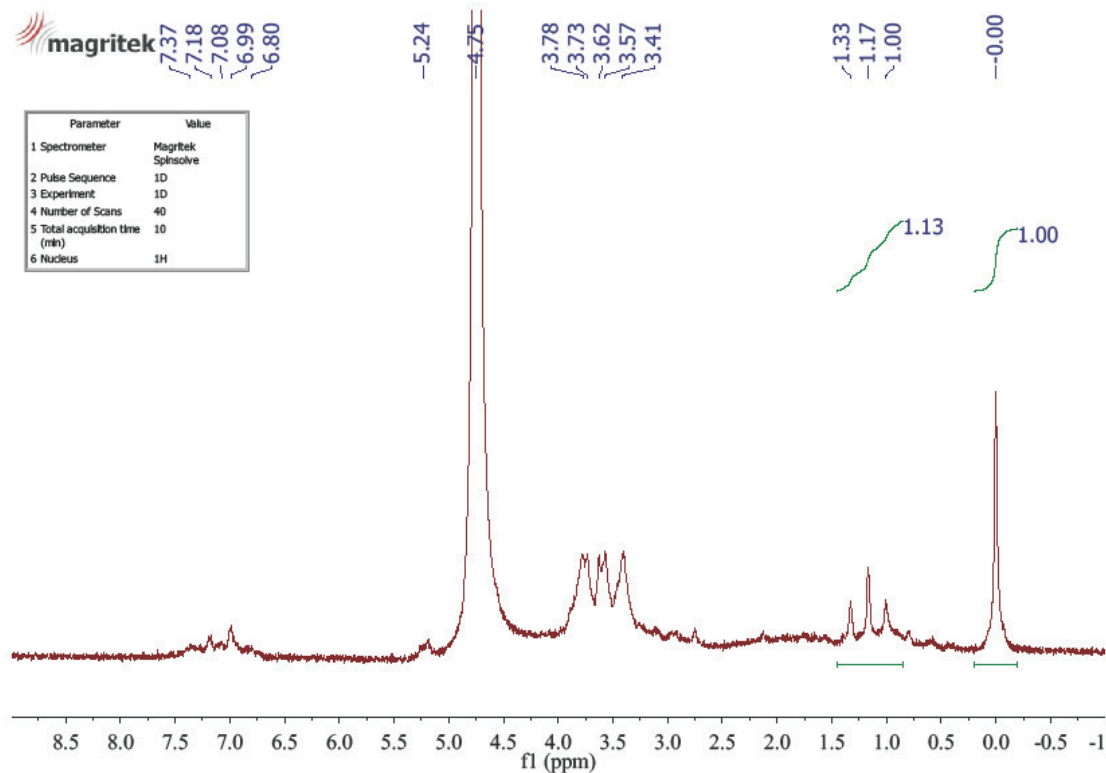


Abbildung 32:  $^1\text{H}$  NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 44 MHz) von *Thermoanaerobacter mathranii* Fermentationsprodukten (Fermentation mit Zugaben von Phenol nach 8 h ist dargestellt).

### 2.3.2. Messungen der optischen Dichte

Um einen Zusammenhang zwischen dem Wachstum von Mikroorganismen und der Menge von während der Fermentation entstehendem Ethanol zu finden, war es wichtig parallel zu  $^1\text{H}$  NMR Messungen  $\Delta\text{OD}$  der Proben zu bestimmen. Dies war die größte Herausforderung in diesem Experiment. 1 ml Kultur wurde in einem NMR Röhrchen fermentiert. Aufgrund des geringen Volumens der Bakteriensuspension war die Probenentnahme für die OD Messungen unmöglich. Die einzige Lösung dafür war die Probe im NMR Röhrchen direkt im Multiskan Microplate Spectrophotometer zu messen. Dafür wurde eine PS Küvette mit einem 5 mm Bohrer angebohrt, wobei die zwei Wände der Küvette, durch welche der Lichtstrahl hindurchgeht, nicht beschädigt wurden (Abb. 33). Um das Verrutschen des NMR Röhrchens in der Küvette zu verhindern, wurde eine Kappe aus schwarzem Schaumstoff für die Küvette angefertigt. Vor der Messung wurde die Probe durch Aufsetzen einer Kartonschachtel vor Licht geschützt (Abb. 34).

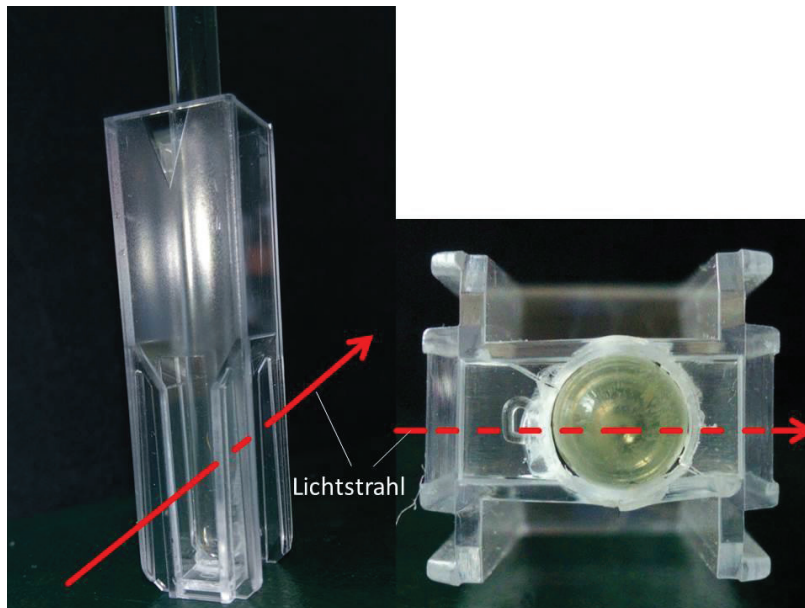


Abbildung 33: Platzierung des NMR Röhrchens in der Küvette: Seitenansicht (links), Ansicht von unten (rechts).



Abbildung 34: OD Messung der Bakteriensuspension im NMR Röhrchen: die Probe im NMR Röhrchen in der speziell angefertigten Küvette mit einer Kappe aus Schaumstoff (links); das NMR Röhrchen im Multiskan Microplate Spectrophotometer (rechts).

### 2.3.3. Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf die Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii*

Während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* wurden die Veränderungen der Protonensignale von Ethanol während der Fermentation beobachtet. Seine Konzentration konnte durch Verwendung eines internen Standards (DSS) quantifiziert werden. Die fermentative Bildung von Ethanol ist in Abbildung 35 dargestellt. Die Wachstumskurven von *Thermoanaerobacter mathranii* wurden durch die OD Messung bestimmt (Abb. 36). Der Vergleich dieser Ergebnisse zeigt, dass die Produktion von Ethanol direkt abhängig vom Wachstum der Mikroorganismen ist. Die Zugabe von Phenol hat einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und erhöht die Ethanolproduktion um ca. 20 %, während die Zugabe von Coniferylaldehyd und Ferulasäure eine negative Wirkung darauf haben. Coniferylaldehyd verringert das Wachstum von Mikroorganismen und die Produktion von Ethanol um mehr als die Hälfte. Ferulasäure hat die größte Hemmwirkung auf das Zellwachstum. Die Ethanolproduktion sinkt unter 20 %.

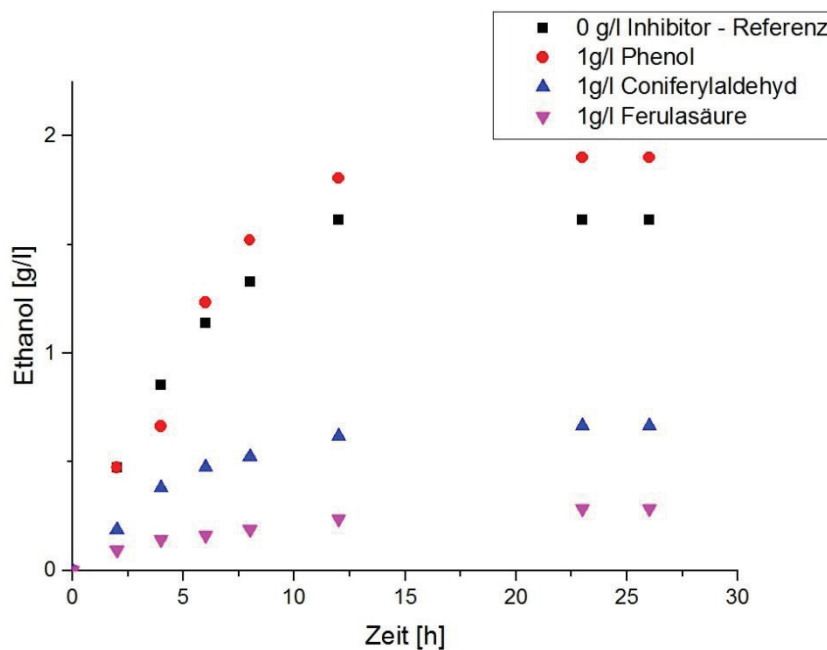
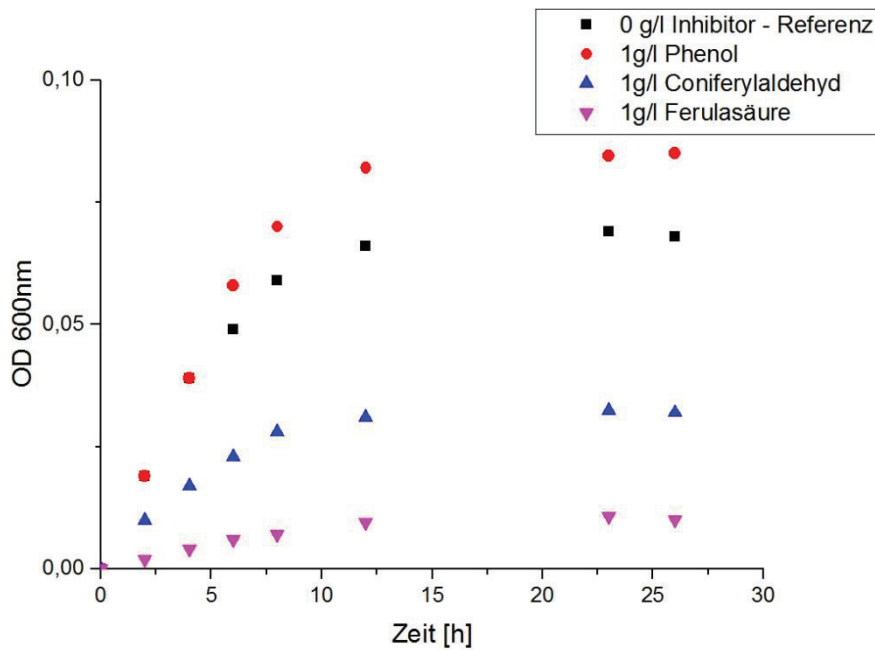


Abbildung 35: Ethanolproduktion durch *Thermoanaerobacter mathranii* mit und ohne Zugabe von phenolischen Inhibitoren.



**Abbildung 36: Wachstumskurven von *Thermoanaerobacter mathranii* mit und ohne Zugabe von phenolischen Inhibitoren.**

Im Kapitel 2.2.1 Teil I wurde berichtet, dass Coniferylaldehyd eine höhere toxische Wirkung auf die Mikroorganismen als Ferulasäure hat. In situ  $^1\text{H}$  NMR Experimente zeigten jedoch, dass Ferulasäure stärker hemmend als Coniferylaldehyd wirkt. Vermutlich liegt der Unterschied darin, dass die Ferulasäure vor dem Fermentationsversuch im NMR Röhrchen nicht neutralisiert werden konnte. Es wurde mit sehr kleinen Probenvolumina gearbeitet und die Verwendung einer pH-Elektrode war unmöglich.

### 2.3.4. Änderung von potentiellen Inhibitoren während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii*

#### 2.3.4.1. Wechselwirkung von Coniferylaldehyd mit *Thermoanaerobacter mathranii*

Die Frage, was genau zwischen den Zellen und den aromatischen Verbindungen geschieht, konnte durch den  $^1\text{H}$  NMR Versuch zur Verfolgung der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* nicht beantwortet werden. Die Konzentration von Phenolen war zu niedrig, um mit einem 44 MHz NMR Spektrometer irgendwelche Veränderungen von aromatischen Signalen in  $^1\text{H}$  NMR Spektren während des Wachstums der Mikroorganismen zu beobachten. Aus diesem Grund wurde ein Experiment gestartet, in dem 1 g/l Coniferylaldehyd in einem 15 ml Röhrchen in  $\text{D}_2\text{O}$  und in zwei 15 ml Röhrchen in einem Medium mit Glukose und DSS gelöst wurde. Dem dritten Röhrchen mit Coniferylaldehyd im Medium wurde *Thermoanaerobacter mathranii* zugegeben. Alle drei Röhrchen wurden in einem Wasserbad bei 65 °C für 72 h inkubiert, wobei in regelmäßigen Zeitintervallen allen drei Röhrchen eine Probe für  $^1\text{H}$  NMR Messung entnommen wurde. Dieser Versuch wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  und im Medium ohne Bakterien durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Umwandlungen von Coniferylaldehyd in der Wasserlösung bzw. Mediumlösung stattfanden. Statt Wasser wurde  $\text{D}_2\text{O}$  für die Herstellung des Mediums verwendet, um eine bessere Auflösung der NMR Spektren zu erhalten. Wie die Versuche im Kapitel 2.1.1. Teil I zeigen, wirkt Coniferylaldehyd (Tab. 7-8) aus der ganzen



Palette von phenolischen Substanzen am schädlichsten auf das Wachstum von Mikroorganismen, daher wurde diese Verbindung für die Untersuchung ausgewählt.

Während der Inkubation änderte sich die Farbe der Lösungen mit der Zeit. Die Mediumlösung mit Coniferylaldehyd färbte sich intensiver als zu Beginn. Die Zugabe von Bakteriensuspension bewirkte dagegen eine leichte Entfärbung der Lösung nach einer bestimmten Zeit. Die Farbe von Coniferylaldehyd in D<sub>2</sub>O blieb unverändert (Abb. 37).

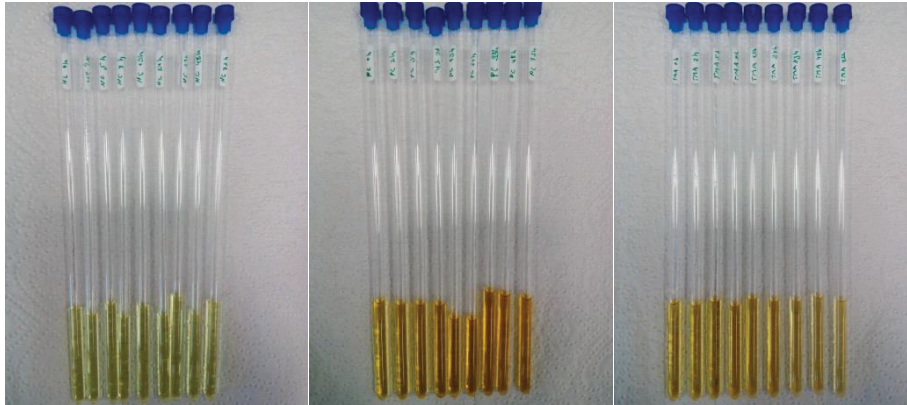


Abbildung 37: Änderung der Farbe von Coniferylaldehydlösung in D<sub>2</sub>O (links), im Medium mit Glukose (mitte), im Medium mit Glukose nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (rechts) nach 0, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72h der Inkubation bei 65 °C (die Probenreihenfolge von links nach rechts).

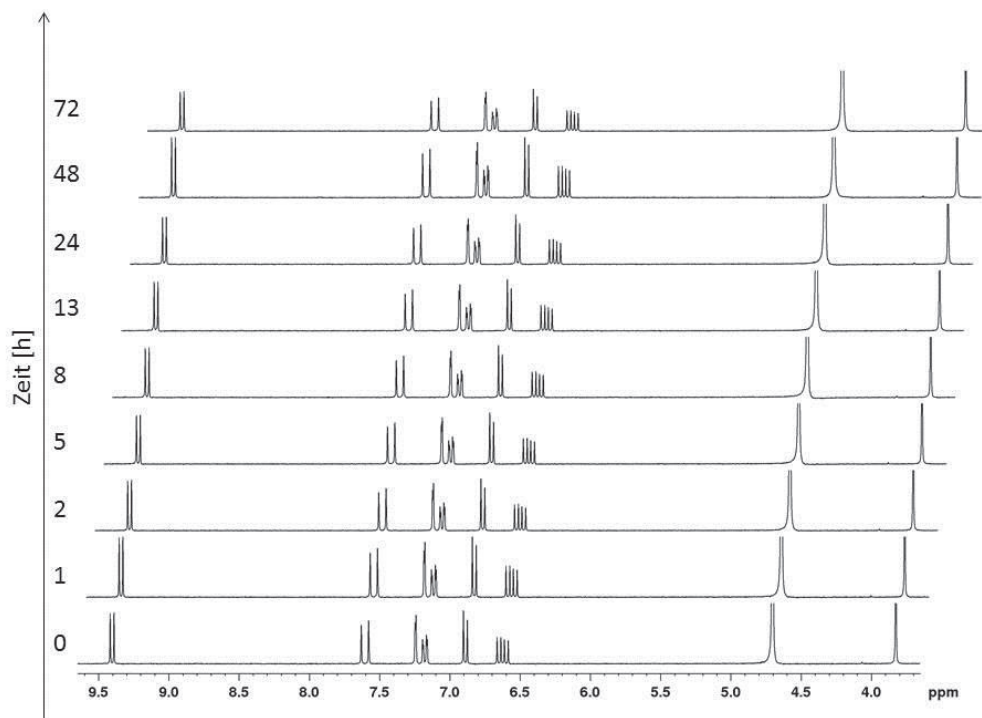


Abbildung 38: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung in D<sub>2</sub>O während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Die Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 0, 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h.

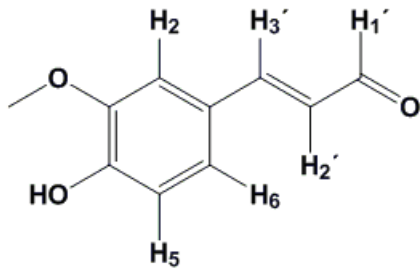


Abbildung 39: Nummerierung der Protonen von Coniferylaldehyd.

Die Abb. 38 zeigt, dass die Spektren von Coniferylaldehyd in D<sub>2</sub>O sich während der Inkubation bei 65°C nicht ändern:

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Coniferylaldehyd (Abb. 39): δ(ppm)<sub>H</sub> = 9,41 (1H, d, J=8,2, H-1'); 7,61 (1H, d, J=15,7, H-3'); 7,24 (1H, d, J=1,8, H-2); 7,18 (1H, dd, J<sub>1</sub>=8,2, J<sub>2</sub>=1,8, H-6); 6,89 (1H, d, J=8,2, H-5); 6,63 (1H, dd, J<sub>1</sub>=15,7, J<sub>2</sub>=8,2, H-2'); 3,82 (3H, s, CH<sub>3</sub>-).

Der große Peak bei 4,70 ppm stammt von Wasser, der kleine Peak bei 8,47 ppm konnte nicht identifiziert werden.

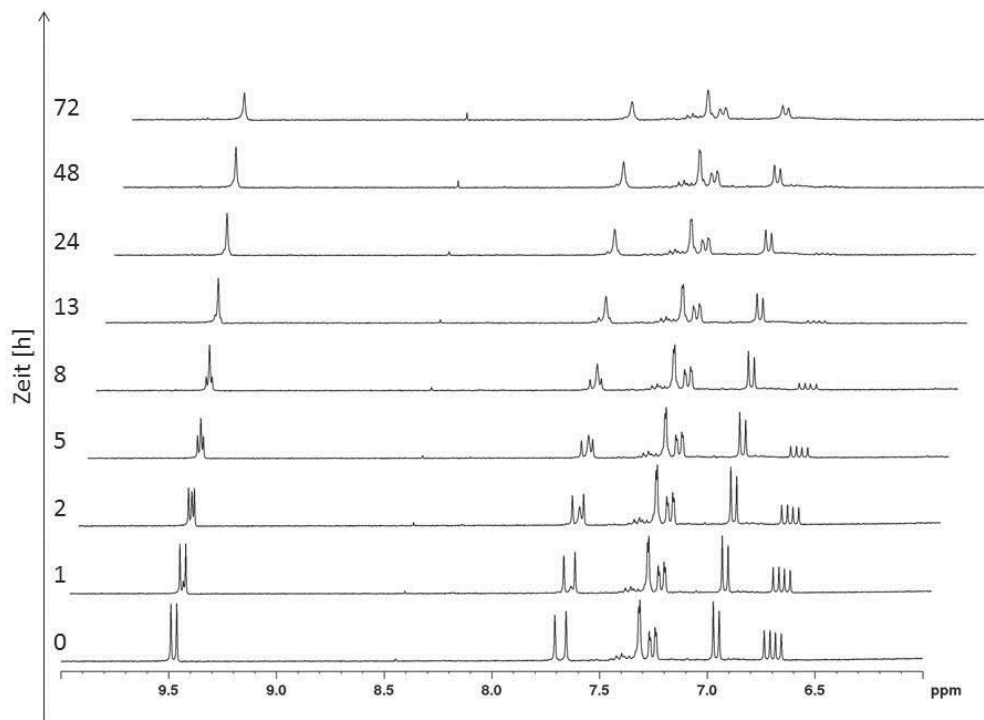


Abbildung 40: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung im Medium mit Glukose während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Die Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 0, 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h.

In der Abbildung 40 ist die Änderung von Coniferylaldehyd im Medium während der Inkubation dargestellt. Das Dublett vom Dublett bei 6,63 ppm verschwindet. Dieses Signal ist dem H-2' zugeordnet. Gleichzeitig wandeln sich die Dubletts bei 9,41 und 7,61 ppm in Singlets um. Diese Peaks stammen von den Nachbaratomen H-1' und H-3'. Diese Änderung im Spektrum deutet auf eine Dimerisierungsreaktion von Coniferylaldehyd (Abb. 41) hin. Die Konzentrationsänderungen von



Coniferylaldehyd und weiteren Substanzen in der Lösung wurden durch die Verwendung eines internen Standards (DSS) quantifiziert. Während der Inkubation wandelt sich Coniferylaldehyd in sein Dimer um. Am Ende der Reaktionszeit ist kaum noch Coniferylaldehyd in der Lösung vorhanden (Abb. 42)

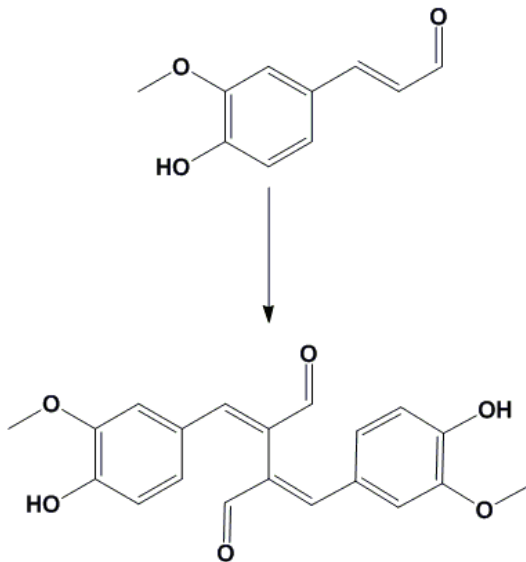


Abbildung 41: Dimerisierungsreaktion von Coniferylaldehyd, welche während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium ohne Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* stattfindet.

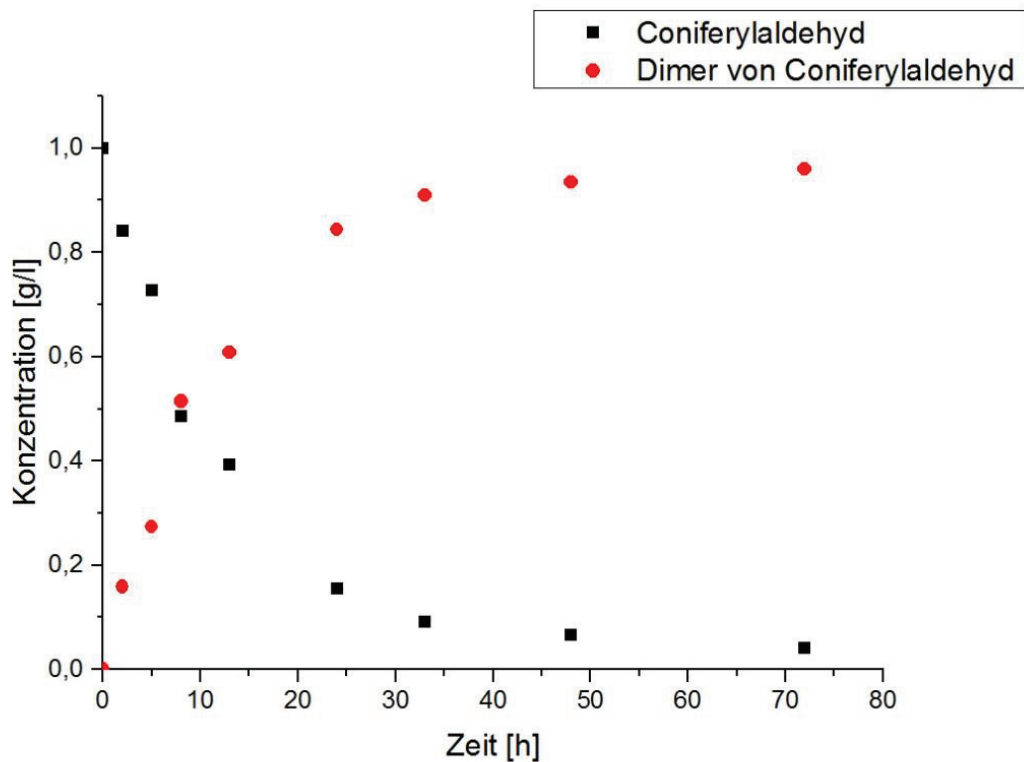


Abbildung 42: Umwandlung von Coniferylaldehyd in ein Dimer während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium ohne Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii*.

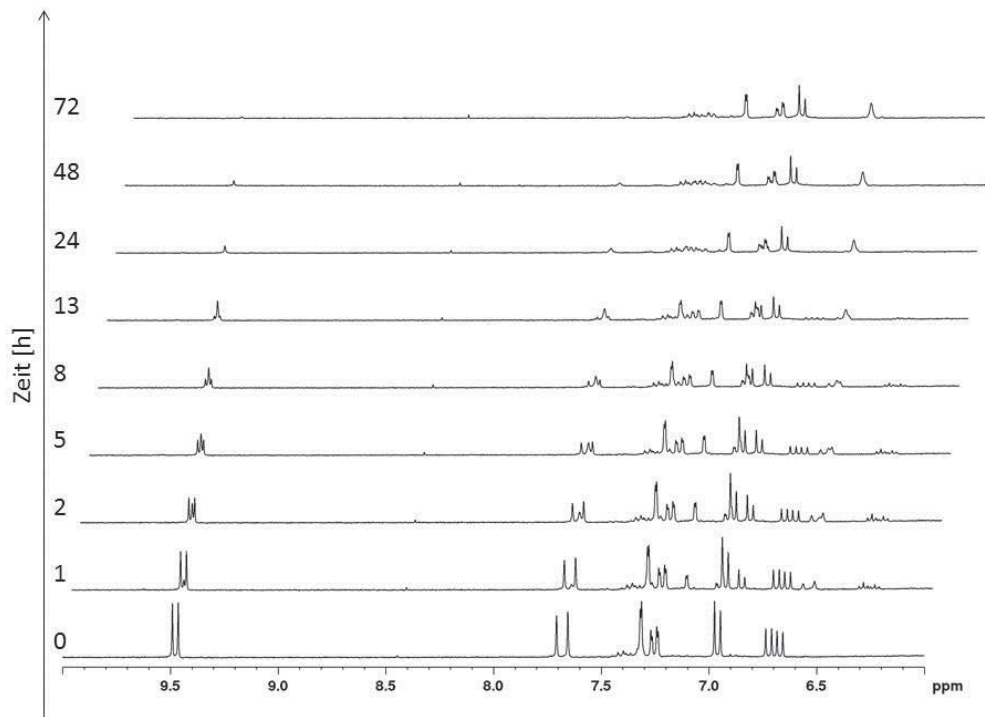


Abbildung 43:  $^1\text{H}$  NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung im Medium mit Glukose nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Das untere Spektrum wurde unmittelbar nach der Zugabe von Mikroorganismen aufgenommen, weitere Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h.

Die Zugabe von Mikroorganismen bewirkt weitere Änderungen im Spektrum (Abb. 43). Schon nach 2 h entstehen neue Signale, welche Coniferylalkohol zugeordnet werden können.

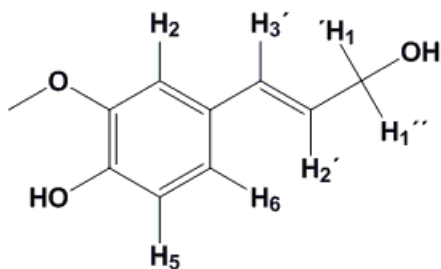


Abbildung 44: Nummerierung der Protonen von Coniferylalkohol.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Coniferylalkohol (Abb. 44):  $\delta(\text{ppm})_{\text{H}} = 7,15$  (1H, d,  $J=2,0$ , H-2); 6,99 (1H, dd,  $J_1=8,2$ ,  $J_2=2,0$ , H-6); 6,89 (1H, d,  $J=8,2$ , H-5); 6,58 (H-1, d,  $J=16,0$ , H-3'); 6,30 (H-1, m, H-2'); 4,24 (2H, dd,  $J=6$ ,  $J=1,3$ , H-1'); 3,90 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -).

Mit der Zeit ändern sich die Spektren von Coniferylalkohol. Das Dublett vom Dublett bei 4,24 ppm (H-1') wandelt sich in ein Dublett um, das Dublett bei 6,58 ppm (H-3') in ein Singlet. Das Multipllett bei 6,30 ppm von mit H-1' und H-3' benachbartem H-2' verschwindet. Das bedeutet, dass auch im Fall von Coniferylalkohol eine Dimerisierung stattfindet.

Gleichzeitig findet wie im Röhrchen mit Medium ohne Bakteriensuspension eine Abnahme des H-2' Signals und eine Umwandlung von H-1' und H-3' Dubletts zu Singlets von Coniferylaldehyd statt, also eine Dimerisierungsreaktion von Coniferylaldehyd (Abb. 45).

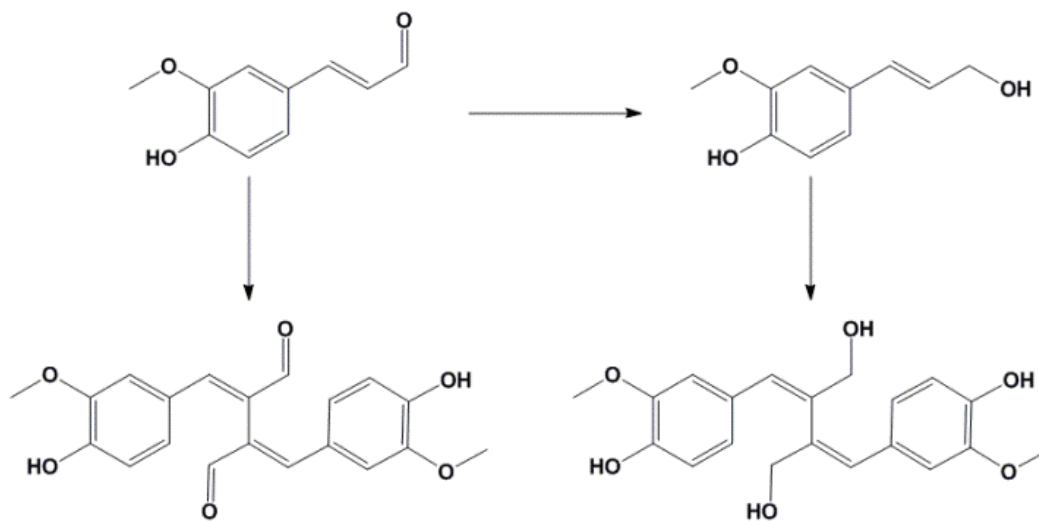


Abbildung 45: Umwandlung von Coniferylaldehyd in Coniferylalkohol und gleichzeitige Dimerisierung von Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol.

Die Zugabe von Mikroorganismen bewirkt eine Reduktion von Coniferylaldehyd zu Coniferylalkohol. Dieser Effekt wurde nicht im Medium ohne Mikroorganismen beobachtet. Aus Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol entstehen im Verlauf der Reaktion Dimere, wobei die Konzentration des Dimers von Coniferylaldehyd am Anfang der Reaktion steigt und danach wieder sinkt. Vermutlich wandelt sich das Coniferylaldehyddimer in ein Coniferylalkoholdimer um. Am Ende der Inkubation ist fast ausschließlich Dimer von Coniferylalkohol in der Probe vorhanden (Abb. 46).

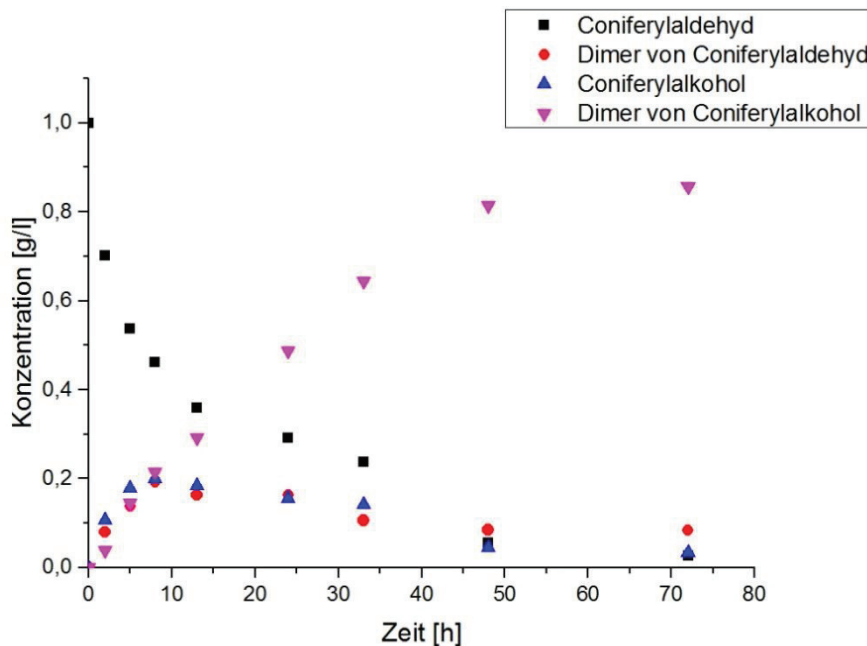


Abbildung 46: Umwandlung von Coniferylaldehyd in Coniferylalkohol und gleichzeitige Dimerisierung von Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii*.

### 2.3.4.2. Wechselwirkungen von Ferulasäure, Vanillin, Syringaldehyd, Gallussäure, Phenol und Pyrogallol mit *Thermoanaerobacter mathranii*

Weiter wurde auch die Veränderung von Ferulasäure, Vanillin, Syringaldehyd, Gallussäure, Phenol und Pyrogallol nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* verfolgt. Diese Substanzen haben unterschiedliche Wirkungen auf die Mikroorganismen. Phenol und Pyrogallol fördern das Zellwachstum, Gallussäure hat keinen signifikanten Effekt, Ferulasäure, Syringaldehyd und Vanillin wirken leicht hemmend auf das Wachstum von Bakterien.

In diesem Versuch wurden zwei NMR Röhren mit einem Medium mit einem potentiellen Inhibitor, Glukose und DSS befüllt, wobei statt Wasser D<sub>2</sub>O verwendet wurde. Weiters wurde ein <sup>1</sup>H NMR Spektrum vom Medium mit Inhibitor aufgenommen. In das zweite Röhren wurde die Bakterienkultur zugegeben. Beide Röhren (mit Medium und mit Medium und Bakterienkultur) wurden für 72 h in einem 65 °C Wasserbad inkubiert. Nach 72 h wurden <sup>1</sup>H NMR Messungen vom Medium und vom Medium mit Mikroorganismen durchgeführt. Die lange Zeit von 72 h wurde ausgewählt, um sicher zu gehen, dass keine Fermentationsvorgänge mehr ablaufen und die Bakterien sich in der Absterbephase befinden.

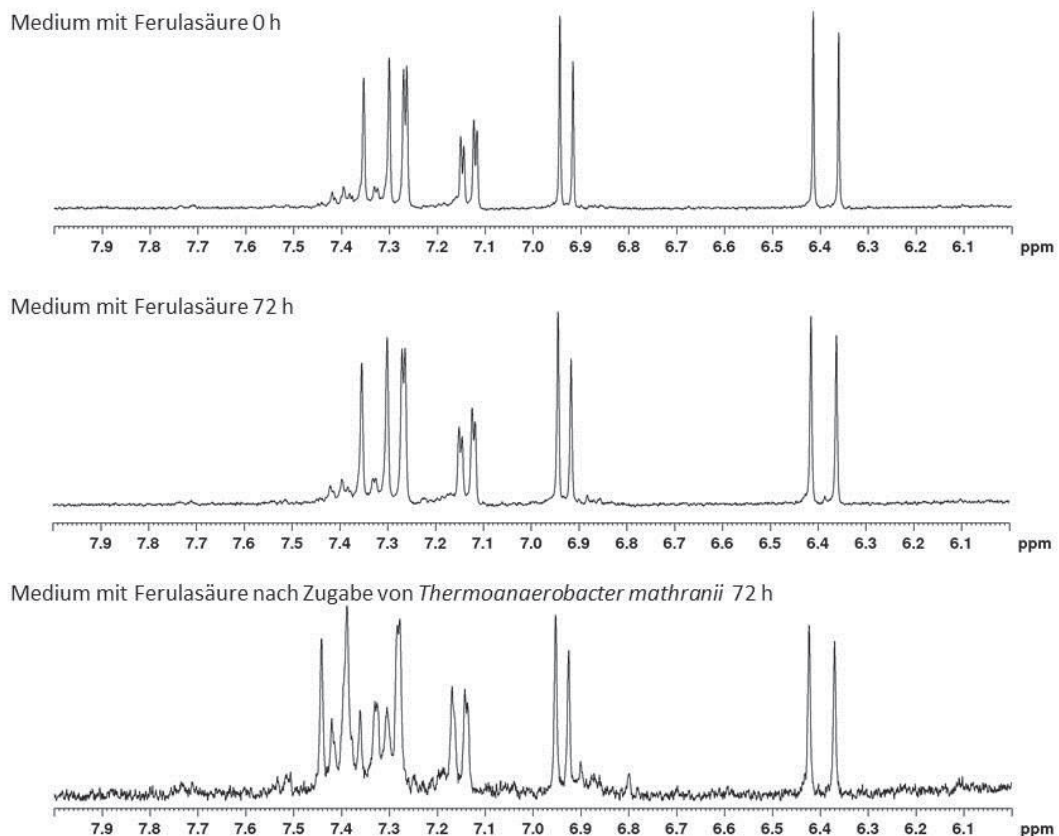


Abbildung 47: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Medium mit Ferulasäure vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Ferulasäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Ferulasäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

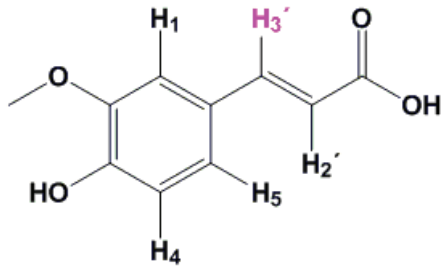


Abbildung 48: Nummerierung der Protonen von Ferulasäure.

Die Spektren von Ferulasäure (Abb. 78) im NMR Röhrchen ohne Bakterienkultur bleiben unverändert (Abb. 47). Die Dubletts bei 7,33 und 6,39 ppm entsprechen H-3' und H-2' (Abb. 39). Die Peaks bei 7,27, 7,14 und 6,93 ppm entsprechen aromatischen Protonen an der Position 2, 6 und 5 (H-2,6,5). Nach der Zugabe von Bakteriensuspension und der Inkubation bei 65 °C nimmt die Intensität des H-3' Signals ab, wobei bei 7,42 ppm ein zusätzliches Dublett entsteht. Seine Kopplungskonstante ( $J=16$ ) entspricht der Kopplungskonstante von H-2' und H-3', deswegen wurde vermutet, dass es sich bei dem neuen Dublett um H-3' mit einer neuen chemischen Verschiebung handelt.

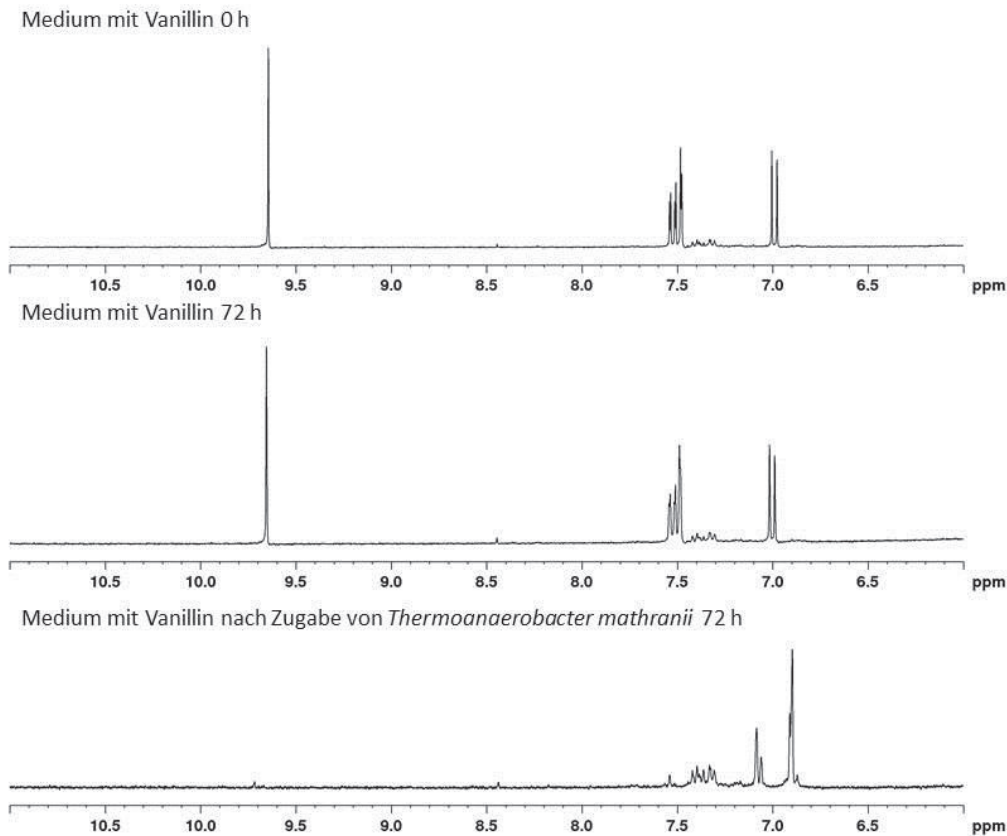


Abbildung 49: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Medium mit Vanillin vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Vanillin nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Vanillin nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

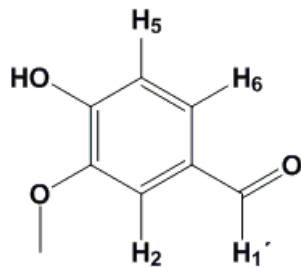


Abbildung 50: Nummerierung der Protonen von Vanillin.

Vanillin (Abb. 50) veränderte seine Struktur im Medium nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nicht (Abb. 49). Ein Singlet bei 9,65 ppm entspricht dem Aldehydproton, die Signale bei 7,51 ppm wurden den zweiten und sechsten aromatischen Protonen und ein Dublett bei 6,99 ppm dem fünften aromatischen Proton zugeordnet. Die Zugabe von Mikroorganismen bewirkt eine Änderung der Struktur von Vanillin. Es entstehen neue Signale bei 7,10 und 6,90 ppm. Der Peak vom Aldehydproton verschwindet, die Aromatenmuster verändern sich ebenfalls.

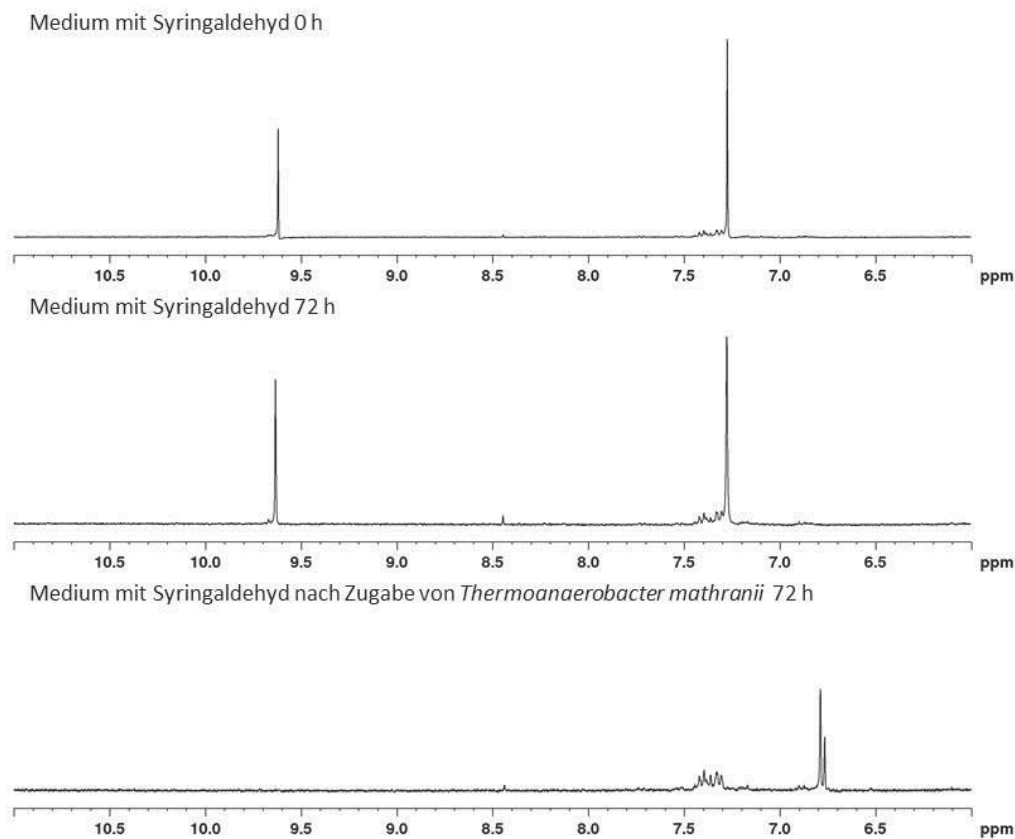


Abbildung 51: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Medium mit Syringaldehyd vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Syringaldehyd nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Syringaldehyd nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

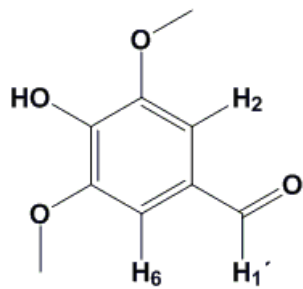


Abbildung 52: Nummerierung der Protonen von Syringaldehyd.

Die Abb. 51 zeigt die Veränderung des Spektrums von Syringaldehyd (Abb. 52) nach der Zugabe von Bakteriensuspension. Die Peaks vom Aldehydproton bei 9,62 ppm und von zwei aromatischen Protonen an der Position 2 und 6 verschwinden, dafür entstehen neue Signale bei 6,78 ppm.

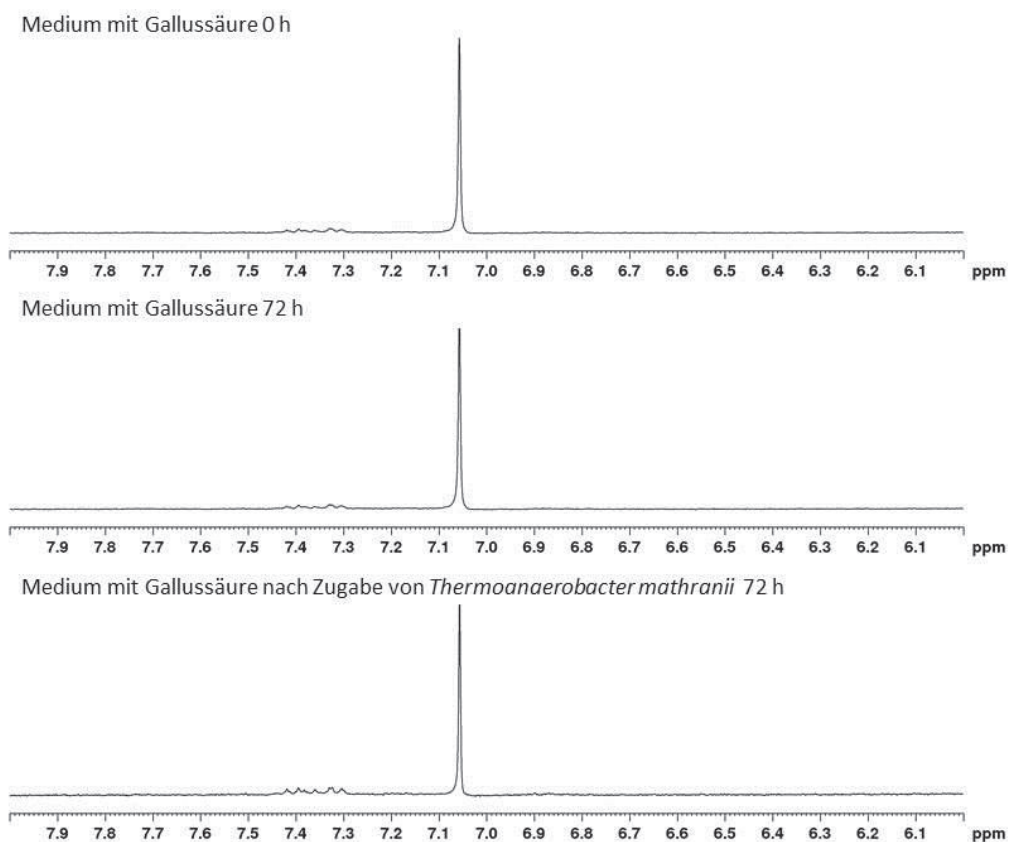


Abbildung 53: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Medium mit Gallussäure vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Gallussäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Gallussäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

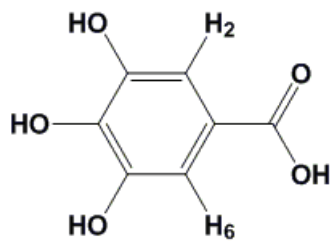


Abbildung 54: Nummerierung der Protonen von Gallussäure.

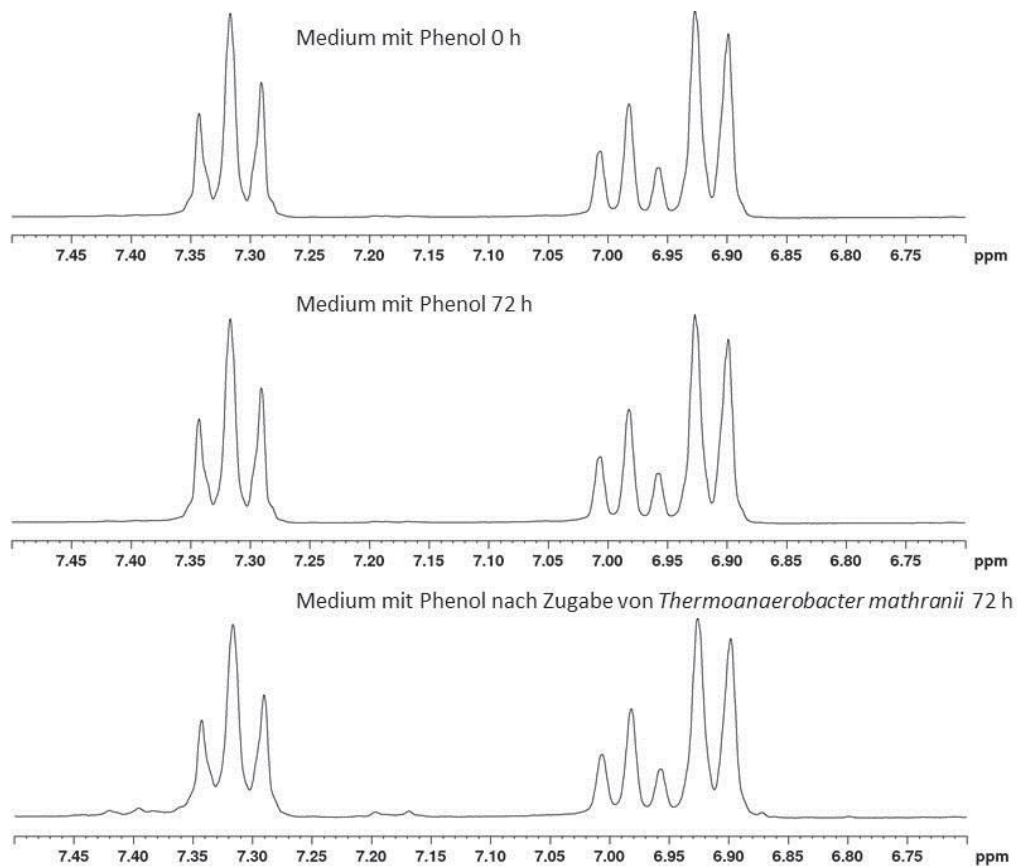


Abbildung 55: <sup>1</sup>H NMR Spektrum (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) von Medium mit Phenol vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Phenol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Phenol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

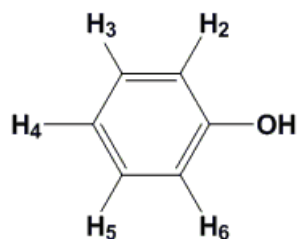


Abbildung 56: Nummerierung der Protonen von Phenol.



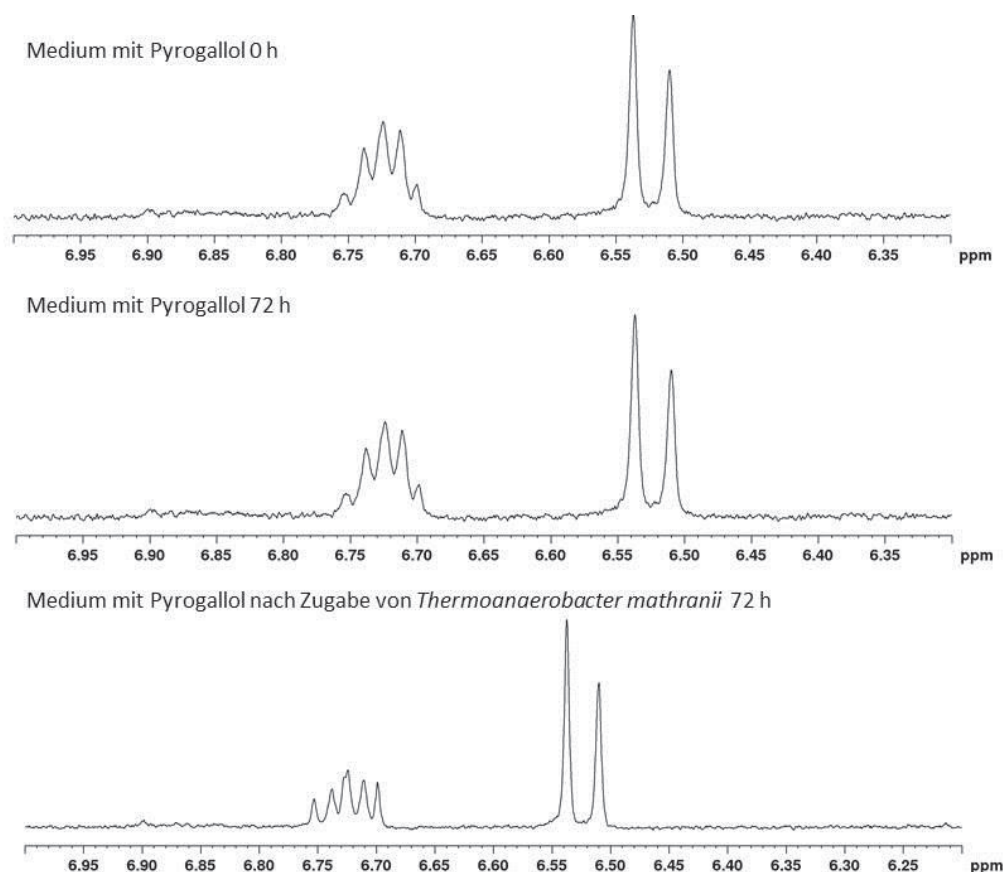


Abbildung 57:  $^1\text{H}$  NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Pyrogallol vor der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (oben), von Medium mit Pyrogallol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Pyrogallol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* (unten).

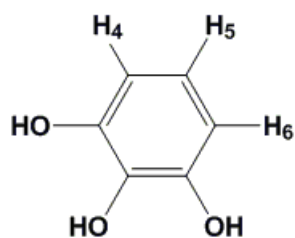


Abbildung 58: Nummerierung der Protonen von Pyrogallol.

Während der Inkubation bei 65 °C veränderten Gallussäure (Abb. 54) (Singlet bei 7,06 ppm), Phenol (Abb. 56) (H-3,5 bei 7,23 ppm, H-4 bei 6,98 ppm und H-2,6 bei 6,91 ppm) und Pyrogallol (Abb. 58) (H-5 bei 6,72 ppm und H-4,6 bei 6,52 ppm) ihre Struktur nicht, auch nach der Zugabe von *Thermoanaerobacter mathranii* blieben diese Substanzen unverändert (Abb. 53, 55, 57). Die Auflösung von Pyrogallol im Spektrum verschlechterte sich nach der Inkubation mit *Thermoanaerobacter mathranii*. Der Grund dafür kann daran liegen, dass das Wachstum der Mikroorganismen zu einer Trübung der Probe führte, wodurch die Auflösung verschlechtert wurde.

Die Umwandlung während der Fermentation von ausgerechnet solchen Substanzen, welche eine inhibierende Wirkung für das Zellwachstum aufweisen (Coniferylaldehyd, Vanillin, Ferulasäure, Syringaldehyd), deutet auf einen chemischen und nicht nur auf einen physikalischen Charakter von in

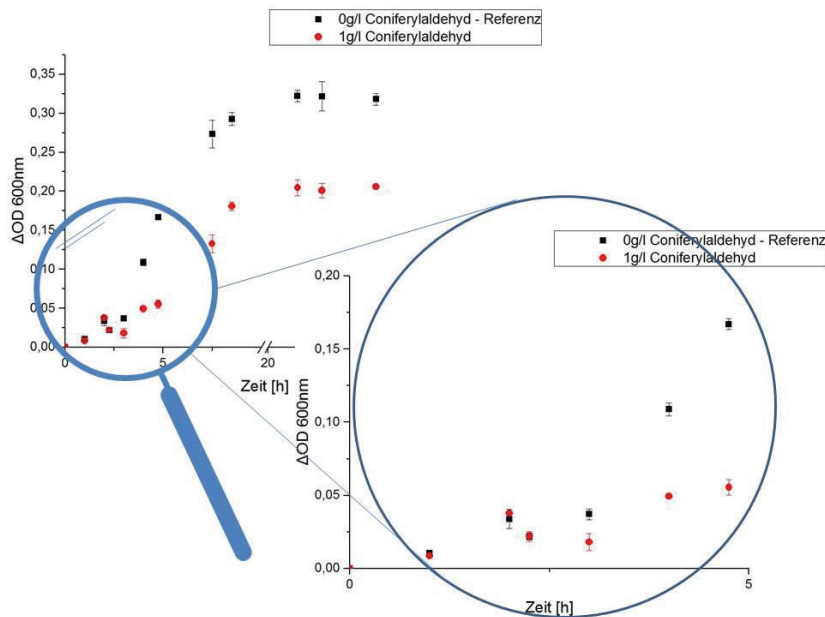
Zellen ablaufenden Vorgängen bei der Wechselwirkung von Phenolen mit lebenden Zellen hin. Es konnte bewiesen werden, dass die Wechselwirkung von Coniferylaldehyd mit *Thermoanaerobacter mathranii* dessen Reduktion zum Coniferylalkohol verursacht.

Für Mikroorganismen untoxische Verbindungen wie Phenol, Pyrogallol und Gallussäure ändern ihre Struktur während der Fermentation nicht. Diese Information beantwortet nicht die Frage, was mit den Verbindungen geschieht, welche das Wachstum von Mikroorganismen positiv beeinflussen.

#### **2.3.4.3. Wachstumsverhalten von *Thermoanaerobacter mathranii* nach der Zugabe von Coniferylaldehyd**

In allen bisherigen Experimenten war von Beginn an ein potentieller Inhibitor im Medium vorhanden. Dies entspricht den realen Bedingungen bei der fermentativen Entzuckerung von Sulfitablauge. Es wäre aber auch interessant zu wissen, wie sich das Wachstumsverhalten bei der plötzlichen Zugabe des Inhibitors zu wachsenden Zellen ändert. Für diesen Versuch wurden zwei 15 ml Röhrrchen mit *Thermoanaerobacter mathranii* für 2 h bei 65 °C inkubiert. Nach 2 h wurde der Kultur in einem Röhrrchen Coniferylaldehyd-haltiges Medium zugegeben, sodass die Coniferylaldehyd-Endkonzentration 1 g/l entsprach. Dem zweiten Röhrrchen wurde die gleiche Menge an Medium ohne Coniferylaldehyd zugegeben, um den durch die Verdünnung entstandenen OD Unterschied zwischen beiden Röhrrchen auszugleichen. Aus den OD Werten wurden die Wachstumskurven beider Proben erstellt.

Die Darstellung der Wachstumskurven (Abb. 59) zeigt, dass die Mikroorganismen in beiden Röhrrchen in den ersten zwei Stunden gleich gut wachsen. Aufgrund der Verdünnung der Proben durch die Zugabe von Medium, bzw. Medium mit Coniferylaldehyd sinkt  $\Delta OD$  beider Proben. Nach einer kurzen Zeit steigt  $\Delta OD$  von der Probe mit Medium. Die Zugabe von Inhibitor bewirkt eine weitere Senkung der Zelldichte, erst eine Stunde später wachsen die Bakterien weiter. Die Zelldichte erreichte aber nicht die Werte der Probe ohne Zugabe von Coniferylaldehyd. Das Wachstum der Kultur mit Inhibitor war um 35 % niedriger.



**Abbildung 59: Wachstumverhalten von *Thermoanaerobacter mathranii* nach der Zugabe von Coniferylaldehyd.**

Im Kapitel 2.3.3. Teil I wurde die Wirkung von Coniferylaldehyd auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii* untersucht. Dafür wurde eine Zellsuspension dieses Stamms in ein 1 g/l Coniferylaldehyd enthaltendes Medium injiziert. Die Wachstumsrate der Bakterienkultur sank dadurch um mehr als die Hälfte. Die Zugabe von Coniferylaldehyd ins Medium mit wachsender Bakterienkultur verringerte ihr Wachstum um 35 %. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass sich die Bakterienkultur während der Zugabe des Inhibitors in der Wachstumsphase befanden, weswegen sie besser wuchsen als im Versuch mit der Zugabe von Kultur ins Medium, in welchem Coniferylaldehyd schon vorhanden war. In letzterem Fall befanden sich die Zellen noch im zusätzlichen Stress durch die Überimpfung.

## 2.4. Entgiftung der Sulfitablaue durch verschiedene Vorbehandlungstechniken

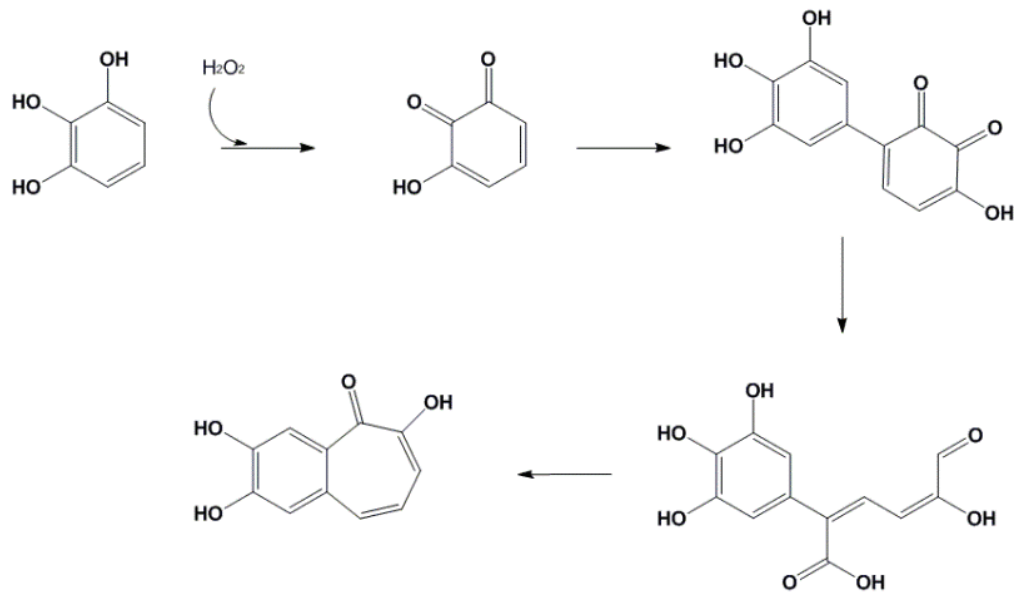
Mehrere Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Nutzung von Zuckern aus der Sulfitablaue als Substrat für die ABE-Produktion. Verschiedene Entgiftungsverfahren der Abblauge ermöglichen eine bessere Fermentation durch die Abtrennung von hemmenden Substanzen. In dieser Arbeit wurden Vorbehandlungen der Sulfitablaue mit Peroxidase, Ionenaustauscher, Aktivkohle, Lignin und Alkalibehandlung getestet.

### 2.4.1. In situ <sup>1</sup>H NMR Vorversuche mit Peroxidase

Im Kapitel 1.4.1. Teil I wurden Methoden zur Entfernung von Phenolen aus lignozellulosehaltigen Ablaugen mit Enzymen beschrieben, welche in der Natur Lignin abbauen. In der vorliegenden Arbeit wurde Wasserstoffperoxid für die Entgiftung und Peroxidase aus Meerrettich als Katalysator eingesetzt.

Die Reaktion von Pyrogallol mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase ist eine bekannte Reaktion zur Bestimmung der Aktivität der Peroxidase. Diese Reaktion (Abb. 60) führt zur Bildung eines Hydroxychinones, seiner Dimerisierung und schließlich der Umwandlung in den Farbstoff

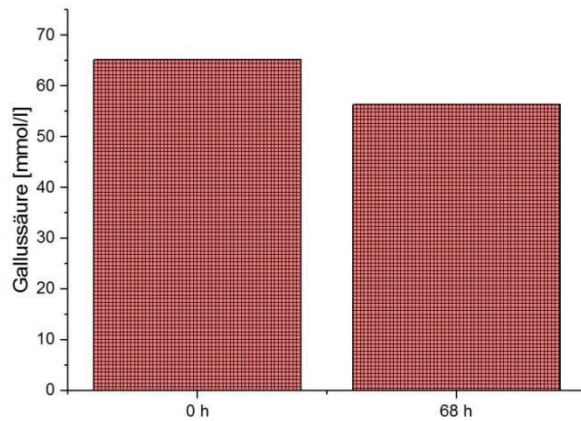
Purpurogallin (Tauber 1953; Miyazaki et al. 2004). Einen ähnlichen Mechanismus haben auch andere Reaktionen von Phenolen aus der Lignozellulose.



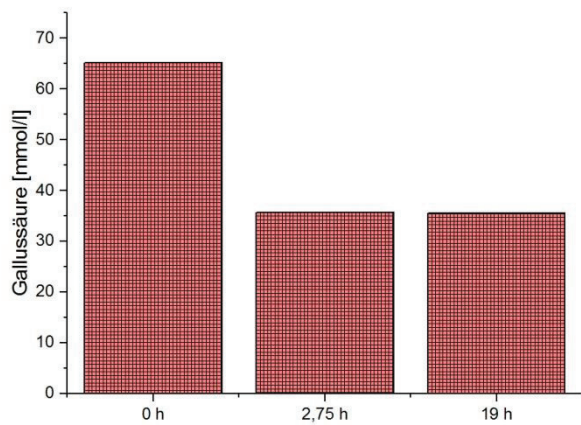
**Abbildung 60: Reaktion von Pyrogallol mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase.**

Für die Optimierung der Entgiftung mit Peroxidase wurde diese in einem NMR Röhrchen durchgeführt und mittels <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie untersucht. Als Modellsubstanzen wurden Gallussäure und Coniferylaldehyd eingesetzt. Gallussäure weist eine hohe Wasserlöslichkeit auf, daher kann man mit konzentrierten Lösungen arbeiten. Die Spektren von Gallussäure sind sehr einfach zu interpretieren, da sie aus einem einzigen Singlet bei 7,11 ppm bestehen (Abb. 30). Das alles ist für die Auswertung von <sup>1</sup>H NMR Spektren von Vorteil, vor allem bei der Arbeit auf einem Niederfeld NMR Spektrometer. Nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid und Peroxidase wurde eine Konzentrationsabnahme der Gallussäure beobachtet, welche durch die Verwendung eines internen Standards (DSS) quantifiziert werden konnte.

Die Untersuchung der Konzentrationsänderung von Gallussäure im ersten Versuch zeigt, dass der Gehalt an Gallussäure nur geringfügig sinkt (Abb. 61). Dies kann an der nicht ausreichenden Menge an Peroxidase liegen. Im zweiten Versuch wurde eine fast dreifache Konzentration an Peroxidase verwendet (Abb. 62).

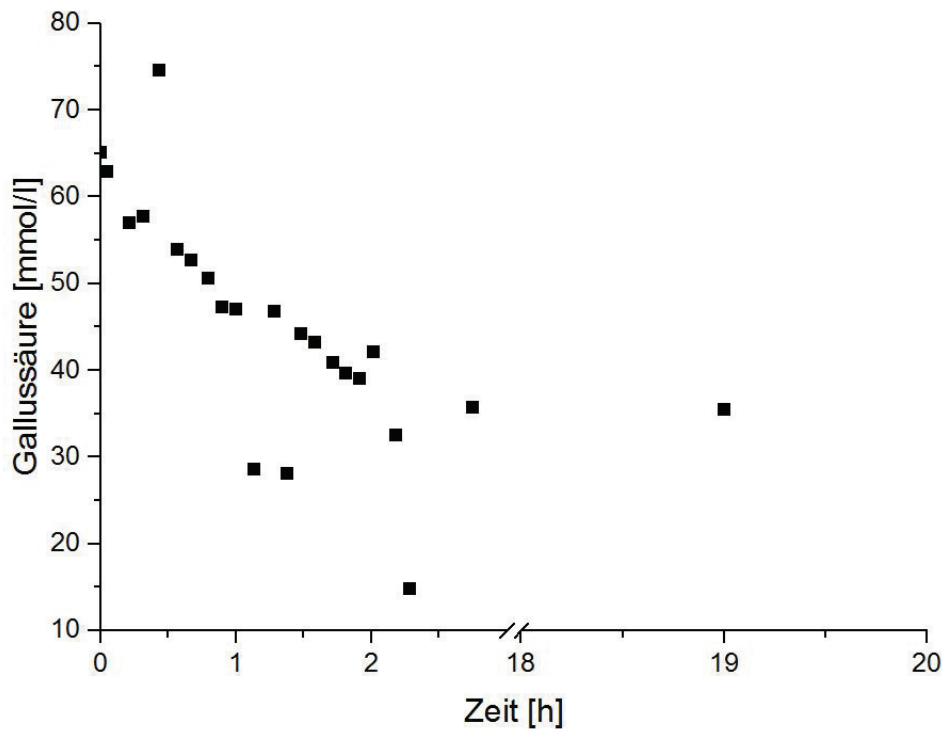


**Abbildung 61:** Abnahme der Gallussäurekonzentration nach Zugabe von 120000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Abbildung 62:** Abnahme der Gallussäurekonzentration nach Zugabe von 345000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Abbildungen 62 und 63 zeigen die Konzentrationsabnahme der Gallussäure während der Zugabe von Wasserstoffperoxid. In den ersten 2,75 h wurde die Konzentration der Gallussäure in kurzen Zeitabständen gemessen. Nach 19 h wurde die Konzentration zum letzten Mal bestimmt. Dieser Wert unterscheidet sich nicht wesentlich von dem Wert nach 2,75 h. Daraus folgt, dass die Reaktion innerhalb der ersten 3 h beendet ist.



**Abbildung 63: Abnahme von Gallussäure Konzentration während der Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von 345000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

In situ <sup>1</sup>H NMR Messungen auf einem 44 MHz NMR Spektrometer zeigen eine Abnahme der Gallussäure in der Lösung nach der Zugabe von Peroxidase und Wasserstoffperoxid, es entstanden aber keine weiteren Signale. Um herauszufinden, ob tatsächlich keine neuen Peaks entstanden sind oder ob diese bei der Messung mit 44 MHz nicht sichtbar sind, wurden zwei <sup>1</sup>H NMR Messungen auf einem 300 MHz Spektrometer durchgeführt. Die Abbildung 66 zeigt die <sup>1</sup>H NMR Spektren einer Probe mit Gallussäure nach der Zugabe von Peroxidase und von derselben Probe nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid nach 20 h. Die Peaks bei 0,00; 0,61; 1,77 und 2,92 ppm wurden DSS zugeordnet. Das Signal bei 4,80 ppm ist der Wasserpeak. Der Peak bei 7,11 ppm stammt von der Gallussäure. 20 h nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid nimmt das Signal der Gallussäure ab. Es entstehen keine neuen Peaks. Nach Mayer et al. bildet sich durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid aus Gallussäure ein Dimer (Abb. 64), welches dann rasch in Ellagsäure übergeht (Mayer et al. 1984). Diese ist schlecht im Wasser löslich und daher im Spektrum nicht sichtbar. Die Abbildung 65 zeigt den Niederschlag, welcher nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid in der Lösung von Gallussäure und Peroxidase ausfällt.

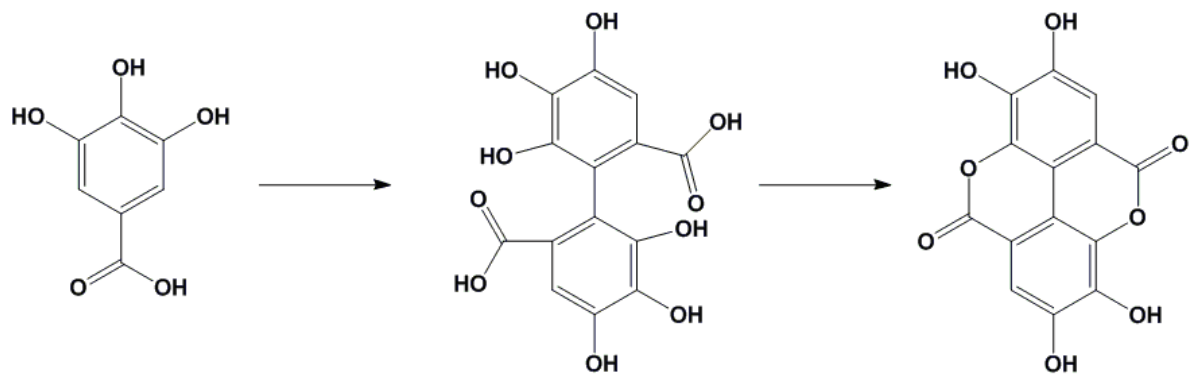


Abbildung 64: Reaktion von Gallussäure mit Wasserstoffperoxid in Abwesenheit von Peroxidase.

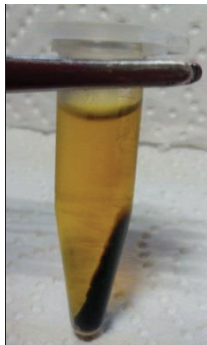


Abbildung 65: Die Lösung von Gallussäure und Peroxidase färbt sich braun nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid, nach Zentrifugieren ist dieser Niederschlag deutlich sichtbar.

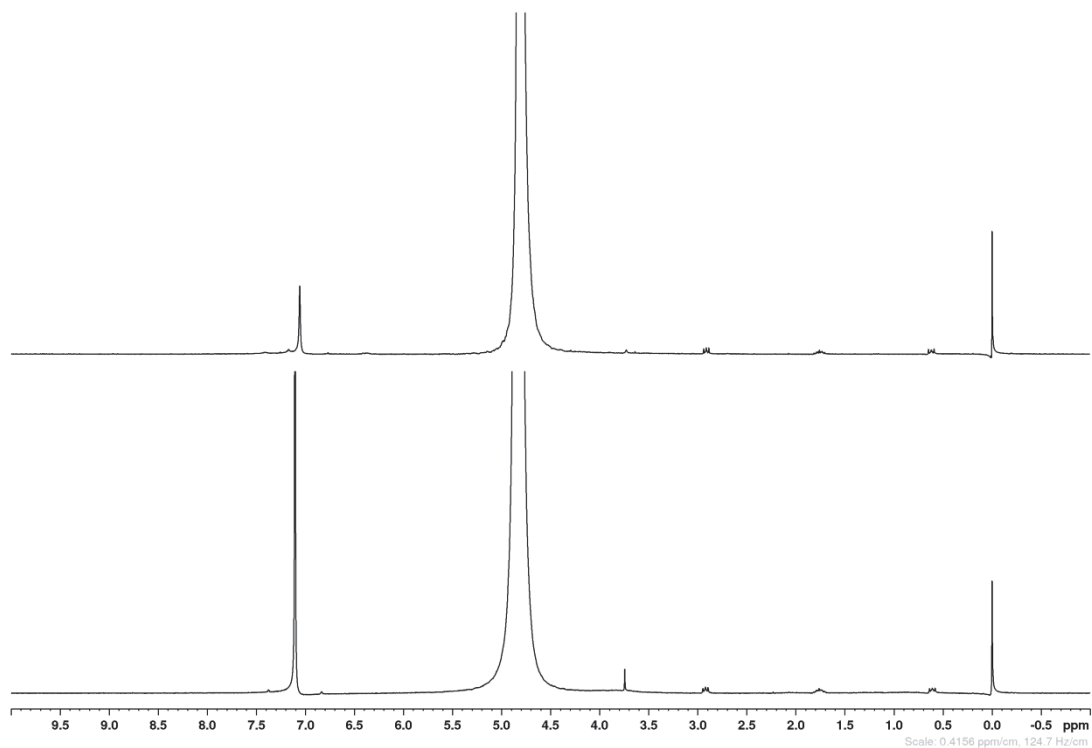
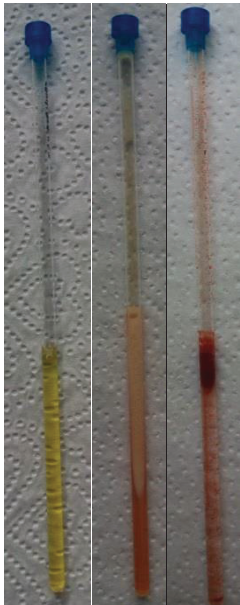


Abbildung 66: Vergleich der  $^1\text{H}$  NMR Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Gallussäure mit Peroxidase vor (unten) und nach 19 h nach der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (oben).

Gallussäure ist eine für die Mikroorganismen harmlose Verbindung. Die im Kapitel 2.1.1. Teil I beschriebenen Experimente zeigen, dass Coniferylaldehyd die stärkste Hemmwirkung auf die Zellen zeigt. Aus diesem Grund wurde der Versuch der Abbaureaktion mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase in einem NMR Röhrchen auch mit Coniferylaldehyd wiederholt. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid zur Lösung aus Coniferylaldehyd und Peroxidase bewirkte zuerst eine rosa Färbung der Lösung und dann einen Ausfall eines rosa Niederschlags (Abb. 67). In der Abb. 69 ist der Abbau von Coniferylaldehyd dargestellt. Die Peaks bei 2,91; 1,76; 0,62 und 0,00 ppm sind DSS Signale, der große Peak bei 4,78 ppm stammt von Wasser. Die restlichen Signale bei 9,46; 7,64; 7,28; 7,22; 6,94; 6,64 und 3,89 ppm stammen von Coniferylaldehyd. Nach weniger als einer Stunde sind im Spektrum keine Coniferylaldehydsignale mehr sichtbar.

Ähnlich wie bei der Gallussäure entstehen durch die Reaktion von Coniferylaldehyd mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase unterschiedliche Dimere (Abb. 70), welche vermutlich weiter reagieren. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit sind sie im NMR Spektrum nicht sichtbar (Ito et al. 2002).



**Abbildung 67: Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase (links), Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase nach 14 min nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid (mitte), Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase nach 50 min nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid.**



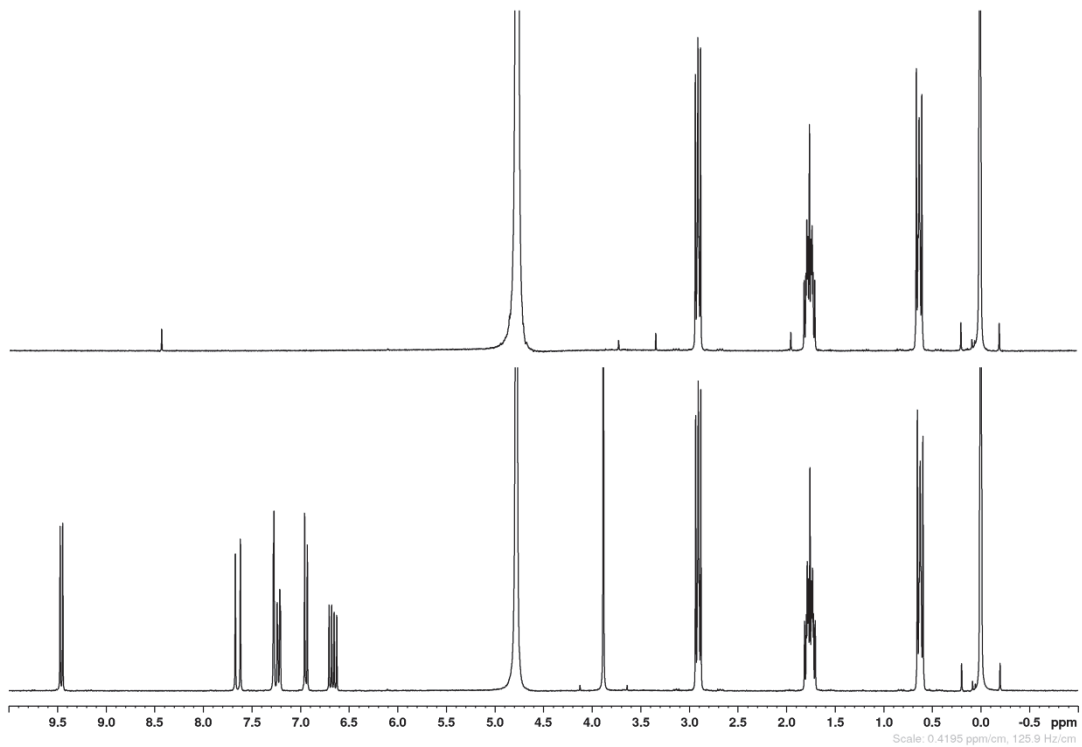


Abbildung 68: Vergleich der  $^1\text{H}$  NMR Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Coniferylaldehyd mit Peroxidase vor (unten) und 50 min nach der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (oben).

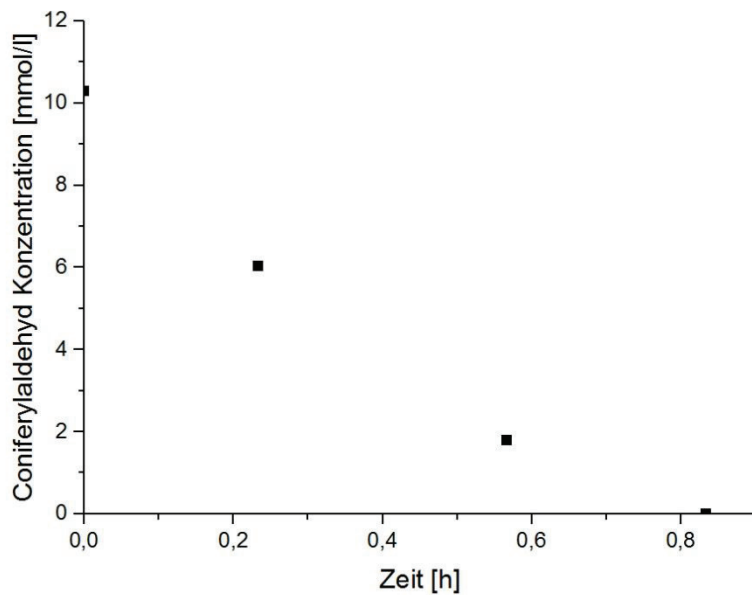


Abbildung 69: Abnahme von Coniferylaldehyd Konzentration während der Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase.

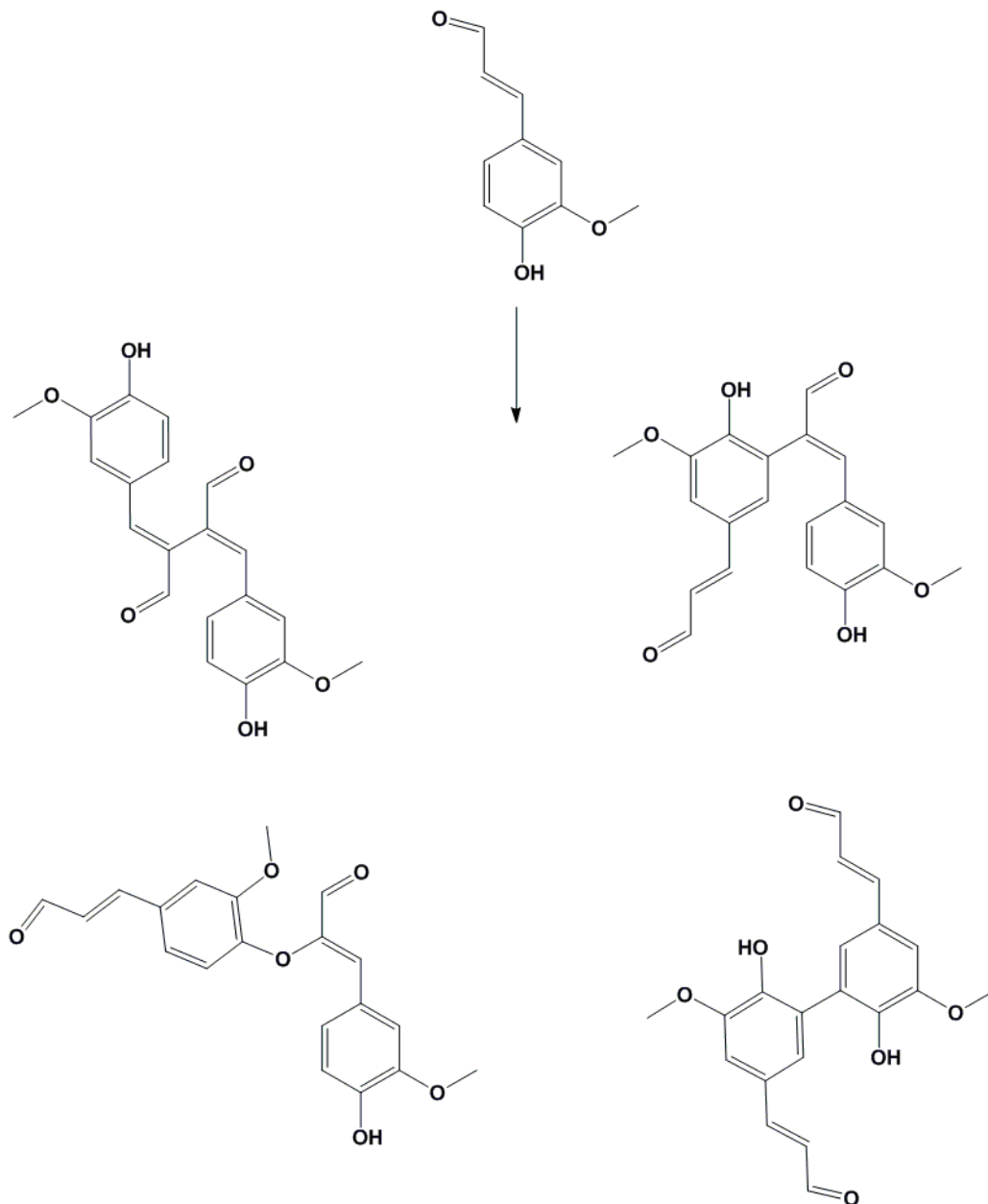


Abbildung 70: Reaktion von Coniferylaldehyd mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase.

Es wurde angenommen, dass Wasserstoffperoxid mit Peroxidase als Katalysator eine ähnliche Wirkung auf alle Phenole aus lignocellulosischen Substraten hat. Die oben beschriebene Methode wird für die Reduktion der aromatischen Substanzen aus der Sulfitablauge verwendet.

#### 2.4.2. Analyse von Zucker aus der Sulfitablauge

Nach der Entgiftung soll die Sulfitablauge als Zuckerquelle für die Fermentation von *Clostridium saccharoperbutylaceticum* verwendet werden. Es wurde nicht nur die pure Abflauge mit dem Trockengehalt (TG) 15 % verwendet, sondern auch Abflauge, welche unterschiedlich stark verdünnt wurde. Die Zuckerkonzentration in den verdünnten und unverdünnten Proben musste gleich bleiben, da sonst Zellwachstumsunterschiede wegen der unterschiedlichen Zuckergehalte der Verdünnungen möglich wären. Um das zu verhindern, war es notwendig, den Zuckergehalt der Sulfitablauge zu bestimmen. Die benötigten Medien konnten so auf die Zuckerkonzentration wie die Abflauge

eingestellt werden. Die chromatographische Analyse ergab, dass die Ablauge folgende Zucker enthält: 1,4 mg/l Arabinose; 2,9 mg/l Galaktose; 6,8 g/l Glukose; 20,1 mg/l Mannose und 8,0 mg/l Xylose.

### **2.4.3. Prüfung von verschiedenen Vorbehandlungstechniken auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum***

Um die effektivste Methode zur Abtrennung von inhibierenden Substanzen zu ermitteln und die beste Fermentation zu erreichen, wurden verschiedene Entgiftungen der Sulfitablauge getestet. Dafür wurde das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum* nach Zugabe von verschiedenen Mengen von Sulfitablauge untersucht, welche davor mit Peroxidase bzw. Ionenaustauscher, Aktivkohle, Lignin und Metallhydroxiden vorbehandelt wurde. Das Wachstum wurde durch die  $\Delta OD$  Messungen der Bakteriensuspension ermittelt und mit dem Wachstum im Medium mit den Zuckern (die Zuckerkonzentration entspricht der Konzentration in der Sulfitablauge) verglichen. Es wird angenommen, dass  $\Delta OD$  von der Kultur im zuckerhaltigen Medium 100 % entspricht.

Der Vergleich dieser Techniken zeigt, dass die Vorbehandlung mit Peroxidase die effektivste Methode zur Entgiftung der Ablauge ist (Abb. 71). Die Vorbehandlungen mit Lignin und Aktivkohle zeigen auch gute Ergebnisse (Abb. 73 und 74). Die Wirkung von Ionenaustauschern ist weniger bedeutend, wobei die Vorbehandlung mit Anionenaustauscher bessere Resultate als mit Kationenaustauscher liefert (Abb. 72). Der Vergleich der alkalischen Vorbehandlungen zeigt, dass die Behandlung mit Calciumhydroxid effektiver als die Behandlung mit Ammoniumhydroxid und Magnesiumhydroxid wirkt. Die Zugabe von Magnesiumhydroxid zeigt fast keine positive Auswirkung auf die Zelldichte gegenüber der unbehandelten Ablauge (Abb 75).

Diese Ergebnisse passen gut in das Bild, das die Literaturstudie zu diesem Thema ergab. Der hohe Wirkungsgrad der Vorbehandlung mit Peroxidase ist mit einer sehr selektiven enzymatischen Entfernung von Aromaten erklärbar, welche besonders toxisch auf die Mikroorganismen wirken. Bei diesem Vorgang werden die Zucker in der Ablauge nicht abgebaut. Die Vorbehandlung mit Lignin und Aktivkohle entfernt ebenso die störenden Phenole, wobei die Zucker unverändert bleiben. Diese Methoden gehören zu den wirksamsten Entgiftungstechniken.

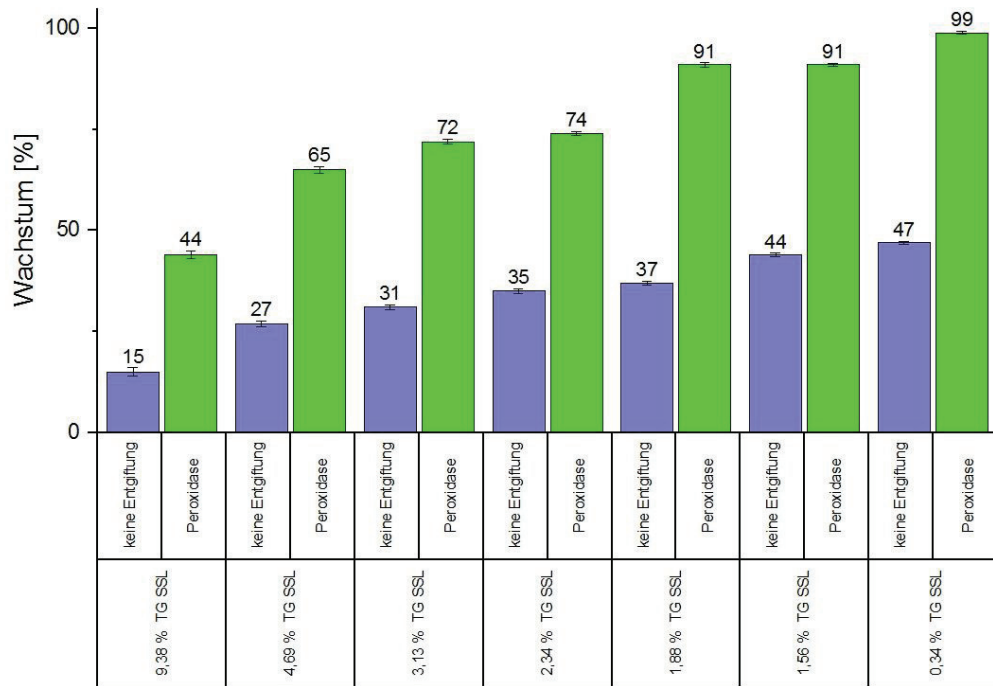


Abbildung 71: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von nicht entgifteter sowie durch Peroxidase entgifteter Sulfitablage (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.

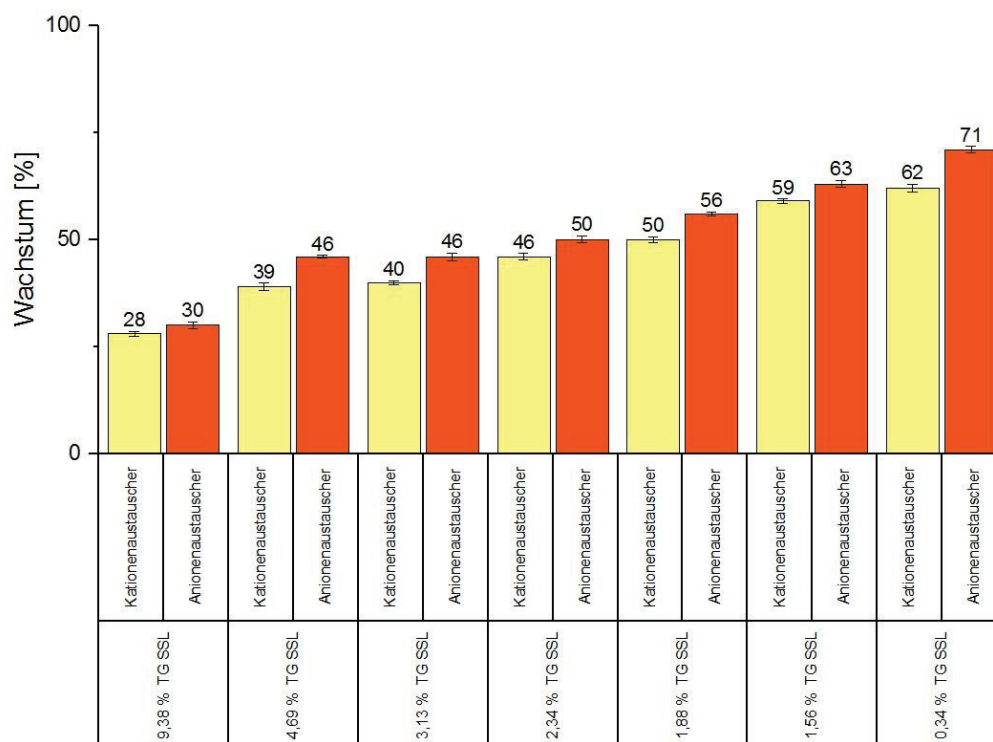


Abbildung 72: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Ionenaustauscher entgifteter Sulfitablage (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.

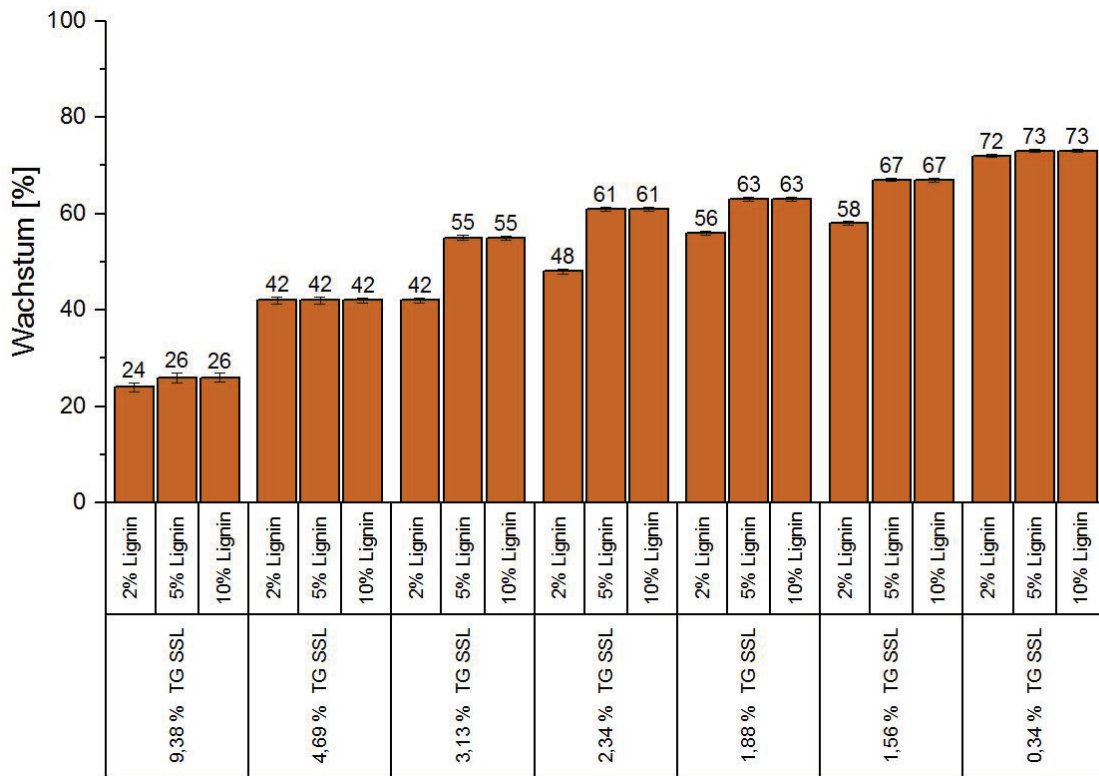


Abbildung 73: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Lignin entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfit Liquor) auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

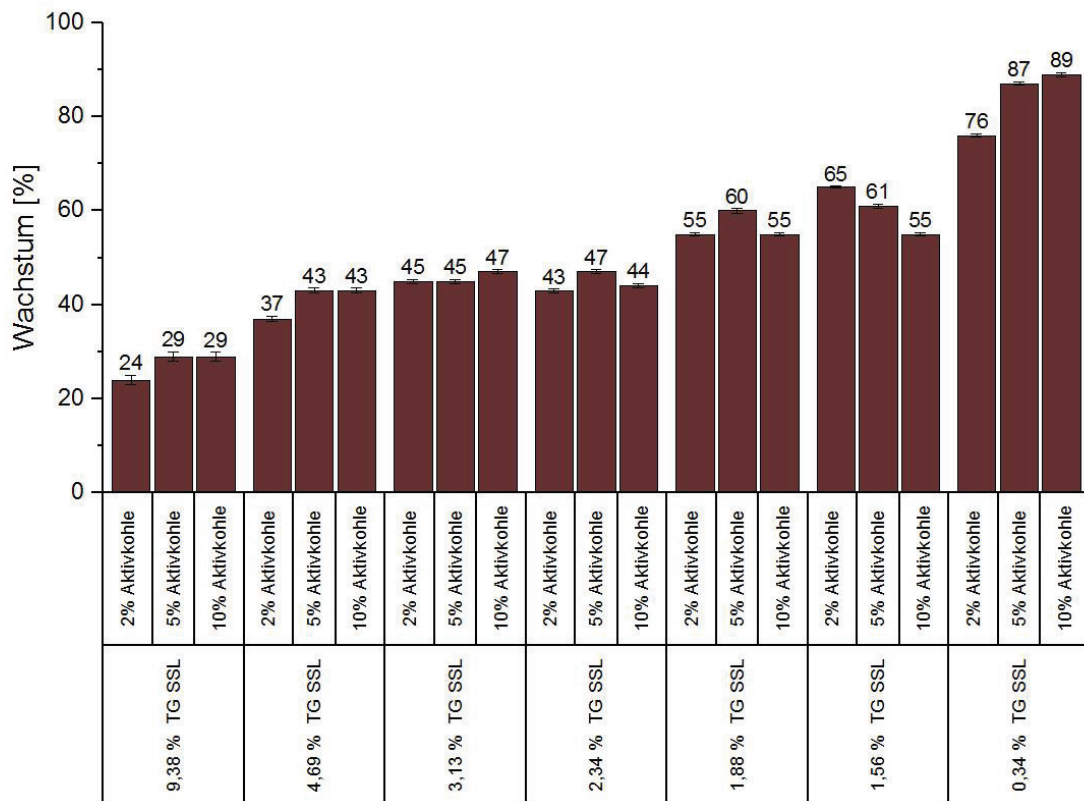


Abbildung 74: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Aktivkohle entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfit Liquor) auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

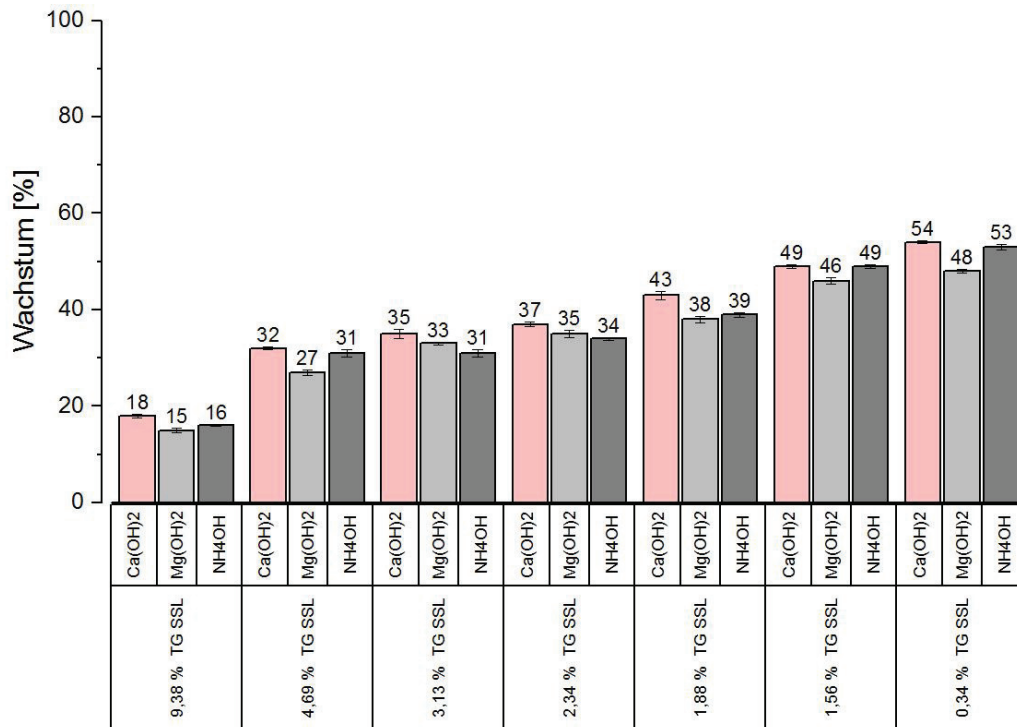


Abbildung 75: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Alkalivorbereitung entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfit Liquor) auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylaceticum*.

## Teil II:

Bestimmung von  $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels Flüssig  
 $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie

## 1. Einleitung und Theorie

### 1.1. Viskoseprozess

Bevor der Zellstoff dem Viskoseprozess unterworfen wird, muss er gebleicht werden. Ligninreste und andere unerwünschte Stoffe werden mit Ozon oder Wasserstoffperoxid sowie Chlor, Chlordioxid und Hypochlorit entfernt. (Rydholm 1965; Sixta 2006).

Zur Viskoseherstellung wird Zellstoff mit Natronlauge behandelt, wobei Alkalizellulose entsteht. Die Alkalizellulose wird dann mit Schwefelkohlenstoff umgesetzt. Bei dieser Sulfidierung entsteht Zellulosexanthogenat, welches im nächsten Schritt in Natronlauge gelöst wird. Die erhaltene honigartige orangegelbe Zellulosexanthogenatlösung wird Viskose genannt. Die Viskose wird danach einem Reifeprozess unterworfen, wobei eine partielle Umxanthogenierung bei einer Abnahme der Anzahl der Xanthogenatgruppen an Zellulose stattfindet. Diese strukturellen Veränderungen der Zellulose führen zu Änderungen vieler ihrer Eigenschaften wie Löslichkeit, Viskosität, Filtrierbarkeit und Spinnbarkeit (die Ursache ist bis jetzt noch nicht bekannt) und können durch Bestimmung des  $\gamma$ -Wertes (definiert als Anzahl der Xanthogenatgruppen pro 100 Anhydroglukoseeinheiten) überwacht werden. Schließlich wird die Viskoselösung durch Spinndüsen in schwefelsäurehaltige Spinnbäder mit Salzzusätzen gepumpt. Aus der Viskose entstehen feste Fäden aus fast reiner Zellulose. Diese werden als Viskosefasern bezeichnet (Endres und Siebert-Raths 2011; Götze 1967; Lundberg und Turbak 1984; Rogovin 1982).

Nach dem Spinnen werden die Viskosefasern gestreckt. Dadurch richten sich die Polymerketten parallel zur Faserrichtung aus, was ihre Festigkeit wesentlich erhöht. Die gestreckten Fasern werden mehrere Male gereinigt. Danach werden sie mit Hypochlorit oder Peroxid gebleicht. Um die Verarbeitungseigenschaften der Viskose zu verbessern, wird eine Avivagelösung auf die Fasern aufgetragen, diese enthält Fettsäurederivate, Silikonöle und andere Zusätze. Schließlich wird das fertige Produkt getrocknet (Abb. 76).

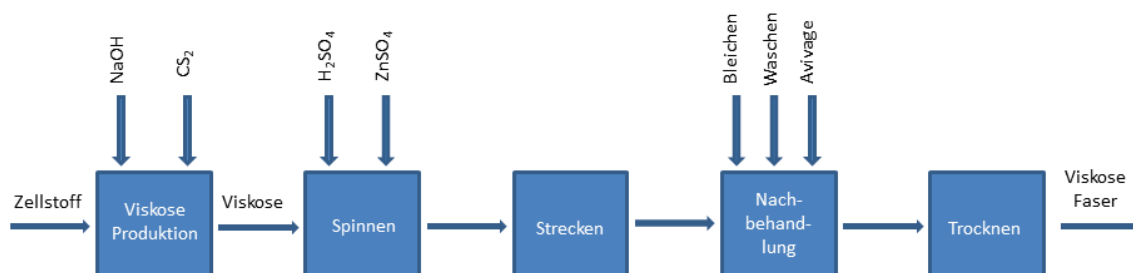


Abbildung 76: Schema des Viskoseprozesses.



## 1.2. Bestimmung von $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels NMR Spektroskopie

In diesem Teil der Arbeit werden der schon oben erwähnte Reifevorgang im Viskoseprozess (Kapitel 1.1. Teil II) und die Möglichkeiten zu seiner Überwachung durch Bestimmung des  $\gamma$ -Wertes von Viskose beschrieben.

Wie in Abbildung 77 gezeigt ist, besitzt jede Anhydroglukoseeinheit drei Hydroxylgruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die Substitution an der zweiten und der dritten Position des Moleküls ist kinetisch bevorzugt, während die Substitution an der sechsten Position sterisch begünstigt ist. Das Substitutionsmuster verändert sich während des Reifevorgangs, die Xanthogenatgruppen an der zweiten und der dritten Position spalten sich ab, in der Regel nimmt die Gesamtzahl der Substituenten ab. Es entsteht eine relativ homogen substituierte Verbindung mit Xanthogenatgruppen an der sechsten Position (Gelb et al. 1980; Gelb et al. 1982; Reuben 1984, 1986, 1986, 1987, 1987; Richardson und Gorton 2003).

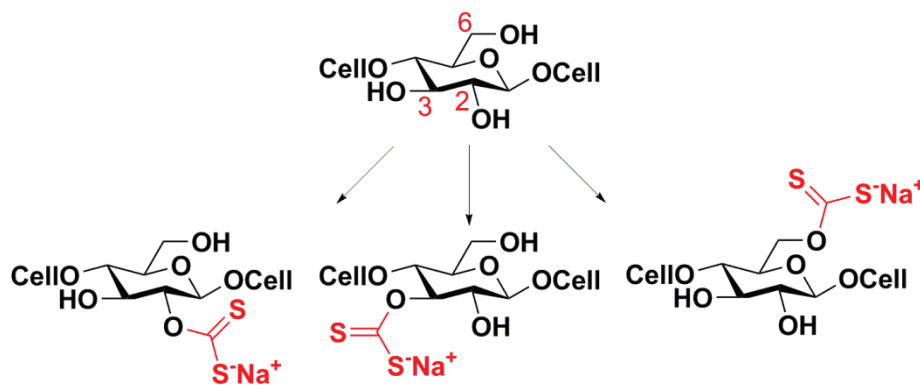


Abbildung 77: Xanthogenatgruppen der Viskose an drei verschiedenen Positionen der Anhydroglukoseeinheit.

Der  $\gamma$ -Wert und die Verteilung von Xanthogenatgruppen gehören zu den entscheidenden Prozessparametern in der Viskosefaserherstellung, daher existieren mehrere relativ schnelle Verfahren für ihre Ermittlung. Die momentan angewandten klassischen Methoden für die Bestimmung des  $\gamma$ -Wertes sind iodometrische Titration, UV und IR Spektroskopie, diese geben aber keine Auskünfte über die Substituentenverteilung (Baldinger et al. 2003; Dominiak 2010; Lanieri et al. 2014; Zellcheming Merkblatt 1972). Die NMR Spektroskopie hat zudem ein Potential für die Bestimmung von Substitutionsmustern und wurde bisher für diesen Zweck verwendet (Tab. 13).

**Tabelle 13: Überblick der wichtigsten NMR Methoden zur Bestimmung von Xanthogenatgruppenverteilung der Viskose.**

	(Kamide et al. 1987)	(König et al. 1993)	(Schwaighofer et al. 2011)	(Dominiak et al. 2011)	Diese Arbeit
<b>Stabilisierung mit</b>	keine	keine	Allylbromid	N,N-Diethyl-acetamid oder Benzylbromid	4-Methyl-benzylbromid
<b>zusätzliche Derivatisierung der freien OH-Gruppen</b>	keine	keine	Acetylierung mit Ac <sub>2</sub> O	keine	keine
<b>NMR</b>	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
<b>Ermittlung</b>	entsprechende Peakflächen-Verhältnisse für γ <sub>2</sub> + γ <sub>3</sub> , γ <sub>6</sub>	entsprechende Peakflächen-Verhältnisse für γ <sub>2</sub> + γ <sub>3</sub> , γ <sub>6</sub>	Dekonvolution der Peakflächen der Acetylgruppen	Verhältnisse der Peakflächen der stabilisierten Gruppen für γ <sub>2</sub> , γ <sub>3</sub> , γ <sub>6</sub>	Dekonvolution der Peakflächen der Benzylgruppen
<b>Merkmale</b>	schlechtes S/N Verhältnis, Ungenauigkeit wegen geringer Unterschiede zwischen den Peakflächen lange Messzeiten keine Differenzierung zwischen γ <sub>2</sub> und γ <sub>3</sub> unstabilisierte Proben → Änderung des Substitutionsmusters während der Analyse	Verbesserung der Empfindlichkeit durch Verwendung von <sup>13</sup> C-markiertem Zellulose-xanthogenat Keine Differenzierung zwischen γ <sub>2</sub> und γ <sub>3</sub> unstabilisierte Proben → Änderung des Substitutionsmusters während der Analyse	kurze Messzeiten (30-60 min) geeignet für industrielle Proben mit relativ niedrigem γ-Wert keine Differenzierung zwischen γ <sub>2</sub> und γ <sub>3</sub> zusätzlicher Derivatisierungsschritt Löslichkeitsprobleme wegen unvollständiger Acetylierung	lange Messzeiten (bis zu 24 h) Löslichkeitsprobleme mit Diethyl-acetamid derivatisierten Proben, nicht mit Benzylbromid stabilisierten Proben	kurze Messzeiten (ca. 10 min) geeignet für industrielle Proben mit relativ niedrigem γ-Wert

Die Arbeitsgruppe von Kamide untersuchte mittels <sup>13</sup>C NMR die Zellulosexanthogenatproben in einer Lösung von Natriumhydroxid in D<sub>2</sub>O während des Reifevorgangs. Trotz langen Messzeiten war das Signal-Rausch-Verhältnis sehr schlecht und die Unterschiede zwischen einzelnen Peakflächen sehr gering. Der größte Nachteil dieser Methode ist die Veränderung der Probe während der Messung (Kamide et al. 1987). König et al. xanthogenierten Alkalizellulose mit <sup>13</sup>C angereichertem Schwefelkohlenstoff und charakterisierten mittels <sup>13</sup>C NMR die Anfangssubstitution und den früheren Reifungszustand des <sup>13</sup>C-markierten Zellulosexanthogenat. Auch bei ihnen trat das Problem der Musteränderung der Substituenten während der Analyse auf (König et al. 1993). Somit kann das

Zellulosexanthogenat nicht direkt in der Lösung untersucht werden, da die instabilen Viskoseproben während der Messung ihre Zusammensetzung ändern. Eine gute Lösung für dieses Problem ist die Stabilisierung von Xanthogenatgruppen auf der Zellulosekette durch die Umsetzung mit Halogenalkanen. Allerdings führte in früheren Versuchen die Substituentenstabilisierung mit Allylbromid im ersten Schritt, die Acetylierung von restlichen freien Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid im zweiten Schritt und die anschließende  $^1\text{H}$  NMR Analyse (Schwaighofer et al. 2011) zu keinen schlüssigen Ergebnissen. Neben einer erfolglosen Differenzierung zwischen der Xanthogenierung an der zweiten und der dritten Position traten teilweise Probleme mit der Löslichkeit der substituierten Proben auf, da die Acetylierung unvollständig war. Eine andere Methode, bei der Benzylbromid als Stabilisierungsmittel eingesetzt wurde und die Proben mittels  $^{13}\text{C}$  NMR charakterisiert wurden (Dominiak et al. 2011), überwand alle diese Nachteile, erforderte jedoch sehr lange Messzeiten (ca. 24 h).

Somit war das Ziel dieser Arbeit eine neue Methode zur Bestimmung des  $\gamma$ -Wertes und insbesondere der Verteilung der Xanthogenatgruppen der Viskose zu entwickeln, wobei die weniger zeitraubende  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie verwendet werden sollte. Als Stabilisierungsmittel wurde 4-Methylbenzylbromid gewählt, da die  $^1\text{H}$  NMR Signale des aromatischen Ringes und der Methylgruppe nicht mit dem Kohlenhydratbereich des Polymers überlappen. Es stellte sich zusätzlich heraus, dass die damit stabilisierten Proben eine ausreichende Löslichkeit aufweisen und dass 4-Methylbenzylbromid einfacher zu handhaben ist als Methylbenzylbromid, da Letzteres ein stark tränenreizender Stoff ist.

Zur Vermeidung aller Probenvorbereitungsschritte, welche zu Schwierigkeiten des Analysevorganges oder sogar zur Veränderung der Probe führen könnten, sollte die Stabilisierung ohne Abweichungen vom Herstellungsprozess durchgeführt werden. Das bedeutet, die Reaktion sollte bei pH 13-14 ablaufen. Die Vorversuche zeigten, dass 4-Methylbenzylbromid eine hohe Reaktivität unter stark alkalischen Bedingungen aufweist, denn 4-Methylbenzylbromid reagiert nicht nur mit Xanthogenatgruppen, sondern auch mit den freien Hydroxylgruppen der Zellulose. Die letztere Reaktion ist eindeutig unerwünscht, da sie zur fehlerhaften Zuordnung der Protonensignale führt. Folglich wurde eine Modellreaktion zwischen Cellobiose und 4-Methylbenzylbromid bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um die Derivatisierungsbedingungen zu optimieren. Cellobiose stellt den Grundbaustein der Zellulose da. Sie besteht aus zwei  $\beta$ -Glukose-Einheiten, welche durch eine  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) Bindung miteinander verknüpft sind. Daher wird sie häufig als Modellsubstrat für Zellulose verwendet. Die Aufgabe war den niedrigsten pH-Wert zu identifizieren, bei dem die Hydroxylgruppen der Cellobiose anfangen mit 4-Methylbenzylbromid zu reagieren. Dabei wurde die Annahme getroffen, dass die Reaktivität der OH-Gruppen der Cellobiose ähnlich oder sogar höher ist als jene der OH-Gruppen der Zellulose.

## 2. Resultate

### 2.1. Synthesen

Das Zellulosexanthogenat ist eine sich leicht zersetzende Verbindung. Das erschwert ihre Analyse und verfälscht die Ergebnisse. Um eine während der NMR-Analyse stabile Substanz zu erhalten, mussten alle Xanthogenatgruppen stabilisiert werden. Dafür wurden verschiedene Derivatisierungsmethoden ausprobiert.

#### 2.1.1. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid und Acetylierung mit Acetylchlorid

Schwaighofer et al. stabilisierten das Zellulosexanthogenat mit Allylbromid im ersten Schritt. Im zweiten Schritt wurden die restlichen freien Hydroxylgruppen der Anhydroglukoseeinheit mit Essigsäureanhydrid acetyliert (Schwaighofer et al. 2011). Aufgrund der unvollständigen Acetylierung wurde eine schwerlösliche Verbindung erhalten. Die Idee war es, den Acetylierungsschritt durch Verwendung eines reaktiveren Reagens zu verbessern. Statt Essigsäureanhydrid wurde Acetylchlorid eingesetzt (Abb. 78). Der Versuch scheiterte jedoch, es bildete sich ein schwerlösliches Produkt, welches für die Charakterisierung mittels Flüssig  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie ungeeignet war.

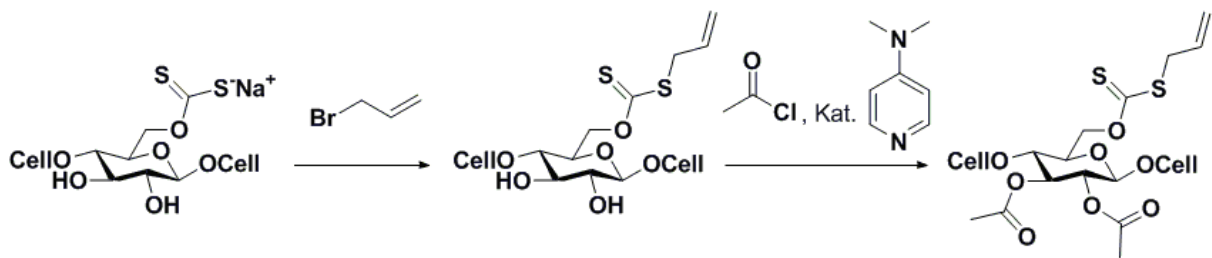


Abbildung 78: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt) und Acetylierung mit Acetylchlorid (Acetylierung an C-2,3 ist dargestellt).

### 2.1.2. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid und Phosphorylierung mit 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (2-Cl-TMDP)

Als Alternative zur Stabilisierung mit Allylbromid und Acetylierung mit Acetylchlorid wurde folgender Syntheseweg verfolgt: die Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid und Phosphorylierung der restlichen freien Hydroxylgruppen der Anhydroglukoseeinheit mit 2-Cl-TMDP (Abb. 79). Das gebildete Produkt sollte mittels Flüssig  $^{31}\text{P}$  NMR Spektroskopie analysiert werden. Während dieser Reaktion bildete sich ein schwerlösliches Produkt, daher konnten die  $^{31}\text{P}$  NMR Messungen nicht durchgeführt werden.

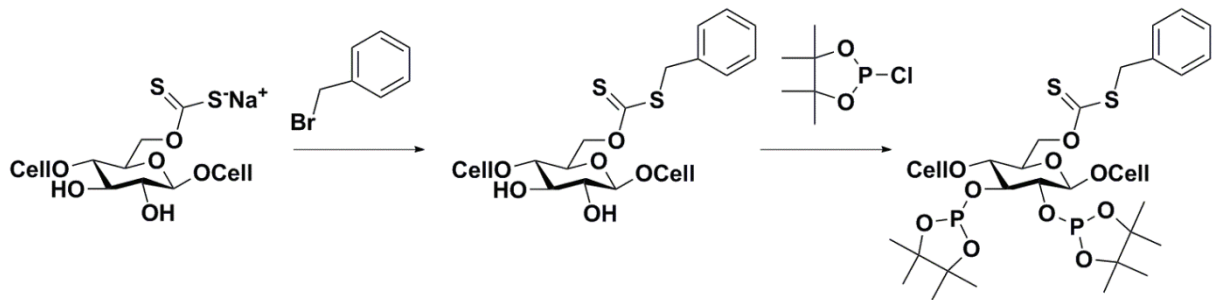


Abbildung 79: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt) und Phosphorylierung mit 2-Cl-TMDP (Phosphorylierung an C-2,3 ist dargestellt).

### 2.2. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid

Benzylbromid ist ein tränenreizender Stoff, deswegen wurde diese Verbindung durch 4-Methylbenzylbromid ersetzt. Nach der Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid (Abb. 80) konnte das gebildete Polymer mittels Flüssig NMR Spektroskopie analysiert werden. Die Abbildungen 81 und 82 stellen die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe dar.

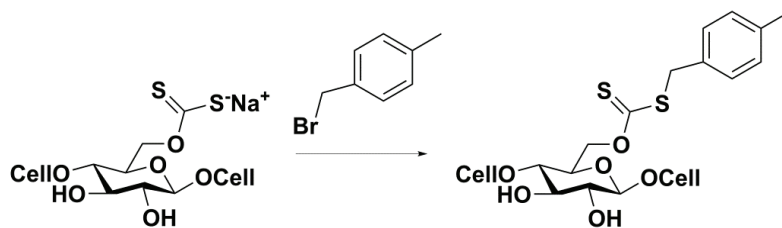


Abbildung 80: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt).

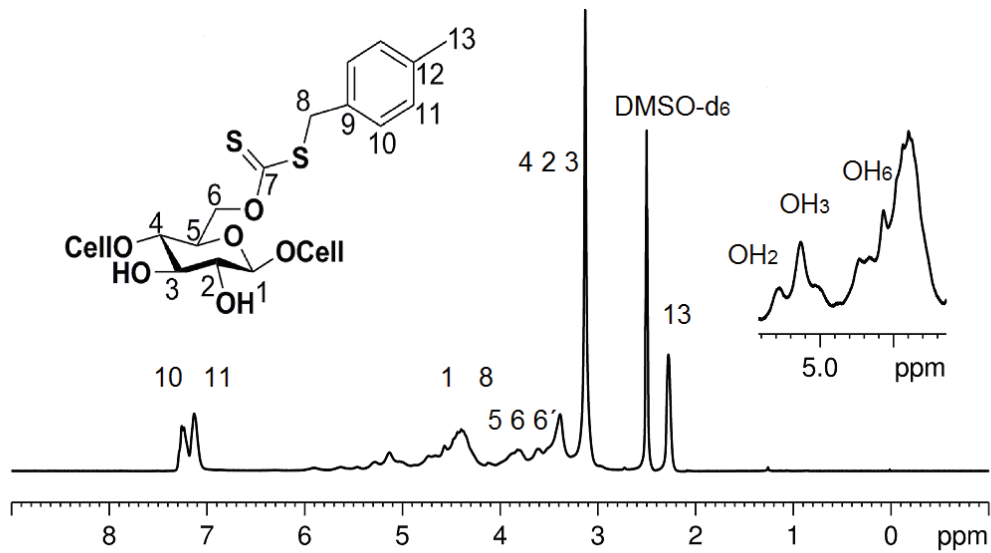


Abbildung 81:  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe.

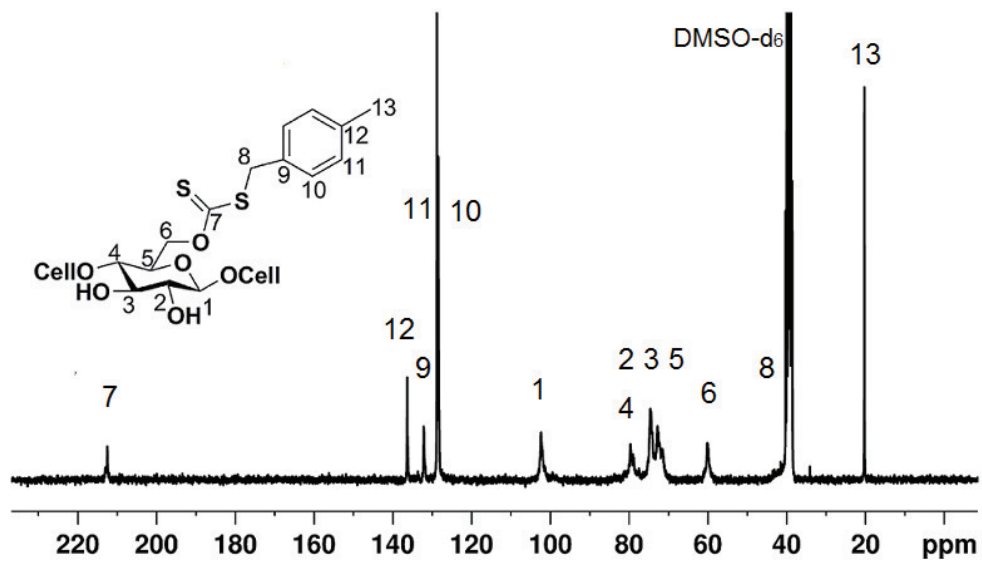


Abbildung 82:  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe.

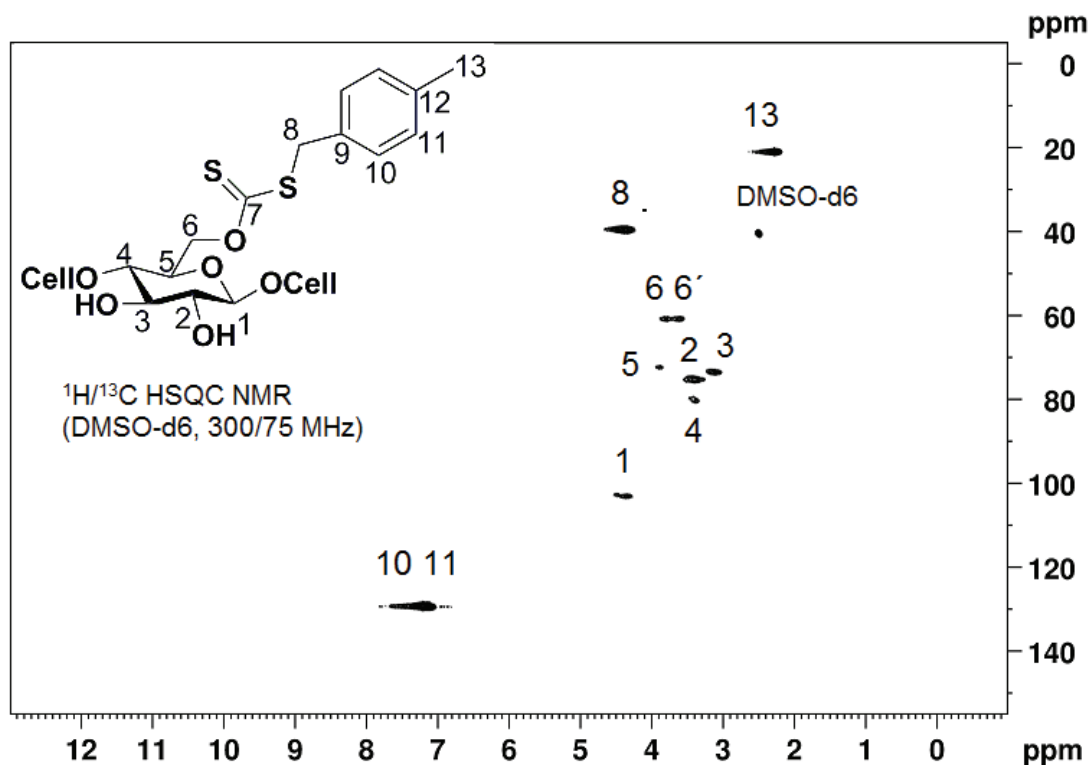


Abbildung 83: <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C ge-HSQC NMR Spektrum (DMSO-d<sub>6</sub>, 300/75 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe.

Die Zuordnung von Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen wurde mit Hilfe der HSQC NMR Spektren durchgeführt (Abb. 83):

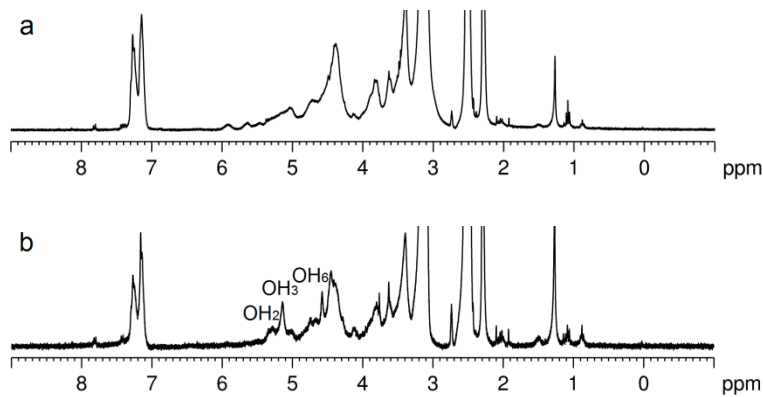
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) von methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat:  $\delta(\text{ppm})_{\text{H}} = 4,44$  (1H, br, H-1); 3,39 (1H, br, H-2); 5,28 (1H, s, OH-2); 3,13 (1H, s, H-3); 5,13 (1H, s, OH-3); 3,51 (2H, br, H-2, H-4); 3,88 (1H, br, H-5); 3,82 (1H, br, H-6); 3,61 (1H, s, H-6'); 4,57 (1H, s, OH-6); 4,40 (2H, br, H-8); 7,25 (2H, s, H-10); 7,13 (2H, s, H-11); 2,27 (3H, s, H-13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) von methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat:  $\delta(\text{ppm})_{\text{C}} = 102,4$  (C-1); 74,7 (C-2); 72,9 (C-3); 79,8 (C-4); 71,6 (C-5); 60,2 (C-6); 212,6 (C-7); 39,5 (C-8); 132,2 (C-9); 128,5 (C-10); 128,8 (C-11); 136,4 (C-12); 20,3 (C-13).

### 2.3. pH-Wert-Optimierung der Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid

Die optimale Wahl des pH-Wertes für die Derivatisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid ist entscheidend für das Erreichen einer erfolgreichen Stabilisierung von Viskose. Das Zellulosexanthogenat im Herstellungsprozess ist stark basisch. Die Stabilisierungen von Zellulosexanthogenat wurden in den früheren Arbeiten aber unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Die Senkung des pH-Wertes kann zur Regeneration der Zellulose aufgrund der Spaltung von Xanthogenatgruppen führen. Im Idealfall muss die Stabilisierungsreaktion im alkalischen Milieu verlaufen. Aus diesem Grund wurde diese Reaktion bei pH 13 durchgeführt. Nach der Stabilisierung wurde das Zellulosexanthogenat neutralisiert, um die Abbaureaktion von

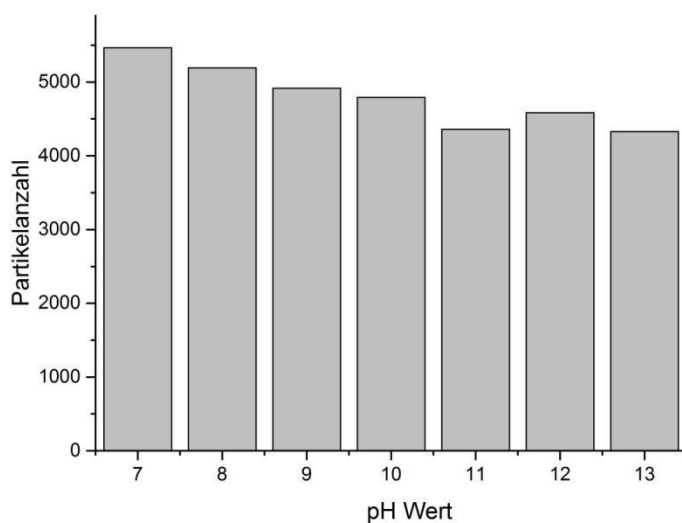
Zelluloseketten zu vermeiden, welche unter alkalischen Bedingungen stattfindet. Zum Vergleich wurde das Zellulosexanthogenat aus der gleichen Charge bei pH 7 stabilisiert (Abb 84).



**Abbildung 84:**  $^1\text{H}$  NMR Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von (a) bei pH 13 methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat und (b) bei pH 7 methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat. Die Peaks von  $\text{OH}_{2,3,6}$  der Zellulose fehlen bei Zellulosexanthogenat, welches im alkalischen Milieu stabilisiert wurde. Das deutet auf die Reaktion von 4-Methylbenzylbromid mit freien Hydroxylgruppen der Zellulose hin.

Der Vergleich der Spektren von methylbenzylbromidstabilisiertem Zellulosexanthogenat zeigt, dass im Spektrum von Zellulosexanthogenat, welches unter alkalischen Bedingungen stabilisiert wurde, die Peaks von freien Hydroxylgruppen der Zellulose fast fehlen, was auf die Reaktion von 4-Methylbenzylbromid nicht nur mit Xanthogenatgruppen, sondern auch mit Hydroxylgruppen der Zellulose deutet. 4-Methylbenzylbromid ist zu reaktiv bei höheren pH-Werten.

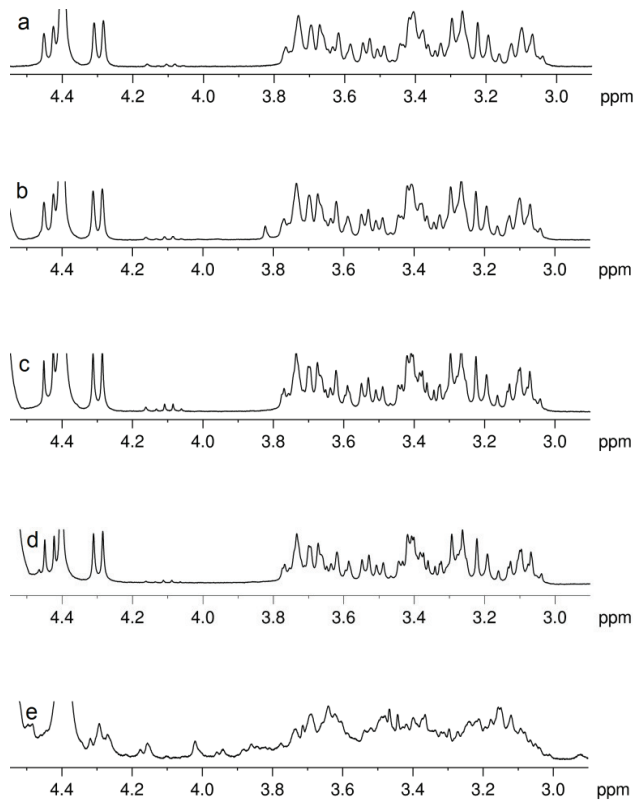
Um festzustellen, wie das Zellulosexanthogenat sich bei der Herabsetzung des pH-Wertes verhält, wurden Messungen der Partikelanzahl in der Zellulosexanthogenatlösung bei pH-Werten zwischen 7 und 13 durchgeführt (Abb. 85). Dieser Versuch zeigt eine höhere Partikelanzahl bei niedrigeren pH-Werten, was auf das Ausfallen von Zellulose hindeutet.



**Abbildung 85:** Bestimmung des Zelluloseausfalls in Zellulosexanthogenatlösung bei pH-Werten 7-13 durch Messung der Partikelanzahl.



Zur Ermittlung des oberen pH Limits für die Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid wurde Cellobiose als Modellsubstanz verwendet. Die Cellobiose wurde mit 4-Methylbenzylbromid bei pH-Werten von 6 bis 10 derivatisiert. Der Ablauf dieser Reaktion wurde durch  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie verfolgt (Abb. 86). Es wurden keine Änderungen der Cellobiose-Signale bei pH-Werten zwischen 6 und 9 beobachtet. Daher wurde ein pH-Wert zwischen 8 und 9 für die Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid als optimal betrachtet.



**Abbildung 86:**  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (70 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 30 %  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von Cellobiose, welche mit 4-Methylbenzylbromid bei pH 6 (a), pH 7 (b), pH 8 (c), pH 9 (d) and pH 10 (e) derivatisiert wurde. Bei pH-Werten zwischen 6 und 9 findet keine Reaktion zwischen 4-Methylbenzylbromid und OH-Gruppen der Cellobiose statt.

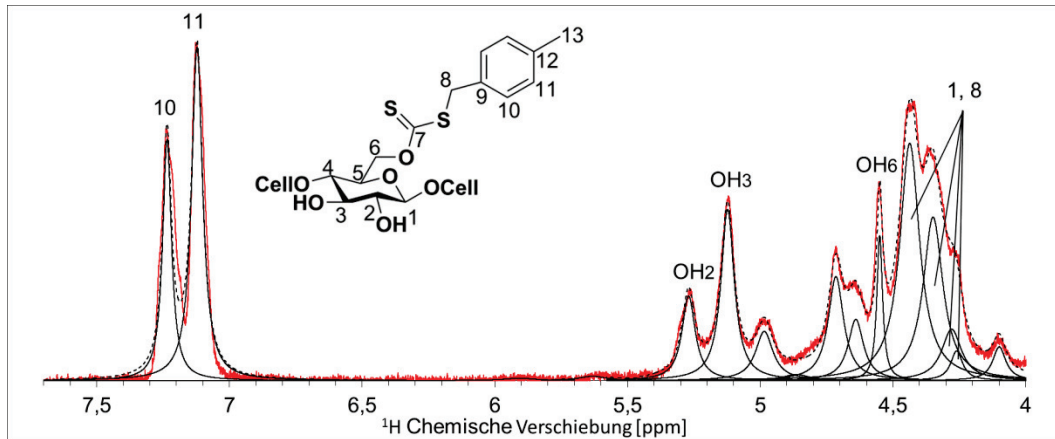
Die Zuordnung von Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen erfolgte nach IUPAC Nomenklatur:

$^1\text{H}$  NMR (70 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 30 %  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von 4-Methylbenzylbromid:  $\delta(\text{ppm})_{\text{H}} = 7,11$  (4H, dd,  $J_1 = 12,7$  Hz,  $J_2 = 8,2$  Hz, H-1, H-1,2,3,4); 4,40 (2H, s, H-7); 2,18 (3H, s, H-8).

$^1\text{H}$  NMR (70 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 30 %  $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von Cellobiose:  $\delta(\text{ppm})_{\text{H}} = 5,01$  (1H, d,  $J = 3,7$  Hz, H-1 $\alpha$ ); 4,44 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1 $\beta$ ); 4,31 (1H, d,  $J = 7,9$  Hz, H-1 $\alpha\beta$ ); 3,83–3,46 (2H, m, H-6 $\beta$ , H-6 $\beta$ ); 3,46–3,32 (3H, m, H-3 $\beta$ , H-4 $\beta$ , H-5 $\beta$ ); 3,32–3,24 (2H, m, H-3 $\beta$ , H-5 $\beta$ ); 3,24–3,15 (1H, m, H-4 $\beta$ ); 3,15–3,03 (2H, m, H-2 $\beta$ , H-2 $\beta$ ), wobei  $\alpha$  und  $\beta$  die anomeren Protonen der Cellobiose sind.

## 2.4. $\gamma$ -Wert Bestimmung

Trotz der guten Auflösung der  $^1\text{H}$  Spektren von methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat überlappen noch immer viele Peaks in dem für die  $\gamma$ -Wert-Bestimmung relevanten Bereich. Eine Dekonvolution des Spektrums ist deshalb notwendig (Abb. 87).



**Abbildung 87:** Dekonvolution eines typischen  $^1\text{H}$  Spektrums von methylstabilisiertem Zellulosexanthogenat: experimentelle Werte (rote Kurve), eingefügte Lorenzkurven (schwarze Kurve), Summe von eingefügten Lorenzkurven (punktierter Kurve).

Für die Ermittlung des  $\gamma$ -Wertes wurde das Verhältnis der Anzahl der Methylbenzylgruppen zur Anzahl der Glukoseeinheiten bestimmt. Die Anzahl der Methylbenzylgruppen lässt sich als ein Viertel von Peakflächen der Protonen 10,11 [ $A(10,11)$ ] berechnen. Der Peak des anomeren Protons 1 bei 4,4 ppm gibt die Anzahl der Glukoseeinheiten an. Dieser Peak überlappt mit zwei Protonen 8 der Methylbenzylgruppe [ $A(1,8)$ ]. Die Subtraktion der Hälfte der Peakfläche der Protonen 10,11 [ $A(10,11)$ ] von der Peakfläche der Protonen 1 und 8 [ $A(1,8)$ ] ergibt einen Wert, welcher der Anzahl von anomeren Protonen 1 entspricht. Der  $\gamma$ -Wert kann nach der Gleichung (1) berechnet werden.

$$\gamma[\%] = 100 \frac{\frac{A(10,11)}{4}}{A(1,8) - \frac{A(10,11)}{2}} \quad (1)$$

Zur Überprüfung der neuen Methode wurden elf Industrieproben mit einem typischen  $\gamma$ -Wert von 50 mittels NMR und IR untersucht (Baldinger et al. 2003). Fünf Proben wurden auch mittels iodometrischer Titration analysiert (Zellcheming Merkblatt 1972). Aus Gründen der Vertraulichkeit wurden die Werte so normiert, dass der IR Mittelwert auf 100 gesetzt wurde. Die Abbildung 88 zeigt, dass die Werte von allen drei Methoden gut übereinstimmen. Der resultierende Fehler beträgt 1,8 %, was für diese Art von Analysen zumutbar ist.

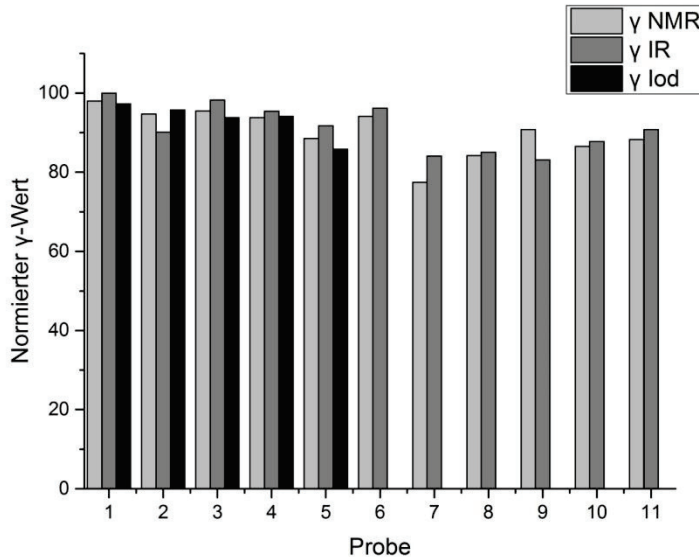


Abbildung 88: Vergleich der normierten  $\gamma$ -Werte von Industrieproben, welche mittels IR und iodometrischer Titration bestimmt wurden.

## 2.5. Verteilung der Xanthogenatgruppen

Die Verteilung von Xanthogenatgruppen kann indirekt durch Analyse der Peakflächen von Protonen der einzelnen Hydroxylgruppen nach der Gleichung (2)-(6) bestimmt werden. Die relative Verteilung für Hydroxylgruppen für die Position  $x$  wurde aus dekonvolvierten Peakflächen von OH2, OH3, OH6 nach der Gleichung (2) berechnet.

$$DS(OH_x)[\%] = 100 \frac{A(OH_x)}{A(OH_{2,3,6})} \quad (2)$$

Der Anteil der Hydroxylgruppen an der Position  $x$  kann mit der Gleichung (3) ermittelt werden.

$$F(OH_x)[\%] = DS(OH_x) \frac{300 - \gamma}{300} \quad (3)$$

Der Anteil der einzelnen Hydroxylgruppen wurde mit der Gleichung (4) in den Anteil von Xanthogenatgruppen an der Position  $x$  umgerechnet.

$$F(xanthation, x)[\%] = 33,3 - F(OH_x) \quad (4)$$

Die relative Substitutionsverteilung an der Position  $x$  wurde aus dem Anteil von Xanthogenatgruppen und der Gesamt-xanthogenierung mit der Gleichung (5) bestimmt.

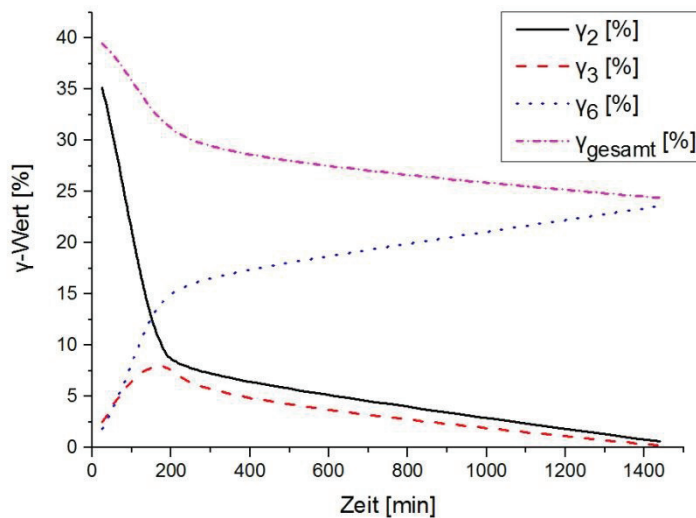
$$DS(xanthation, x)[\%] = 100 \frac{F(xanthation, x)}{F(xanthation_{2,3,6})} \quad (5)$$

Schließlich kann der  $\gamma$ -Wert an der Position  $x$  mit der Gleichung (6) berechnet werden.

$$\gamma_x = DS(xanthation, x) \cdot \gamma \quad (6)$$

## 2.6. Änderung der Xanthogenatgruppenverteilung im Reifeprozess

Die Untersuchung der Änderung der Struktur von drei verschiedenen Viskoseproben zu unterschiedlichen Zeiten während des Reifevorgangs zeigt (Abb. 89), dass die Erstsitution an der zweiten Position der Glukoseeinheit stattfindet. Nach einer kurzen Zeit sinkt die Anzahl der Xanthogenatgruppen an der zweiten Position, gleichzeitig steigt die Substituentenanzahl an der dritten und der sechsten Position, wobei dieser Vorgang viel schneller an der sechsten als an der dritten Position abläuft. Am Schluss findet die Abspaltung von Xanthogenatgruppen an der zweiten und der dritten Position statt. Es entsteht eine homogen substituierte Verbindung mit Xanthogenatgruppen an der sechsten Position. Der gesamte  $\gamma$ -Wert sinkt von 39 auf 25.



**Abbildung 89:** Beobachtung einer typischen Viskoseprobe im Reifeprozess: Änderung der Substituentenverteilung an der zweiten, dritten und sechsten Position ( $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  und  $\gamma_6$ ) von Zellulosexanthogenat und des gesamt  $\gamma$ -Wertes sind dargestellt.

Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit den Ergebnissen aus den anderen oben beschriebenen NMR Methoden (siehe 1.2.). Nach allen diesen Methoden nimmt der gesamte  $\gamma$ -Wert im Reifeprozess ab. Die Substitution an der sechsten Position ( $\gamma_6$ -Wert) bleibt konstant oder erhöht sich sogar mit der Zeit, und die Substitutionen an der zweiten und der dritten Position ( $\gamma_2$ - und  $\gamma_3$ -Werte) sinken auf beinahe Null. Der einzige Unterschied zu den vorherigen Publikationen zu diesem Thema ist ein relativ hoher  $\gamma_2$ -Wert zu Beginn der Reife. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte an unterschiedlichen Definitionen des Nullpunkts auf der Zeitachse liegen. Vermutlich wurde die erste Probe in unserem Experiment in einem früherem Reifestadium als in den anderen Arbeiten charakterisiert.

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Ammoniumchlorid ( $\geq 99,5$  %, Sigma-Aldrich), Aceton (p.a., Merck), Acetylchlorid ( $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich), AG 1-X8 Harz (20-50 mesh, Chlorid-Form, Bio Rad), Aktivkohle rein (Merck Millipore), Allylbromid (99 %, Sigma-Aldrich), Amberlite IRA 402, Ionenaustauscher (Sigma-Aldrich), Ammoniumacetat (98,0 %, Sigma-Aldrich), Ammoniumhydroxid-Lösung (28,0-30,0 %, Sigma-Aldrich), Apocynin (98,0 %, Sigma-Aldrich), Arabinose (99,0 %, Fluka), Benzylbromid (98 %, Sigma-Aldrich), Borsäure ( $\geq 99,5$  %, Sigma-Aldrich), Calciumchlorid Dihydrat (99,0 %, Sigma-Aldrich), Calciumhydroxid (96 %, Sigma-Aldrich), Catechol (99,0 %, Sigma-Aldrich), Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat (98,0 %, Sigma-Aldrich), Coniferylaldehyd (98,0 %, Sigma-Aldrich), d-(+)-Cellobiose ( $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich), 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (95%, Sigma-Aldrich), deuteriertes Dimethylsulfoxid (99,9 atom % D, Carl Roth), Deuteriumoxid (99,9 atom % D, Sigma-Aldrich), Deuteriumoxid (99,9 atom % D, Sigma-Aldrich), Deuteriumchlorid (35 wt. % in D<sub>2</sub>O, 99 atom % D, Sigma-Aldrich), Diethylether (HPLC Qualität, FSA Laboratory Supplies), di-Kaliumhydrogenphosphat (99,0 %, Roth), 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (97,0 %, Sigma-Aldrich), Dimethylsulfoxid ( $\geq 99,9$  %, Merck), Dinatriumhydrogenphosphat ( $\geq 99$  %, pH (50 mg/ml H<sub>2</sub>O, 25 C), Fluka), Eisen(III)-chlorid Hexahydrat ( $\geq 97$  %, Sigma-Aldrich), Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), Eisen(II)-sulfat, Essigsäure (p.a., Merck), Ethanol (99,9 %, Merck), Galaktose (98,0 %, Roth), Glukose Monohydrat (99,5 %, Roth), Guajacol (Sigma-Aldrich), Hefe-Extrakt (Fluka), Heptahydrat (99,0 %, Roth), Homovanillinsäure (98,0 %, Alfa Aesar), Hydrochinon (99,0 %, Roth), Indulin AT (Mw ~10,000, Sigma-Aldrich), 4-Hydroxybenzoesäure (99,0 %, Sigma-Aldrich), Iodlösung (0,5 M, volumetric, Sigma-Aldrich), Kaliumchlorid ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), Kaliumdihydrogenphosphat (99,5 %, Chem-Lab), L-Cystein (97,0 %, Sigma-Aldrich), Kupfer(II)-chlorid Dihydrat (99,0 %, Sigma-Aldrich), Lewatit (1368 Ca/320, Lanxess), Magnesiumchlorid Hexahydrat ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), Magnesiumchlorid Tetrahydrat ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), Magnesiumhydroxid (95,0 %, Sigma-Aldrich), Magnesiumsulfat Heptahydrat ( $\geq 99,5$  %, Sigma-Aldrich), Mannose (99,0 %, Sigma-Aldrich), 4-Methylbenzylbromid (98 %, Alfa Aesar), m-Cumarsäure (98,0 %, Roth), Natriumchlorid ( $\geq 99,5$  %, Sigma-Aldrich), Natriumdihydrogenphosphat ( $\geq 99$  %, pH (5 %, Fluka), Natriumdeuteriooxid (40 wt. % solution in D<sub>2</sub>O, 99,5 atom % D, Goss Scientific Instruments Limited), Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (97 %, Sigma-Aldrich), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid Plätzchen ( $\geq 99$  %, Merck), Natriumhydroxid (99,0 %, Roth), Natriummolybdat Dihydrat ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), Natriumthiosulfat (99 %, Sigma-Aldrich), Nickel(II)-chlorid Hexahydrat ( $\geq 98,0$  %, Sigma-Aldrich), Peroxidase aus Meerrettich (ACT: 230 U/mg, Amresco), Phenol (99,0 %, Sigma-Aldrich), Pyrogallol (98,0 %, Roth), Resazurin Natriumsalz (Farbgehalt ~80 %, Sigma-Aldrich), Salzsäure (25 %, Roth), Syringaldehyd (98,0 %, Sigma-Aldrich), Syringasäure (95,0 %, Sigma-Aldrich), trans-Ferulasäure (99,0 %, Sigma-Aldrich), Trypton/Pepton aus Casein (Roth), Vanillin (99,0 %, Roth), Vanillinsäure (98,0 %, Roth), Xylose (99 %, Roth), Zinkchlorid ( $\geq 98,0$  %, Sigma-Aldrich), Gallussäure (97,5-102,5 % (Titration), Sigma-Aldrich), Gallussäure (97,5-102,5 % (Titration), Sigma-Aldrich), L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat ( $\geq 98,5$  %, Sigma-Aldrich).

Die Zellulosexanthogenatproben wurden im Labormaßstab hergestellt (Götze 1967). Dafür wurde Faserzestoff aus Buche mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 1300-1500 verwendet.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Messungen der optischen Dichte

Für die Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen in einer Mikrotiterplatte (Inhibitorversuche, Prüfung von verschiedenen Vorbehandlungstechniken auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* und synergistische Effekte) wurden die Bakteriensuspensionen in 96 Wells Mikrotiterplatte in einem Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei 600 nm gemessen. Als Lichtquelle wurde eine Xenon-Blitzlampe verwendet. Vor jeder Messung wurde die Lösung 5 s lang geschüttelt.

Für die Erstellung der Wachstumskurven von in NMR-Röhrchen wachsenden *Thermoanaerobacter mathranii* bei in situ  $^1\text{H}$  NMR Versuchen wurde das NMR-Röhrchen mit der Probe in eine speziell angefertigte PS-Küvette gegeben. Die Küvette wurde mit schwarzem Schaumstoff verschlossen und in ein Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Mikrotiterplatten-Spektrophotometer gestellt. Zum zusätzlichen Verdunkeln der Probe wurde eine Kartonschachtel verwendet. Die Messung wurde bei 600 nm durchgeführt. Als Lichtquelle wurde eine Xenon-Blitzlampe verwendet.

### 3.2.2. Analyse von Zucker aus der Sulfitablaue mittels HPAEC-PAD

Die Analyse von Zuckern aus der Sulfitablaue wurde nach NREL/TP-510-42623 (Sluiter et al. 2012) durchgeführt, wobei der Hydrolyseschritt ausgelassen wurde. Die Analyse wurde mit einem Dionex ICS-5000<sup>+</sup> HPIC System von Thermo Scientific mit einem PAD Detektor durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit einer Carbo Pac PA10 Säule und einer Vorsäule bei einem Fluss von 0,26 ml/min. Als Laufmittel wurde VE Wasser verwendet. Während der Detektion wurde 0,35 M NaOH mit einem Fluss von 0,10 ml/min zugeführt. Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von Zuckern hergestellt (Tab. 15).

**Tabelle 14: Verdünnungsreihe für die die Kalibrierung.**

Standard	Konzentration				
	[g/l]				
Glukose	0,0012	0,003	0,006	0,009	0,012
Xylose	0,0012	0,003	0,006	0,009	0,012
Mannose	0,0024	0,006	0,012	0,018	0,024
Arabinose	0,00024	0,0006	0,0012	0,0018	0,0024
Galaktose	0,0004	0,001	0,002	0,003	0,004

### 3.2.3. NMR Spektroskopie

In situ  $^1\text{H}$  NMR Messungen zur Überwachung der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* und die Abbaureaktion der Gallussäure und Coniferylaldehyd durch Zugabe von Peroxidase und Wasserstoffperoxid wurden auf einem 44 MHz Spinsolve NMR Spektrometer von Magritek mit einem 5 mm Probenkopf durchgeführt. Die Proben wurden mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie bei 26 °C untersucht. Für die Aufnahme der Spektren wurden folgende Parameter verwendet: 7  $\mu\text{s}$  90° Puls, 56,6 s Acquisition Time, 117 Hz spektrale Breite, 15 s Relaxationsdelay und 40 Scans.

40 Scans wurden aufgenommen. Die Acquisition Time betrug 10 min. Die Referenzierung der  $^1\text{H}$  Spektren erfolgte über das DSS Signal bei 0 ppm.

Zum Erreichen einer höheren Auflösung wurden  $^1\text{H}$  NMR Spektren von potentiellen Inhibitoren während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* sowie Spektren der Abbaureaktion von Gallussäure und Coniferylaldehyd mit Wasserstoffperoxid auf einem 300 MHz Bruker Advance III Spektrometer mit einem 5 mm Probenkopf durchgeführt. Die Proben wurden mittels Flüssig  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie bei 23 °C untersucht. Für die Aufnahme der Spektren wurden folgende Parameter verwendet: 8,3  $\mu\text{s}$  90° Puls, 5,3 s Acquisition Time, 6188 Hz spektrale Breite, 1 s Relaxationsdelay und 40 Scans. Die Referenzierung der  $^1\text{H}$  Spektren erfolgte über das DSS Signal bei 0 ppm.

Alle NMR Messungen in Arbeiten zur  $\gamma$ -Wert Bestimmung wurden auf einem 300 MHz Bruker Advance DPX Spektrometer mit einem 5 mm Probenkopf durchgeführt. Die Proben von benzylstabilisiertem und methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat wurden mittels Flüssig  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ge-HSQC NMR Spektroskopie bei 65 °C untersucht, die Proben von derivatisierter Cellobiose wurden mittels Flüssig  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie bei 26 °C untersucht.  $^1\text{H}$  NMR Spektren wurden mit folgenden Parametern erfasst: 11,2  $\mu\text{s}$  90° Puls, 4,2 s Acquisition Time, 26 ppm spektrale Breite und 10 s Relaxationsdelay und 48 Scans. Die Referenzierung der  $^1\text{H}$  Spektren erfolgte über das DMSO- $d_6$  Signal bei 2,5 ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren wurden mit 0,9 s Acquisition Time, 245 ppm spektrale Breite, 6000 Scans und 16 Dummy-Scans aufgenommen. Die Referenzierung der  $^{13}\text{C}$  Spektren erfolgte über das DMSO- $d_6$  Signal bei 39,5 ppm.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ge-HSQC NMR Spektren wurde mit Echo-Antiecho Acquisition Modus für 2D/3D, 0,2 s Acquisition Time für  $^1\text{H}$ - und 0,01 s für  $^{13}\text{C}$ -Dimension, 14 ppm spektrale Breite für  $^1\text{H}$  und 160 ppm für  $^{13}\text{C}$ , 280 Scans und 16 Dummy-Scans für  $^1\text{H}$  erfasst.

#### **3.2.4. IR Spektroskopie (Baldinger et al. 2003)**

Alle IR Messungen wurden auf einem Bruker Tensor 27 FTIR Spektrometer mit einer Diamant Horizontal ATR-Einheit mit hermetisch abgedichtetem Strahlengang (2500 – 16667 nm) durchgeführt. Die Auflösung betrug  $2\text{ cm}^{-1}$ . Als Referenz wurde Wasser verwendet. Die chemometrische Auswertung basierte auf einer PLS (Partial Least Squares) Methode. Mit der Software „Opus“ und dem Zusatzpaket „Opus Quant 2“ wurden für alle Komponenten die optimale Datenvorbehandlung und die Spektralbereiche ermittelt.

#### **3.2.5. Iodometrische Titration (Zellcheming Merkblatt 1972)**

Die iodometrische Titration wurde nach der im Zellcheming Merkblatt III/21/72 beschriebenen Methode durchgeführt.

1,2 g Viskose wurden in 10 ml eisgekühltem VE-Wasser gelöst. 10 ml vorgekühlter Amberlite IRA 402 Ionenaustauscher wurden der Lösung zugegeben und für fünf Minuten unter Eiskühlung gerührt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit 45 ml eisgekühltem VE-Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit 16 ml 0,2 N Natriumthiosulfat Lösung versetzt. Anschließend wurde die Probelösung mit 2 N Essigsäure mit Phenolphthalein als Indikator neutralisiert. Zwei Tropfen Essigsäure wurden im Überschuss zugegeben. Die Probe wurde mit 0,2 N Iodlösung gegen 0,5 % Stärkelösung titriert.

Der  $\gamma$  Wert wurde mit der Gleichung 7 berechnet.

$$\gamma = \frac{32.4(a-b)}{Ec} \quad (7)$$

- a Iodlösung-Verbrauch [ml]
- b Natriumthiosulfat-Verbrauch [ml]
- E Viskose-Einwaage [g]
- c Zellulosegehalt der Viskose [%]

### 3.3. Inhibitorversuche mit Ethanolproduzenten

#### 3.3.1. Medium

Zur Kultivierung von *Thermoanaerobacter mathranii* (DSM 11426) wurde das DSMZ 640 Medium aus der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen verwendet.

Zum Herstellen dieses Mediums wurden folgende Substanzen in 1000 ml VE Wasser gelöst: 0,9 g Ammoniumchlorid, 0,9 g Natriumchlorid, 0,4 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 0,75 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,5 g di-Kaliumhydrogenphosphat, 2 g Trypton/Pepton aus Casein, 1 g Hefeextrakt, 1 ml Spurenelementlösung SL-10 (siehe SL-10. DSMZ), 2,5 mg Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, 0,75 g L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat, 0,5 mg Resazurin. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde 10 min bei 120 °C autoklaviert. Als Zuckerquelle wurde sterile 5 g/l Glukoselösung verwendet, welche ins Medium vor dem Animpfen der Mikroorganismen zugegeben wurde.

Zum Herstellen der Spurenelementlösung SL-10. DSMZ wurden 1,50 g Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat in 10 ml 7,7 M Salzsäure gelöst und mit 990 ml VE Wasser verdünnt. Folgende Salze wurden dazugegeben: 70 mg Zinkchlorid, 100 mg Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat, 6 mg Borsäure, 190 mg Calciumchlorid-Hexahydrat, 2 mg Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat, 24 mg Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat, 36 mg Natriummolybdat-Dihydrat. Schließlich wurde mit VE Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

#### 3.3.2. Kultivierung der Mikroorganismen

Die Arbeiten wurden unter anaeroben Bedingungen in einer Glovebox unter Formiergasatmosphäre durchgeführt. 1 ml Cryo-Stock (-80 °C) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, in ein 15 ml Kulturröhrchen mit 9 ml Medium und mit Glukoselösung überführt und mit einem Septum verschlossen. Die Kultur wurde 12 h unter Schütteln bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Erhaltung vitaler Zellen wurde 1 ml Kultur noch einmal in 9 ml Medium mit Glukose überimpft und für 5 h inkubiert. Diese Zellen wurden dann für Inhibitorversuche verwendet.

#### 3.3.3. Inhibitorscreening

Für die Inhibitorversuche mit Alkoholen, organischen Säuren und Furanderivaten wurde 1 ml Kultur in ein 15 ml Kulturröhrchen mit 9 ml Medium, Glukose und mit bzw. ohne inhibierenden Substanzen unter Formiergasatmosphäre überimpft und 8 h im Wasserbad bei 65 °C unter Schütteln inkubiert.



Die Säuren wurden vor der Zugabe ins Medium mit NaOH neutralisiert. Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden alle 2 h von jedem Kulturröhrchen 500 µL Probe entnommen und  $\Delta OD$  der Lösungen in einer Mikrotiterplatte in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm gemessen. Es wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Die Inhibitorversuche mit phenolischen Substanzen wurden in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. In jedes Well wurden 50 µl Medium und Glukose mit bzw. ohne Phenole unter Formiergasatmosphäre pipettiert. Danach wurden der Lösung 30 µl Kultur zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer durchsichtigen sauerstoffundurchlässigen Klebefolie verschlossen und für 10 h in einen Trockenschrank bei 65 °C gestellt. Jede Stunde wurden die optische Dichte (OD) der Lösungen in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm gemessen und die Wachstumskurven erstellt, wobei vor jeder Messung die Mikrotiterplatte 10 min bei RT abgekühlt wurde, um das Anlaufen der Klebefolie und den damit verbundenen Messfehler zu verhindern. Für die statistische Auswertung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### **3.4. Inhibitorversuche mit PHB-Produzenten**

#### **3.4.1. Medium**

Zur Kultivierung von *Halomonas halophila* (DSMZ 4770) wurde das 4340 Medium aus der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen verwendet.

Das Medium enthielt 81 g/l Natriumchlorid, 7 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 9,6 g/l Magnesiumsulfat-Hexahydrat, 0,477 g/l Calciumchlorid-Dihydrate, 2 g/l Kaliumchlorid, 0,06 g/l Natriumhydrogencarbonat, 0,026 g/l Natriumbromid, 5 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde für 10 min bei 120 °C autoklaviert. Als Zuckerquelle wurde sterile 1 g/l Glukoselösung verwendet, welche ins Medium vor dem Animpfen von Mikroorganismen zugegeben wurde.

#### **3.4.2. Kultivierung der Mikroorganismen**

1 ml Cryo-Stock (-80 °C) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und in einen 100 ml Kolben mit 19 ml Medium und mit Glukoselösung überführt. Die Kultur wurde 15 h bei 30 °C und 170 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Erhaltung vitaler Zellen wurde 1 ml Kultur noch einmal in 19 ml Medium mit Glukose überimpft und für 10 h inkubiert. Diese Zellen wurden dann für Inhibitorversuche verwendet.

#### **3.4.3. Inhibitorscreening**

Für die Inhibitorversuche wurde 1 ml Kultur in einen 250 ml Kolben mit 99 ml Medium, Glukose und mit bzw. ohne inhibierenden Substanzen überimpft und 140 h bei 30 °C und 170 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Säuren wurden vor der Zugabe ins Medium mit NaOH neutralisiert. Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden von jedem Kulturröhrchen 500 µl Probe im Abstand von zwei Stunden entnommen (außer Nachtzeit) und  $\Delta OD$  der Lösungen in einer Mikrotiterplatte in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm gemessen. Für die OD Messungen

wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt, damit der Messwert im linearen Bereich des Photometers lag (zwischen 0,1 und 1). Es wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt.

### **3.5. Inhibitorversuche mit Butanolproduzenten**

#### **3.5.1. Medium**

Zur Kultivierung von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (DSMZ 14923) wurde ein leicht modifiziertes DSM Medium mit pH-Wert 7 und Glukose als Zuckerquelle verwendet.

Zum Herstellen dieses Mediums wurden folgende Substanzen in 1000 ml VE Wasser gelöst: 0,3 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 2 g Hefeextrakt, 6 g Trypton, 3 g Ammoniumacetat, 1,5 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,2 g di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,01 mg Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, 0,5 g L-Cystein. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde für 10 min bei 120 °C autoklaviert. Als Zuckerquelle wurde sterile 20 g/l Glukoselösung verwendet, welche ins Medium vor dem Animpfen mit einer Bakterienkultur zugegeben wurde.

#### **3.5.2. Kultivierung der Mikroorganismen**

Das *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ist ein anaerober Stamm. Um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Arbeiten mit der Kultur in einer Glovebox unter Formiergasatmosphäre durchgeführt.

1 ml Cryo-Stock (-80 °C) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, in eine 100 ml Flasche mit 19 ml komplexen Medium und mit Glukoselösung überführt und mit einem Septum verschlossen. Die Kultur wurde 24 h unter Schütteln bei 30 °C und 100 rpm inkubiert. Zur Erhaltung vitaler Zellen wurde 1 ml Kultur noch einmal in 19 ml Medium mit Glukoselösung überimpft und für 18 h inkubiert. Diese Zellen wurden dann für Inhibitorversuche verwendet.

#### **3.5.3. Inhibitorscreening**

Die Inhibitorversuche wurden in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. In jedes Well wurden 50 µl Medium und Glukose mit bzw. ohne Inhibitor unter Formiergasatmosphäre pipettiert, wobei die Säuren vor der Zugabe ins Medium mit NaOH neutralisiert wurden. Danach wurden der Lösung 30 µl Kultur zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer durchsichtigen sauerstoffundurchlässigen Klebefolie verschlossen und für 10 h in einen Schüttelinkubator bei 30 °C und 100 rpm gestellt. Jede Stunde wurde  $\Delta OD$  der Lösungen in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm gemessen und die Wachstumskurven erstellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### **3.6. Synergistische Effekte**

Die Kultivierung von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* erfolgte wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben ist.

Die Untersuchung von synergistischen Effekten wurde in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. In jedes Well wurden 50 µl Medium und Glukose mit bzw. ohne potentiellen Inhibitoren unter Formiergasatmosphäre pipettiert. Danach wurden der Lösung 30 µl Kultur zugegeben. Die

Mikrotiterplatte wurde mit einer durchsichtigen sauerstoffundurchlässigen Klebefolie verschlossen. Das Wachstum von Mikroorganismen wurde durch OD Messung in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm erfasst, wobei dieses so programmiert wurde, dass die Proben 24 h lang bei 30 °C im Photometer inkubiert wurden. Jede Stunde wurde eine OD Messung gemacht, zwischen den Messungen wurde die Probe jede Minute für 5 s geschüttelt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### **3.7. Fermentationsprozess von *Thermoanaerobacter mathranii* mittels in situ <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie**

Die Kultivierung von *Thermoanaerobacter mathranii* erfolgte wie im Kapitel 3.3.2. beschrieben ist. Statt VE Wasser wurde D<sub>2</sub>O verwendet. Als interner Standard wurde DSS eingesetzt.

Für die in situ <sup>1</sup>H NMR Versuche zur Bestimmung der Wirkung von potentiellen Inhibitoren auf die Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* wurden 500 µl Kultur in ein NMR Röhrchen mit 500 µl Medium mit 5 g/l Glukose, DSS und mit bzw. ohne 2 g/l Inhibitor unter Formiergasatmosphäre überimpft, verschlossen, mit Teflonband abgedichtet und 26 h im Wasserbad bei 65 °C unter Schütteln inkubiert. Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden von jeder Probe alle 2 h (außer Nachtzeit) OD Messungen in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm durchgeführt. Für die Verfolgung der Konzentrationsänderung von Ethanol wurden in gleichen Zeitabständen <sup>1</sup>H NMR Messungen mit einem 44 MHz Magritek NMR Spektrometer durchgeführt.

Zur Bestimmung der Änderung von Ferulasäure, Vanillin, Syringaldehyd, Gallussäure, Phenol und Pyrogallol während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* wurden 2 g/l Lösungen dieser Substanzen im Medium mit 5 g/l Glukose und DSS hergestellt. Diese Lösungen wurden auf zwei NMR Röhrchen aufgeteilt. Alle diese Substanzen wurden mittels <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie am 300 MHz Bruker NMR Spektrometer charakterisiert. Danach wurden 500 µl Kultur in ein NMR Röhrchen mit 500 µl Medium, Glukose und phenolischer Verbindung unter Formiergasatmosphäre zugegeben und bei 65 °C inkubiert. Das zweite Röhrchen ohne Mikroorganismen wurde genauso inkubiert. Nach 72 h wurden <sup>1</sup>H NMR Messungen von Proben mit und ohne Bakteriensuspension am 300 MHz Bruker NMR Spektrometer durchgeführt.

Zur Bestimmung der Änderung von Coniferylaldehyd während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* wurden in drei 15 ml Röhrchen jeweils 10 mg Coniferylaldehyd eingewogen. Ein Röhrchen wurde mit 10 ml D<sub>2</sub>O befüllt, das andere Röhrchen mit 10 ml Medium (enthält 5 g/l Glukose), das letzte Röhrchen mit 9 ml Medium (enthält 5 g/l Glukose). In das letzte Röhrchen wurde 1 ml Bakteriensuspension zugegeben. Danach wurden alle drei Röhrchen für 72 h bei 65 °C im vorgeheizten Wasserbad inkubiert, wobei in regelmäßigen Zeitabständen allen drei Röhrchen mit Lösungen 600 µl Probe entnommen wurden, welche mittels <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie am 300 MHz Bruker NMR Spektrometer charakterisiert wurden.

### **3.8. Entgiftung der Sulfitablauge durch verschiedene Vorbehandlungstechniken**

#### **3.8.1. In situ $^1\text{H}$ NMR Vorversuche mit Peroxidase**

55,4 mg (0,33 mmol) Gallussäure wurden in 4,5 ml  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Der Lösung wurden 0,5 ml einer 3,003 g/l DSS Lösung in  $\text{D}_2\text{O}$  zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 40 wt. % NaOD auf 4,08 eingestellt.

##### **3.8.1.1. Gallussäure-Versuch 1**

1 ml Gallussäure-Lösung (65,13 mmol/l) wurde in ein NMR Röhrchen überführt. Der Lösung wurden 0,52 mg (120000 U/l) Peroxidase mit Act 230 U/mg zugegeben. Die Probe wurde mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie charakterisiert.

Der Probe wurde eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung portionsweise zugegeben. Dafür wurden 6,67  $\mu\text{l}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (65,2 mmol) in 93,33  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. 10  $\mu\text{l}$  der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung wurden in kurzen Zeitintervallen der Probe zupipettiert. Nach jeder Zugabe wurde die Probe geschüttelt und mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie charakterisiert.

##### **3.8.1.2. Gallussäure-Versuch 2**

Im Versuch 2 wurden 1,5 mg Peroxidase (345000 U/l) mit Act 230 U/mg verwendet. Ansonsten wurde der Versuch 2 genauso wie Versuch 1 durchgeführt.

##### **3.8.1.3. Coniferylaldehyd-Versuch**

1 ml Coniferylaldehyd Lösung (10,3 mmol/l) wurde in ein NMR Röhrchen überführt. Der Lösung wurden 1,92 mg (344064 U/l) Peroxidase mit Act 179,2 U/mg zugegeben. Die Probe wurde mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie charakterisiert.

Der Probe wurde eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung portionsweise zugegeben. Dafür wurden 6,67  $\mu\text{l}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (65,2 mmol) in 93,33  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. 10  $\mu\text{l}$  der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung wurden in kurzen Zeitintervallen der Probe zupipettiert. Nach jeder Zugabe wurde die Probe geschüttelt und mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie charakterisiert.

#### **3.8.2. Entgiftung mit Peroxidase**

10 ml Sulfitablauge wurde 345000 U/l Peroxidase zugegeben. 8 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,3  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 98,7  $\mu\text{l}$  VE Wasser verdünnt. Die Lösung wurde portionsweise der Probe zugetropft. Die Lösung wurde 1 h bei 100 rpm bei Raumtemperatur gerührt. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.3. Entgiftung mit Anionenaustauscher**

2 g Anionenaustauscherharz (AG 1-X8, 20-50 mesh, Chlorid-Form, Bio Rad) wurden sorgfältig mit VE Wasser gewaschen und mit 10 M NaOH Lösung aktiviert. 10 ml Sulfitablauge wurde aktivierter Anionenaustauscher zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Anionenaustauscher abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.4. Entgiftung mit Kationenaustauscher**

2 g Kationenaustauscherharz (Lewatit, 1368 Ca/320, Lanxess) wurden sorgfältig mit VE Wasser gewaschen. 10 ml Sulfitablauge wurde der Kationenaustauscher zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Kationenaustauscher abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.5. Entgiftung mit Aktivkohle**

10 ml Sulfitablauge wurden jeweils 2, 5 und 10 wt. % Aktivkohle zugegeben. Die Lösungen wurde 1 h bei 100 rpm gerührt, danach wurde die Aktivkohle abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.6. Entgiftung mit Lignin**

Lignin (Indulin AT) wurde mit VE Wasser so lange gewaschen bis die Waschflüssigkeit farblos war und einen neutralen pH-Wert hatte. 10 ml Sulfitablauge wurden jeweils 2, 5 und 10wt. % Lignin zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Niederschlag abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.7. Entgiftung mit Calciumhydroxid**

10 ml Sulfitablauge wurde so lange Calciumhydroxidpulver zugegeben bis der pH-Wert auf 11 stieg. Die Lösung wurde 3 h bei 60 °C bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Niederschlag abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.8. Entgiftung mit Magnesiumhydroxid**

10 ml Sulfitablauge wurde so lange Magnesiumhydroxidpulver zugegeben, bis der pH-Wert auf 8,5 stieg. Die Lösung wurde 3 h bei 60 °C bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Niederschlag abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.9. Entgiftung mit Ammoniumhydroxid**

10 ml Sulfitablauge wurde so lange Ammoniumhydroxid zugetropft bis der pH-Wert auf 8,5 stieg. Die Lösung wurde 3 h bei 60 °C bei 100 rpm gerührt, danach wurde der Niederschlag abfiltriert. Die Ablauge wurde steril filtriert.

#### **3.8.10. Prüfung von verschiedenen Entgiftungstechniken auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum***

Die Kultivierung von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* erfolgte wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben ist.

Die Effizienz von verschiedenen Entgiftungsmethoden für das Wachstum von Mikroorganismen wurde in einer Mikrotiterplatte getestet. Als Positivkontrolle wurde ein Medium mit einem Zuckergemisch verwendet, welches der Zusammensetzung der Sulfitablauge entspricht: 1,4 mg/l Arabinose, 2,9 mg/l Galaktose, 6,8 mg/l Glukose, 20,09 mg/l Mannose, 8,0 mg/l Xylose. Der pH-Wert der entgifteten und nichtentgifteten Ablauge wurde auf 7 gestellt. Es wurde auch eine Reihe von Verdünnungen der Ablauge hergestellt. Um die Verdünnungsreihe herzustellen, wurde das Medium

mit dem Zuckergehalt aus der Sulfitablauge verwendet. In jedes Well wurden 50 µl Positivkontrolle, bzw. Ablauge unter Formiergasatmosphäre pipettiert. Danach wurden der Lösung 30 µl Kultur zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer durchsichtigen sauerstoffundurchlässigen Klebefolie verschlossen und für 10 h in einen Schüttelinkubator bei 30 °C gestellt. Jede Stunde wurde OD der Lösungen in einem Multiskan Microplate Spectrophotometer bei 600 nm gemessen und die Wachstumskurven erstellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 3.9. Bestimmung von $\gamma$ -Wert und Xanthogenatgruppenverteilung in der Viskose mittels NMR Spektroskopie

#### 3.9.1. Synthesen

##### 3.9.1.1. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid

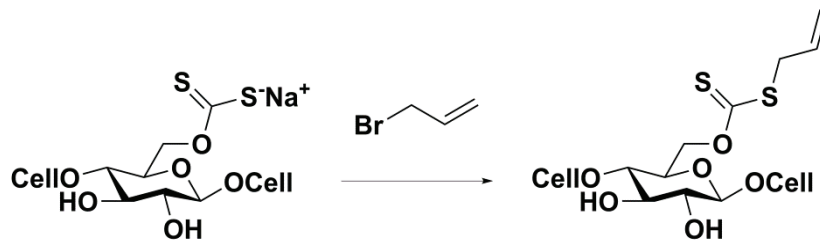


Abbildung 90: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt).

1 g Viskose wurde in 10 ml eisgekühltem VE-Wasser gelöst. 40 ml vorgekühlter Amberlite IRA 402 Ionenaustauscher wurden der Lösung zugegeben und für 10 min unter Eiskühlung gerührt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit 100 ml eisgekühltem VE-Wasser nachgewaschen. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 20 % Essigsäure auf pH 7 eingestellt. 216 µl (2,5 mmol) Allylbromid wurden in 5 ml DMSO gelöst und unter starkem Rühren der Zellulosexanthogenatlösung zugegeben, wobei ein weißes Polymer ausfiel. Die Reaktionsmischung wurde noch für zwei weitere Stunden gekühlt gerührt. Das abgesetzte Polymer wurde abfiltriert und zunächst mit 100 ml VE-Wasser, dann mit 40 ml 1:1 Aceton:H<sub>2</sub>O, darauffolgend mit 20 ml Aceton und schließlich mit 10 ml Diethylether gewaschen. Das stabilisierte Zellulosexanthogenat wurde 20 h am Hochvakuum getrocknet (Abb. 90).

### 3.9.1.2. Acetylierung von allylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit Acetylchlorid

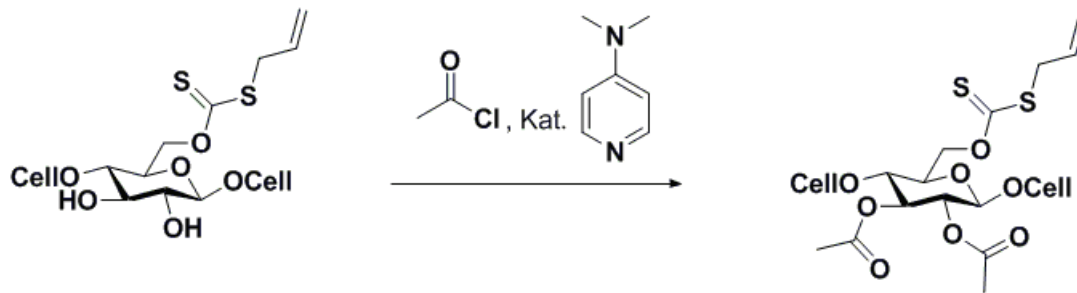


Abbildung 91: Substituierung von allylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit Acetylchlorid (Substituierung an C-2,3 ist dargestellt).

100 mg allylstabilisiertes Zellulosexanthogenat wurden in 8 ml Pyridin gelöst. Der Lösung wurde eine Spatel 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin zugegeben. Der eisgekühlten Reaktionsmischung wurden 178  $\mu$ l (2,5 mmol) Acetylchlorid unter Stickstoffatmosphäre zugetropft. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wurde in einer Wasser/Ethanol 1:1 Mischung unter Rühren ausgefällt, abfiltriert und 20 h am Hochvakuum getrocknet. Es bildete sich ein schwerlösliches Produkt, welches für die Charakterisierung mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie ungeeignet war (Abb. 91).

### 3.9.1.3. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid

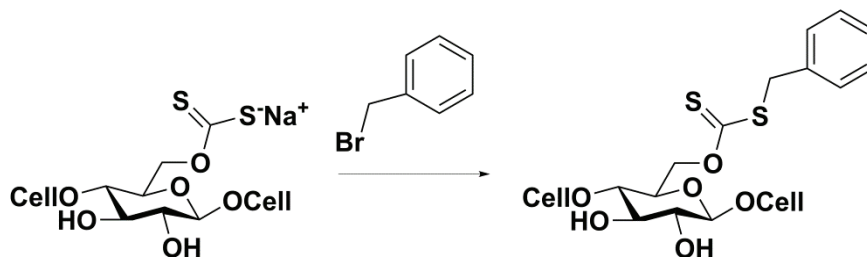


Abbildung 92: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt).

1 g Viskose wurde in 10 ml eisgekühltem VE Wasser gelöst. 40 ml vorgekühlter Amberlite IRA 402 Ionenaustauscher wurde zur Lösung gegeben und für 10 min unter Eiskühlung gerührt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit 100 ml eisgekühltem VE Wasser nachgewaschen. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 20 % Essigsäure auf pH 7 eingestellt. 300  $\mu$ l (2,5 mol) Benzylbromid wurden in 5 ml DMSO gelöst und unter starkem Rühren der Zellulosexanthogenatlösung zugegeben, wobei ein weißes Polymer ausfiel. Die Reaktionsmischung wurde noch für zwei weitere Stunden gekühlt gerührt. Das abgesetzte Polymer wurde abfiltriert und zunächst mit 100 ml VE-Wasser, dann mit 40 ml 1:1 Aceton:H<sub>2</sub>O, darauffolgend mit 20 ml Aceton und schließlich mit 10 ml Diethylether gewaschen. Das stabilisierte Zellulosexanthogenat wurde 20 h am Hochvakuum getrocknet. Danach wurde die Probe bei 80 °C in DMSO-*d*<sub>6</sub> gelöst und mittels  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ge-HSQC NMR Spektroskopie charakterisiert. Für  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie wurde Konzentration von 10 g/l verwendet und für  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC von 60 g/l (Abb. 92).

### 3.9.1.4. Phosphorylierung von benzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (2-Cl-TMDP)

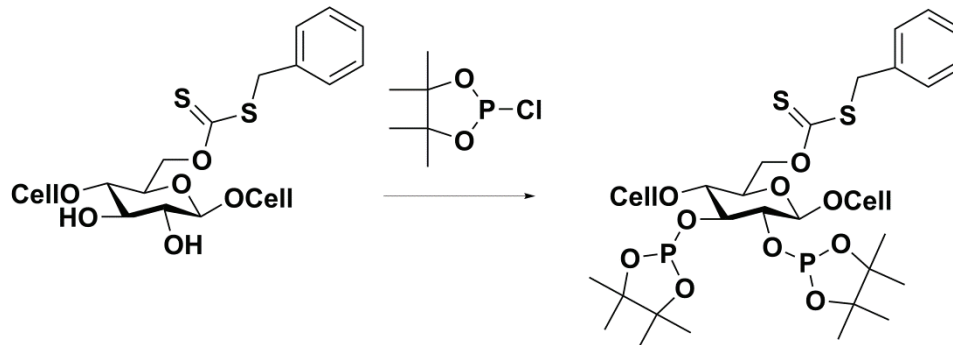


Abbildung 93: Substituierung von benzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit 2-Cl-TMDP (Substituierung an C-2,3 ist dargestellt).

Das für die Reaktion nötige Equipment wurde vor dem Versuch im Trockenschrank getrocknet.

20 mg benzylstabilisiertes Zellulosexanthogenat wurden in ein Schraubglas eingewogen und in 600  $\mu\text{l}$  DMSO- $d_6$  gelöst. Der Lösung wurden 600  $\mu\text{l}$  Pyridin und 30  $\mu\text{l}$  2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (2-Cl-TMDP) zugegeben. Es bildete sich ein schwerlösliches Produkt, welches für die Charakterisierung mittels  $^{31}\text{P}$  NMR Spektroskopie ungeeignet war (Abb. 93).

### 3.9.1.5. Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid

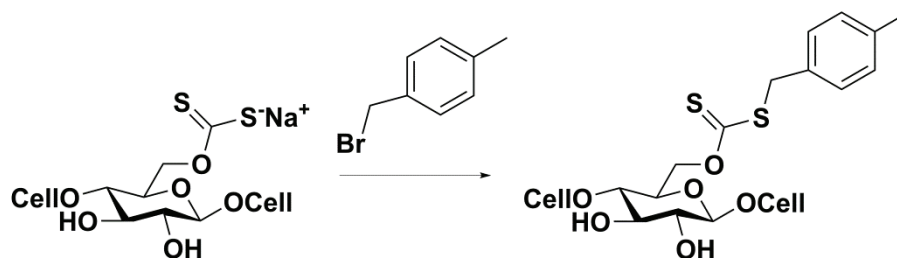


Abbildung 94: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt).

1 g Viskose wurde in 10 ml eisgekühltem VE-Wasser gelöst. 40 ml vorgekühlter Amberlite IRA 402 Ionenaustauscher wurden der Lösung zugegeben und für 10 min unter Eiskühlung gerührt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit 100 ml eisgekühltem VE-Wasser nachgewaschen. 463 mg (2,5 mol) 4-Methylbenzylbromid wurden in 5 ml DMSO gelöst und unter starkem Rühren der Zellulosexanthogenatlösung zugegeben, wobei ein weißes Polymer ausfiel. Die Reaktionsmischung wurde noch für zwei weitere Stunden gekühlt gerührt. Das abgesetzte Polymer wurde abfiltriert und zunächst mit 100 ml VE-Wasser, dann mit 40 ml 1:1 Aceton:H<sub>2</sub>O, darauffolgend mit 20 ml Aceton und schließlich mit 10 ml Diethylether gewaschen. Das stabilisierte Zellulosexanthogenat wurde 20 h am Hochvakuum getrocknet. Danach wurde die Probe bei 80 °C in DMSO- $d_6$  gelöst und mittels NMR Spektroskopie charakterisiert. Für  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie wurde eine Konzentration von 10 g/l verwendet und für  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ge-HSQC eine Konzentration von 60 g/l (Abb. 94).



### 3.9.2. pH-Wert-Optimierung der Stabilisierungsreaktion von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid

#### 3.9.2.1. Vorversuche zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid

Die Vorversuche wurden wie im Kapitel 3.9.1.5. durchgeführt, wobei der pH-Wert vom gelösten Zellulosexanthogenat nicht auf 8-8,5, sondern auf 7 eingestellt wurde, bzw. dieser Schritt ausgelassen wurde (der pH-Wert der Zellulosexanthogenat Lösung blieb 13).

#### 3.9.2.2. Derivatisierung von Cellobiose mit 4-Methylbenzylbromid bei unterschiedlichen pH-Werten

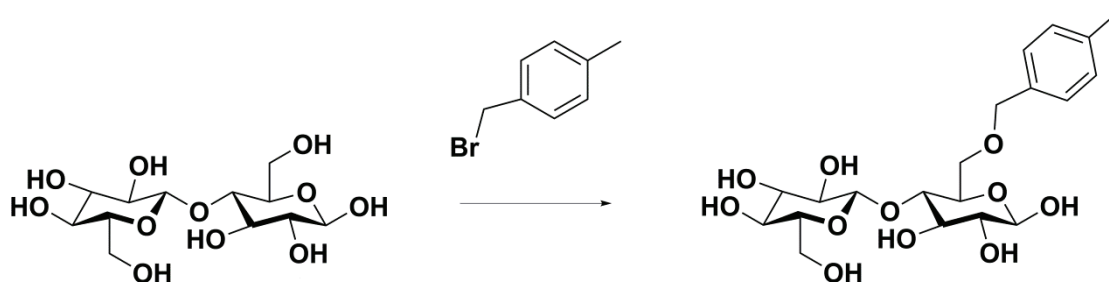


Abbildung 95: Substituierung von Cellobiose mit 4-Methylbenzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt).

5 mg Cellobiose (0,015 mmol) wurden in 700  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. 30 mg (0,162 mmol) 4-Methylbenzylbromid wurden separat in 300  $\mu\text{l}$   $\text{DMSO-d}_6$  gelöst. Beide Lösungen wurden gemischt. Der pH-Wert der Mischung betrug 6. Die Proben wurden mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie charakterisiert. Diese Reaktion wurde bei pH 6, 7, 8, 9 und 10 wiederholt. Die pH-Werte wurden mit NaOD eingestellt (Abb. 95).

#### 3.9.2.3. Regenerierung von Zellulose in saurem Milieu

Das Ausfallen der Zellulose in Zellulosexanthogenatlösung bei verschiedenen pH-Werten wurde durch Messung von Partikelanzahl mit einem PAMAS SBSS Partikelmess-System untersucht. Die Partikelanzahl von 50 ml Viskoselösung mit dem Anfangs-pH-Wert 13 wurde mit volumetrischen Sensorzellen bestimmt. Die Kalibrierung des Partikelzählers erfolgte gemäß Kalibriernormen des NIST (National Institute of Standards and Technology). Die Daten wurden in ASCII Code gespeichert. Zusätzlich wurde die Partikelanzahl von Viskoselösungen mit pH 12, 11, 10, 9, 8 und 7 bestimmt, wobei der pH-Wert mit 20 % Essigsäure eingestellt wurde.

### 3.9.3. Dekonvolution

Die Daten der Spektren des methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenates wurden einer Dekonvolution unterzogen. Die Dekonvolution wurde mit Microsoft Excel 2010 Software mit Hilfe von Lorenzkurven durchgeführt. Die Lorenzkurven wurden im Spektrum so positioniert, dass deren Summe den experimentellen Werten des Spektrums entsprach. Die Peakbreiten wurden durch die Parameterfitting Routine angepasst.

#### 4. Schlussfolgerungen

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von verschiedenen Substanzen aus der Sulfitablauge auf das Wachstum von *Thermoanaerobacter mathranii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* und *Halomonas halophila* untersucht. Dafür wurde das Wachstum von Mikroorganismen mit und ohne Zugabe von potenziellen Inhibitoren verglichen. Die Wachstumskurven wurden durch  $\Delta OD$  Bestimmung erstellt. Viele Phenolderivate (besonders mit Aldehyd-Funktionalität) inhibieren die Fermentation dieser drei Kulturen, wobei *Halomonas halophila* der robusteste Stamm ist. Coniferylaldehyd zeigt die stärkste inhibierende Wirkung auf alle drei Kulturen. Alle anderen Substanzen sind in den eingesetzten Konzentrationen harmlos, bzw. haben einen positiven Effekt auf das Wachstum der getesteten Bakterienstämme. Auch wurde die Kombination aus mehreren phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* untersucht. Es wurden aber keine synergistischen Effekte beobachtet.

In dieser Arbeit wurden Informationen über den Zusammenhang zwischen dem Zellwachstum und der Ethanolproduktion bei *Thermoanaerobacter mathranii* gewonnen. Mittels in Situ  $^1H$  NMR Technik wurde die Änderung der Ethanolkonzentration während der Fermentation bestimmt. Gleichzeitig wurde  $\Delta OD$  der Bakteriensuspension ermittelt. Die Ethanolproduktion hängt direkt mit der Wachstumsrate der Mikroorganismen zusammen. Es wurden auch Änderungen von sieben phenolischen Substanzen während der Fermentation von *Thermoanaerobacter mathranii* mittels  $^1H$  NMR Spektroskopie verfolgt. Dabei stellte sich heraus, dass Coniferylaldehyd zu Coniferylalkohol reduziert wurde. Es wurden auch die strukturellen Änderungen von anderen Phenolen beobachtet, welche eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum aufweisen. Die phenolischen Verbindungen, die für die der getesteten Bakterienstämme nicht wachstumshemmend sind, verändern sich während der Fermentation nicht.

Es wurde nach Methoden zur effektiveren Nutzung von Abfällen aus der Zellstoffindustrie gesucht. Dafür wurde die Sulfitablauge nach verschiedenen Techniken entgiftet und als Substrat für die Fermentation von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* verwendet. Die Entgiftung durch Vorbehandlung mit Peroxidase war die effektivste Methode, was mit einer sehr selektiven enzymatischen Entfernung von Aromaten erklärbar ist. Bei diesem Vorgang werden die Zucker aus der Abflauge nicht abgebaut.

Im zweiten Teil wurde erfolgreich eine Methode entwickelt, welche die Bestimmung der Anzahl von Xanthogenatgruppen und ihre Verteilung in der Viskose mittels  $^1H$  NMR Spektroskopie ermöglicht. Das Zellulosexanthogenat wurde mit 4-Methylbenzylbromid stabilisiert, um alle Xanthogenatgruppen zu fixieren. Die stabilisierte Verbindung wurde mittels  $^1H$  NMR Spektroskopie untersucht.

Die wichtigsten Vorteile dieser Methode gegenüber schon vorhandenen NMR Methoden sind:

1. Der Bedarf von nur einem Syntheseschritt, was Fehler durch eine möglicherweise unvollständige Derivatisierung minimiert.
2. Kurze Messzeiten zur Ermittlung von Spektren mit einer guten Auflösung.
3. Die Möglichkeit, zwischen der Xanthogenierung an der zweiten und der dritten Stelle zu unterscheiden.

Die entwickelte Methode funktioniert mit realen Proben, was die Bestimmung von  $\gamma$ -Wert und Substituentenverteilung in unterschiedlichen Zeitintervallen während des Reifevorgangs ermöglicht, daher kann diese neue Methode für prozessanalytische Messungen in Viskose-Betrieben eingesetzt werden.

## Abkürzungen

2-Cl-TMDP 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan

ABE-Produktion Aceton-Butanol-Ethanol-Produktion

ASCII American Standard Code for Information Interchange

ATR Attenuated Total Reflection

DP Degree of Polymerization

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DSS Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat

HMF Hydroxymethylfurfural

HPIC High-Pressure Ion Chromatography

IR Infrarot

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

NIST National Institute of Standards and Technology

NMR Nuclear Magnetic Resonance

OD Optische Dichte

PAD Pulsed Amperometric Detection

PHA Polyhydroxyalkanoate

PHB Polyhydroxybutyrate

PVDF Polyvinylidendifluorid

PS Polystyrol

RT Raumtemperatur

S/N Signal-to-Noise Ratio

SSL Spent Sulfite Liquor

TCS Tetrachlorsalicylanilid

TEM Transmissionselektronenmikroskopie

TG Trockengehalt

VE Wasser Vollentsalztes Wasser

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellulosestruktur .....	1
Abbildung 2: Chemische Zusammensetzung von Holz.....	3
Abbildung 3: Schema des Sulfat- und Sulfitverfahrens. Der Vorhydrolyseschritt im Sulfatverfahren ist optional und ist nur bei der Chemiezellstoffgewinnung erforderlich .....	4
Abbildung 4: pH Existenzbereiche von während der Kochung vorhandenen Substanzen: Schwefelige Säure, Hydrogensulfit, Sulfit und Carbonat.....	5
Abbildung 5: Möglichkeiten der Nutzung von Sulfitablauge.....	10
Abbildung 6: Drei Stufen der Ethanolproduktion aus unterschiedlichen Substraten.....	12
Abbildung 7: Energetische Vorteile des Einsatzes von thermophilen Mikroorganismen bei der Ethanolherstellung im Vergleich zu herkömmlichen Hefen.....	13
Abbildung 8: Stoffwechselwege von <i>Clostridium acetobutylicum</i> bei der ABE-Fermentation .....	14
Abbildung 9: TEM Aufnahme einer <i>Halomonas halophila</i> Probe, die PHB beinhaltet .....	15
Abbildung 10: Vier Prozessstufen der PHA-Gewinnung.....	16
Abbildung 11: Bildung von potentiellen inhibierenden Substanzen in der Sulfitablauge (Substanzen mit besonders toxischer Wirkung sind rot markiert (Kapitel 2.1. Teil I)) .....	17
Abbildung 12: Funktion der NADPH-Oxidase: NADPH wird zur NADP <sup>+</sup> oxidiert, die Elektronen werden auf die Außenseite der Membran übertragen, dort werden Hyperoxide gebildet, welche durch das Enzym Superoxid-Dismutase in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid überführt werden. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit Hilfe von Katalase zu Sauerstoff und Wasser .....	19
Abbildung 13: Prinzip des Membrantrennverfahrens zur Auftrennung eines lignocellulosischen Hydrolysats .....	22
Abbildung 14: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> . 26	
Abbildung 15: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	26
Abbildung 16: Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	27
Abbildung 17: Einfluss von Natrium Lignosulfonat auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	30
Abbildung 18: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von <i>Halomonas halophila</i> .....	30
Abbildung 19: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von <i>Halomonas halophila</i> .....	31
Abbildung 20: Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von <i>Halomonas halophila</i> .....	31
Abbildung 21: Einfluss von Furanderivaten auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	35
Abbildung 22: Einfluss von Alkoholen auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	35
Abbildung 23: Einfluss von organischen Säuren auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	36
Abbildung 24: Einfluss von Phenol, Coniferylaldehyd und Mischung aus Phenol mit Coniferylaldehyd auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	39
Abbildung 25: Einfluss von Pyrogallol, Coniferylaldehyd und einer Mischung aus Pyrogallol mit Coniferylaldehyd auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	40
Abbildung 26: Einfluss von Pyrogallol, Phenol und einer Mischung aus Pyrogallol mit Phenol auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	40
Abbildung 27: Einfluss von Furfural, HMF und einer Mischung aus Furfural mit HMF auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	41

Abbildung 28: Einfluss von Ameisensäure, Essigsäure und einer Mischung aus Ameisensäure mit Essigsäure auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	41
Abbildung 29: Einfluss von Ethanol, Methanol und einer Mischung aus Ethanol mit Methanol auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	42
Abbildung 30: Einfluss von einzelnen Phenolen, Furanderivaten, organischen Säuren, Alkoholen sowie ihrer Mischung auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	42
Abbildung 31: Einfluss von Gemischen aus jeweils 3 mmol/l Phenol und Pyrogallol, 5 mmol/l Furfural und HMF, 2 mmol/l Ameisensäure und Essigsäure und 2 mmol/l Ethanol und Methanol und seine 1:2 und 1:3 Verdünnungen sowie das Gemisch und seine 1:2 und 1:3 Verdünnungen nach dem Weglassen von einzelnen Substanzgruppen auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	43
Abbildung 32: <sup>1</sup> H NMR Spektrum (D <sub>2</sub> O, 44 MHz) von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> Fermentationsprodukten (Fermentation mit Zugaben von Phenol nach 8 h ist dargestellt) .....	44
Abbildung 33: Platzierung des NMR Röhrchens in der Küvette: Seitenansicht (links), Ansicht von unten (rechts).....	45
Abbildung 34: OD Messung der Bakteriensuspension im NMR Röhrchen: die Probe im NMR Röhrchen in der speziell angefertigten Küvette mit einer Kappe aus Schaumstoff (links); das NMR Röhrchen im Multiskan Microplate Spectrophotometer (rechts) .....	45
Abbildung 35: Ethanolproduktion durch <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> mit und ohne Zugabe von phenolischen Inhibitoren .....	46
Abbildung 36: Wachstumskurven von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> mit und ohne Zugabe von phenolischen Inhibitoren .....	47
Abbildung 37: Änderung der Farbe von Coniferylaldehydlösung in D <sub>2</sub> O (links), im Medium mit Glukose (mitte), im Medium mit Glukose nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (rechts) nach 0, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72h der Inkubation bei 65 °C (die Probenreihenfolge von links nach rechts)	48
Abbildung 38: <sup>1</sup> H NMR Spektrum (D <sub>2</sub> O, 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung in D <sub>2</sub> O während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Die Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 0, 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h.....	48
Abbildung 39: Nummerierung der Protonen von Coniferylaldehyd .....	49
Abbildung 40: <sup>1</sup> H NMR Spektrum (D <sub>2</sub> O, 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung im Medium mit Glukose während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Die Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 0, 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h .....	49
Abbildung 41: Dimerisierungsreaktion von Coniferylaldehyd, welche während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium ohne Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> stattfindet .....	50
Abbildung 42: Umwandlung von Coniferylaldehyd in ein Dimer während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium ohne Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	50
Abbildung 43: <sup>1</sup> H NMR Spektrum (D <sub>2</sub> O, 300 MHz) von Coniferylaldehydänderung im Medium mit Glukose nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> während der 72 h Inkubation bei 65 °C. Das untere Spektrum wurde unmittelbar nach der Zugabe von Mikroorganismen aufgenommen, weitere Probenentnahmen erfolgten (von unten nach oben) nach 1, 2, 5, 8, 13, 24, 48 und 72 h .....	51
Abbildung 44: Nummerierung der Protonen von Coniferylalkohol .....	51
Abbildung 45: Umwandlung von Coniferylaldehyd in Coniferylalkohol und gleichzeitige Dimerisierung von Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol .....	52
Abbildung 46: Umwandlung von Coniferylaldehyd in Coniferylalkohol und gleichzeitige Dimerisierung von Coniferylaldehyd und Coniferylalkohol während der 72 h Inkubation bei 65 °C im Medium nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	52

Abbildung 47: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Ferulasäure vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Ferulasäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Ferulasäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	53
Abbildung 48: Nummerierung der Protonen von Ferulasäure .....	54
Abbildung 49: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Vanillin vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Vanillin nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Vanillin nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	54
Abbildung 50: Nummerierung der Protonen von Vanillin .....	55
Abbildung 51: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Syringaldehyd vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Syringaldehyd nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Syringaldehyd nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	55
Abbildung 52: Nummerierung der Protonen von Syringaldehyd.....	56
Abbildung 53: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Gallussäure vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Gallussäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Gallussäure nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	56
Abbildung 54: Nummerierung der Protonen von Gallussäure.....	57
Abbildung 55: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Phenol vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Phenol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Phenol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	57
Abbildung 56: Nummerierung der Protonen von Phenol .....	57
Abbildung 57: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Medium mit Pyrogallol vor der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (oben), von Medium mit Pyrogallol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C (mitte), von Medium mit Pyrogallol nach der 72 h Inkubation bei 65 °C nach der Zugabe von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> (unten).....	58
Abbildung 58: Nummerierung der Protonen von Pyrogallol.....	58
Abbildung 59: Wachstumverhalten von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> nach der Zugabe von Coniferylaldehyd .....	60
Abbildung 60: Reaktion von Pyrogallol mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase .....	61
Abbildung 61: Abnahme der Gallussäurekonzentration nach Zugabe von 120000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	62
Abbildung 62: Abnahme der Gallussäurekonzentration nach Zugabe von 345000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	62
Abbildung 63: Abnahme von Gallussäure Konzentration während der Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von 345000 U/l Peroxidase und 65,2 mmol $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	63
Abbildung 64: Reaktion von Gallussäure mit Wasserstoffperoxid in Abwesenheit von Peroxidase ....	64
Abbildung 65: Die Lösung von Gallussäure und Peroxidase färbt sich braun nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid, nach Zentrifugieren ist dieser Niederschlag deutlich sichtbar .....	64
Abbildung 66: Vergleich der $^1\text{H}$ NMR Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Gallussäure mit Peroxidase vor (unten) und nach 19 h nach der Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_2$ (oben) .....	64

Abbildung 67: Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase (links), Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase nach 14 min nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid (mitte), Lösung von Coniferylaldehyd und Peroxidase nach 50 min nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid.....	65
Abbildung 68: Vergleich der $^1\text{H}$ NMR Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von Coniferylaldehyd mit Peroxidase vor (unten) und 50 min nach der Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_2$ (oben).....	66
Abbildung 69: Abnahme von Coniferylaldehyd Konzentration während der Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase.....	66
Abbildung 70: Reaktion von Coniferylaldehyd mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase .....	67
Abbildung 71: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von nicht entgifteter sowie durch Peroxidase entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	69
Abbildung 72: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Ionenaustauscher entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	69
Abbildung 73: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Lignin entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	70
Abbildung 74: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Aktivkohle entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	70
Abbildung 75: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von durch Alkalivorbehandlung entgifteter Sulfitablauge (SSL für Spent Sulfite Liquor) auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> .....	71
Abbildung 76: Schema des Viskoseprozesses .....	73
Abbildung 77: Xanthogenatgruppen der Viskose an drei verschiedenen Positionen der Anhydroglukoseeinheit .....	74
Abbildung 78: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt) und Acetylierung mit Acetylchlorid (Acetylierung an C-2,3 ist dargestellt).....	77
Abbildung 79: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt) und Phosphorylierung mit 2-Cl-TMDP (Phosphorylierung an C-2,3 ist dargestellt) .....	78
Abbildung 80: Strategie zur Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid (Stabilisierung an C-6 ist dargestellt).....	78
Abbildung 81: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe .....	79
Abbildung 82: $^{13}\text{C}$ NMR Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe .....	79
Abbildung 83: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ge-HSQC NMR Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300/75 MHz) von einer typischen methylbenzylstabilisierten Zellulosexanthogenatprobe .....	80
Abbildung 84: $^1\text{H}$ NMR Spektrum ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von (a) bei pH 13 methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat und (b) bei pH 7 methylbenzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat. Die Peaks von $\text{OH}_{2,3,6}$ der Zellulose fehlen bei Zellulosexanthogenat, welches im alkalischen Milieu stabilisiert wurde. Das deutet auf die Reaktion von 4-Methylbenzylbromid mit freien Hydroxylgruppen der Zellulose hin.....	81



Abbildung 85: Bestimmung des Zelluloseausfalls in Zellulosexanthogenatlösung bei pH-Werten 7-13 durch Messung der Partikelanzahl .....	81
Abbildung 86: $^1\text{H}$ NMR Spektrum (70 % $\text{D}_2\text{O}$ , 30 % $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) von Cellobiose, welche mit 4-Methylbenzylbromid bei pH 6 (a), pH 7 (b), pH 8 (c), pH 9 (d) and pH 10 (e) derivatisiert wurde. Bei pH-Werten zwischen 6 und 9 findet keine Reaktion zwischen 4-Methylbenzylbromid und OH-Gruppen der Cellobiose statt .....	82
Abbildung 87: Dekonvolution eines typischen $^1\text{H}$ Spektrums von methylstabilisiertem Zellulosexanthogenat: experimentelle Werte (rote Kurve), eingefügte Lorenzkurven (schwarze Kurve), Summe von eingefügten Lorenzkurven (punktierte Kurve) .....	83
Abbildung 88: Vergleich der normierten $\gamma$ -Werte von Industrieproben, welche mittels IR und iodometrischer Titration bestimmt wurden .....	84
Abbildung 89: Beobachtung einer typischen Viskoseprobe im Reifeprozess: Änderung der Substituentenverteilung an der zweiten, dritten und sechsten Position ( $\gamma$ -2, $\gamma$ -3 und $\gamma$ -6) von Zellulosexanthogenat und des gesamt $\gamma$ -Wertes sind dargestellt .....	85
Abbildung 90: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Allylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt) .....	95
Abbildung 91: Substituierung von allylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit Acetylchlorid (Substituierung an C-2,3 ist dargestellt).....	96
Abbildung 92: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit Benzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt) .....	96
Abbildung 93: Substituierung von benzylstabilisiertem Zellulosexanthogenat mit 2-Cl-TMDP (Substituierung an C-2,3 ist dargestellt).....	97
Abbildung 94: Stabilisierung von Zellulosexanthogenat mit 4-Methylbenzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt) .....	97
Abbildung 95: Substituierung von Cellobiose mit 4-Methylbenzylbromid (Substituierung an C-6 ist dargestellt) .....	98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Sulfidverfahrenstechniken.....	7
Tabelle 2: Zusammensetzung der Sulfidablaue aus verschiedenen Holzarten nach saurem Sulfidverfahren.....	8
Tabelle 3: Zusammensetzung der Sulfidablaue.....	9
Tabelle 4: Überblick über die enzymatische Entgiftung von Flüssigströmen aus dem Lignozelluloseaufschluß .....	21
Tabelle 5: Überblick über die chemischen Entgiftungstechniken von Flüssigströmen aus dem Lignozelluloseaufschluss .....	23
Tabelle 6: Vergleich verschiedener Entgiftungstechniken .....	24
Tabelle 7: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	28
Tabelle 8: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Thermoanaerobacter mathranii</i> .....	29
Tabelle 9: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Halomonas halophila</i> .....	33
Tabelle 10: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Halomonas halophila</i> .....	34
Tabelle 11: Einfluss von 3 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i> .....	37
Tabelle 12: Einfluss von 7 mmol/l phenolischen Verbindungen auf das Wachstum von <i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i> .....	38
Tabelle 13: Überblick der wichtigsten NMR Methoden zur Bestimmung von Xanthogenatgruppenverteilung der Viskose.....	75
Tabelle 14: Verdünnungsreihe für die die Kalibrierung .....	87

## Literaturverzeichnis

- Abels, C.; Carstensen, F.; Wessling, M. (2013): Membrane processes in biorefinery applications. In: *Journal of Membrane Science* 444, S. 285–317.
- Adeboye, P. T.; Bettiga, M.; Olsson, L. (2014): The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. In: *AMB Express* 4, S. 46.
- Adsul, M. G.; Singhvi, M. S.; Gaikawai, S. A.; Gokhale, D. V. (2011): Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. In: *Bioresource Technology* 102 (6), S. 4304–4312.
- Akiyama, M.; Tsuge, T.; Doi, Y. (2003): Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. In: *Polymer Degradation and Stability* 80 (1), S. 183–194.
- AL-Adham, I. S. I.; Dinning, A. J.; Eastwood, I. M.; Austin, P.; Collier, P. J. (1998): Cell membrane effects of some common biocides. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21 (1-2), S. 6–10.
- Alves, L. A.; Felipe, M. G. A.; Silva, J. B. A. E.; Silva, S. S.; Prata, A. M. (1998): Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (70-72), S. 89–98.
- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J. (2010): Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. A review. In: *Bioresource Technology* 101 (13), S. 4851–4861.
- Amador-Noguez, D., Brasg, I. A., Feng, X. J., Roquet, N., Rabinowitz, J. D. (2011). Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (22), S. 7984-7997.
- Aristilde, L., Lewis, I. A., Park, J. O., Rabinowitz, J. D. (2015). Hierarchy in pentose sugar metabolism in *Clostridium Acetobutylicum*. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 81 (4), S. 1452-1462.
- Baldinger, T.; Moosbauer, J.; Jary, S. (2003): Method for the Spectroscopic Analysis of Viscose Constituents [WO 03/062818 A1].
- Batt, C. A.; Carvalho, S.; Easson, D. D.; Akedo, M., JR.; Sinskey, A. J. (1986): Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnol. Bioeng.* (28), S. 549–559.
- Bernardes, M. A. D. S. (Hg.) (2011): Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. In: *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects: InTech*.
- Björklund, L.; Larsson, S.; Jönsson, L. J.; Reimann, A.; Nilvebrant, N. O. (2002): Treatment with lignin residue. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (98-100), S. 563–575.
- Borrion, A. L.; McManus, M. C.; Hammond, G. P. (2012): Environmental life cycle assessment of lignocellulosic conversion to ethanol. A review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (7), S. 4638–4650.
- Brethauer, S.; Wyman, C. E. (2010): Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. In: *Bioresource Technology* 101 (13), S. 4862–4874.

- Bryan, P. (2009): Integrated mechanical vapor recompression (MVR) and membrane vapor permeation process for ethanol recovery (ethanol dehydration) from fermentation broth [US 2011/0318800A].
- Canilha, L.; Chandel, A. K.; dos Santos Milessi T. S.; Antunes, F. A. F.; da Costa Freitas, W. L.; Felipe M. G. A.; da Silva, S. S. (2012): Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol. An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (7), S. 1–15.
- Cantarella, M.; Cantarella, L.; Gallifuoco, A.; Spera, A.; Alfani, F. (2004): Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. In: *Process Biochemistry* 39 (11), S. 1533–1542.
- Cardona, C. A.; Sanchez, O. J. (2007): Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. In: *Bioresource Technology* 98 (12), S. 2415–2457.
- Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A.; Ramesh C. K. (2007): Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. In: *Bioresource Technology* 98, S. 1947–1950.
- Cheng, C.-L.; Lo, Y.-C.; Lee, K.-S.; Lee, D.-J.; Lin, C.-Y.; Chang, J.-S. (2011): Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. In: *Bioresource Technology* 102 (18), S. 8514–8523.
- Cho, D. H.; Lee, Y. J.; Um, Y.; Sang, B.-I.; Kim, Y. H. (2009): Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 83 (6), S. 1035–1043.
- Clark, T. A.; Mackie, K. L. (1984): Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. In: *J. Chem. Tech. Biotechnol* (34B), S. 101–110.
- Converti, A.; Domínguez, J. M.; Perego, P.; da Silva, S. S.; Zilli, M. (2000): Wood Hydrolysis and Hydrolyzate Detoxification for Subsequent Xylitol Production. In: *Chem. Eng. Technol.* 23 (11), S. 1013–1020.
- Dence, C. W. (1992): The determination of lignin. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Dominiak, K. (2010): <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Substituentenverteilung in Cellulosexanthogenaten, Technical University Berlin.
- Dominiak, K.; Ebeling, H.; Kunze, J.; Fink, H. P. (2011): <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopical Investigations of the Substituent Distribution in Cellulose Xanthates. In: *Lenzinger Berichte* 89, S. 132–141.
- Dunford, N. T. (Hg.) (2012): Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing. USA: Wiley-Blackwell.
- Dusseaux, S.; Croux, C.; Soucaille, P.; Meynial-Salles, I. (2013): Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. In: *Metabolic engineering* 18, S. 1–8.
- Endres, H. J.; Siebert-Raths, A. (2011): Manufacture and Chemical Structure of Biopolymers. In: Engineering biopolymers: markets, manufacturing, properties and applications. Munich: Carl Hanser.
- Ezeji, T.; Qureshi, N.; Blaschek, H. P. (2007): Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 97 (6), S. 1460–1469.

- Fatehi, P. (2013): Production of Biofuels from Cellulose of Woody Biomass. In: *Cellulose - Biomass Conversion: InTech* (3).
- Fernandes, D. L. A.; Silva, C. M.; Xavier, A. M. R. B.; Evtuguin, D. V. (2012): Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. In: *Journal of Biotechnology* 162, S. 415–421.
- Ferrari, M. D.; Neirotti, E.; Albornoz, C.; Saucedo, E. (1992): Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 40 (7), S. 753–759.
- Frederick, W. J.; Lien, S. J.; Courchene, C. E.; DeMartini, N. A.; Ragauskas, A. J.; Lisa, K. (2008): Co-production of ethanol and cellulose fiber from Southern Pine. A technical and economic assessment. In: *Biomass and Bioenergy* 32 (12), S. 1293–1302.
- Freier-Schröder, D.; Wiegel, J.; Gottschalk, G. (1989): Butanol formation by *Clostridium thermosaccharolyticum* at neutral pH. In: *Biotechnology letters* (11), S. 831–836.
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002): A review of the production of ethanol from softwood. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (6), S. 618–628.
- Gelb, R. I.; Schwartz, L. M.; Bradshaw, J. J.; Laufer, D. A. (1980): Acid Dissociation of Cyclohexaamylose and Cycloheptaamylose. In: *Bioorganic Chemistry* 9, S. 299–304.
- Gelb, R. I.; Schwartz, L. M.; Laufer, D. A. (1982): Acid Dissociation of Cyclooctaamylose. In: *Bioorganic Chemistry* 11, S. 274–280.
- Gheshlaghi, R.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M.; Chou, C. P. (2009): Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. In: *Biotechnology advances* 27 (6), S. 764–781.
- Giordano, A.; Vella, F. M.; Romano, I.; Gambacorta, A. (2007): Structural elucidation of a novel phosphoglycolipid isolated from six species of *Halomonas*. In: *Journal of lipid research* 48 (8), S. 1825–1831.
- González-García, S.; Gasol, C. M.; Gabarrell, X.; Rieradevall, J.; Moreira, M. T.; Feijoo, G. (2009): Environmental aspects of ethanol-based fuels from *Brassica carinata*. A case study of second generation ethanol. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (9), S. 2613–2620.
- Götze, K. (1967): *Chemiefasern nach dem Viskoseverfahren*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer (3).
- Grzenia, D. L.; Schell, D. J.; Wickramasinghe, S. R. (2008): Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. In: *Journal of Membrane Science* 322 (1), S. 189–195.
- Grzenia, D. L.; Dong, R. W.; Jasuja, H.; Kipper, M. J.; Qian, X.; Wickramasinghe, S. R. (2012): Conditioning biomass hydrolysates by membrane extraction. In: *Journal of Membrane Science* 415–416, S. 75–84.
- Grzenia, D. L.; Schell, D. J.; Wickramasinghe, S. R. (2010): Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction. In: *Journal of Membrane Science* 348 (1-2), S. 6–12.
- Guan, Z.; Johnston, N. C.; Aygun-Sunar, S.; Daldal, F.; Raetz, C. R. H.; Goldfine, H. (2011): Structural characterization of the polar lipids of *Clostridium novyi* NT. Further evidence for a novel anaerobic biosynthetic pathway to plasmalogens. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1811 (3), S. 186–193.

- Guldt, A. (2012): Sustainability in the Lenzing Group. In-house Pulp Production. Lenzing: <http://www.lenzing.com/en/press/publications/sustainability-reports.html>.
- Hamilton, W. A. (1968): The Mechanism of the Bacteriostatic Action of Tetrachlorosalicylanilide : a Membrane-active Antibacterial Compound. In: *Journal of General Microbiology* (50), S. 441–458.
- Hämmerle, F. M. (2011): The cellulose gap (the future of cellulose fibres). In: *Lenzinger Berichte* 89, S. 12–21.
- Heinze, T. (1998): New ionic polymers by cellulose functionalization. In: *Macromol. Chem. Phys.* 199 (11), S. 2341–2364.
- Heipieper, H. J.; Diefenbach, R.; Keweloh, H. (1992): Conversion of *cis* Unsaturated Fatty Acids to *trans*, a Possible Mechanism for the Protection of Phenol-Degrading *Pseudomonas putida* P8 from Substrate Toxicity. In: *Applied and environmental microbiology* (58), S. 1847–1852.
- Heipieper, H. J.; Weber, F. J.; Sikkema, J.; Keweloh, H.; de Bont, J. A. M. (1994): Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. In: *Trends in Biotechnology* 12 (10), S. 409–415.
- Helle, S. S.; Lin, T.; Duff, S. J. B. (2008): Optimization of spent sulfite liquor fermentation. In: *Enzyme and Microbial Technology* 42 (3), S. 259–264.
- Helle, S. S.; Murray, A.; Lam, J.; Cameron, D. R.; Duff, S. J. B. (2004): Xylose fermentation by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in spent sulfite liquor. In: *Bioresource Technology* 92 (2), S. 163–171.
- Hotchkiss, R. D. (1944): Gramicidin, Tyrocidine, and Tyrothricin. In: *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology* (4), S. 153–199.
- Hugo, W. B. (1967): The Mode of Action of Antibacterial Agents. In: *Journal of applied microbiology* (30), S. 17–50.
- Hugo, W. B.; Longworth, A. R. (1965): Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 17 (1), S. 28–32.
- Ingram, L. O. N.; Buttke, T. M. (1985): Effects of Alcohols on Micro-Organisms. In: *Advances in Microbial Physiology* (25), S. 253–300.
- Ito, T.; Hayase, R.; Kaway, S.; Ohashi, H.; Higuchi, T. (2002): Coniferyl aldehyde dimers in dehydrogenative polymerization: model of abnormal lignin formation in cinnamyl alcohol dehydrogenase-deficient plants. In: *Journal of Wood Science* (48), S. 216–221.
- Jönsson, L. J.; Martin, C. (2016): Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. In: *Bioresource Technology* 199, S. 103–112.
- Jönsson, L. J.; Palmqvist, E.; Nilvebrant, N. O.; Hahn-Hägerdal, B. (1998): Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, S. 691–697.
- Kaltschmitt, M.; Hartmann, H.; Hofbauer, H. (2016): Energie aus Biomasse. Berlin Heidelberg: Springer(3).
- Kamide, K.; Kowsaka, K.; Okajima, K. (1987): <sup>13</sup>C NMR Study on the Distribution of Substituent Groups on Trihydric Alcohol Units in Cellulose Xanthate. In: *Polymer Journal* (19), S. 231–240.

- Kitagawa, S.; Kametani, F.; Tsuchiya, K.; Sakurai, H. (1990): ESR analysis with long-chain alkyl spin labels in bovine blood platelets. Relationship between the increase in membrane fluidity by alcohols and phenolic compounds and their inhibitory effects on aggregation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* (1027), S. 123–129.
- Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. (2005): Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. In: *Angew.Chem.Int.Ed.* 44, S. 3358–3393.
- Klinke, H. B.; Thomsen, A. B.; Ahring, B. K. (2001): Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (5-6), S. 631–638.
- Klinke, H. B.; Thomsen, A. B.; Ahring, B. K. (2004): Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (1), S. 10–26.
- König, L.; Dörig, R.; Postel, S. (1993): <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen an <sup>13</sup>C-markierten Cellulosexanthogenaten. In: *Das Papier* (11), S. 641–644.
- Lafferty, R. M.; Braunegg, G.(1985): Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure [EP 0144017A1].
- Lanieri, D. B.; Olmos, G. V.; Alberini, I. C.; Maximino, M. G. (2014): Rapid Estimation of Gamma Number of Viscose by UV Spectrophotometry. In: *O Papel* 75 (2), S. 60–65.
- Lardy, H. A.; Elvehjem, C. A. (1945): Biological Oxidations and Reductions. In: *Annual Review of Biochemistry* (14), S. 1–30.
- Larsen, L.; Nielsen, P.; Ahring, B. K. (1997): *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. In: *Archives of Microbiology* 168 (2), S. 114–119.
- Larsson, S.; Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Tengborg, C.; Stenberg, K.; Zacchi, G.; Nilvebrant, N. O. (1999a): The generation of fermentation inhibitors during dilute acidhydrolysis of softwood. In: *Enzyme and Microbial Technology* (24), S. 151–159.
- Larsson, S.; Reimann, A.; Nilvebrant, N. O.; Jönsson, L. J. (1999b): Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (77-79), S. 91–103.
- Lee, S. Y.; Park, J. H.; Jang, S. H.; Nielsen, L. K.; Kim, J.; Jung, K. S. (2008): Fermentative butanol production by Clostridia. In: *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2), S. 209–228.
- Liu, K.; Atiyeh, H. K.; Pardo-Planas, O.; Ramachandriya, K. D.; Wilkins, M. R.; Ezeji, T. C. et al. (2015): Process development for biological production of butanol from Eastern redcedar. In: *Bioresource Technology* 176, S. 88–97.
- Lopez, M. J.; Nichols, N. N.; Dien, B. S.; Moreno, J.; Bothast, R. J. (2004): Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (1), S. 125–131.
- Lundberg, J.; Turbak, A. (1984): *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: Wiley (3).

- Marques, A. P.; Evtuguin, D. V.; Magina, S.; Amado, F. M. L.; Prates, A. (2009): Chemical composition of spent liquors from acidic magnesium-based sulphite pulping of *Eucalyptus globulus*. In: *Journal of Wood Chemistry and Technology* 29, S. 322–336.
- Martin, C.; Galbe, M.; Wahlbom, C. F.; Hahn-Hägerdal, B.; Jönsson, L. J. (2002): Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 31, S. 274–282.
- Martinez, A.; Rodriguez, M. E.; Wells, M. L.; York, S. W.; Preston, J. F.; Ingram, L. O. (2001): Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. In: *Biotechnology progress* 17 (2), S. 287–293.
- Martinez, A.; Rodriguez, M. E.; York, S. W.; Preston, J. F.; Ingram, L. O. (2000): Effects of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. In: *Biotechnol. Bioeng.* 69 (5), S. 526–536.
- Maskow, T. (2008): Verfahren zur simultanten Produktion von PHA und kompatiblen Soluten in halophilen Bakterien [DE 102008045237A1].
- Mayer, W.; Hoffmann, E. H.; Lösch, N.; Wolf, H.; Wolter, B.; Schilling, G. (1984): Dehydrierungsreaktionen mit Gallussäureestern. In: *Liebigs Annalen der Chemie*, S. 929–938.
- Mendez-Vilas A. (2010): Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.
- Millati, R.; Niklasson, C.; Taherzadeh, M. J. (2002): Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Process Biochemistry* (38), S. 515–522.
- Mills, T. Y.; Sandoval, N. R.; Gill, R. T. (2009): Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology for biofuels* 2, S. 26.
- Mitsuda, H.; Murakami, K.; Kawai, F. (2014): Effect of Chlorophenol Analogues on the Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 27 (5), S. 366–372.
- Miyazaki, K.; Arai, S.; Iwamoto, T.; Takasaki, M.; Tomoda, A. (2004): Metabolism of Pyrogallol to Purpurogallin by Human Erythrocytic Hemoglobin. In: *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* (203), S. 319–330.
- Moreno, A. D.; Ibarra, D.; Fernández, J. L.; Ballesteros, M. (2012): Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. In: *Bioresource Technology* 106, S. 101–109.
- Mussatto, S. I.; Dragone, G.; Guimaraes, P. M. R.; Silva, J. P. A.; Carneiro, L. M.; Roberto, I. C. et al. (2010): Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. In: *Biotechnology advances* 28 (6), S. 817–830.
- Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. (2004): Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. In: *Bioresource Technology* 93 (1), S. 1–10.
- Nilvebrant, N. O.; Reimann, A.; Larsson, S.; Jönsson, L. J. (2001): Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (91-93), S. 35–49.



- Olsson, Lisbeth; Hahn-Hägerdal, Bärbel (1996): Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. In: *Enzyme and Microbial Technology* 18, S. 312–331.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. (2000a): Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. In: *Bioresource Technology* 74, S. 17–24.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. (2000b): Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. In: *Bioresource Technology* (74), S. 25–33.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Szengyel, Z.; Zacchi, G.; Reczey, K. (1997): Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. In: *Enzyme and Microbial Technology* (20), S. 286–293.
- Palmqvist, E.; Grage, H.; Meinander, N. O.; Hahn-Hägerdal, B. (1999): Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. In: *Biotechnol. Bioeng.* (63), S. 46–55.
- Pampulha, M. E.; Loureiro-Dias, M. C. (1989): Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. In: *Appl Microbiol Biotechnol* (31), S. 547–550.
- Parajo, J. C.; Dominguez, H.; Dominguez, J. M. (1997): Improved xylitol production with Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. In: *Enzyme and Microbial Technology* (21), S. 18–24.
- Parisutham, V.; Kim, T. H.; Lee, S. K. (2014): Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. In: *Bioresource Technology* 161, S. 431–440.
- Park, E. S.; Moon, W. S.; Song, M. J.; Kim, M. N.; Chung, K.H.; Yoon, J. S. (2001): Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. In: *International Biodeterioration and Biodegradation* (47), S. 209–214.
- Pasha, C.; Kuhad, R. C.; Rao, L. V. (2007): Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS<sub>3</sub> strain for better utilization of lignocellulosic substrates. In: *Journal of applied microbiology* 103 (5), S. 1480–1489.
- Pereira, S. R.; Ivanusa, S.; Evtuguin, D. V.; Serafim, L. S.; Xavier, A. M. R. B. (2012): Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: a way to boost the production of second generation bioethanol. In: *Bioresource Technology* 103 (1), S. 131–135.
- Petersen, A. M.; Haigh, K.; Gördens, J. F. (2014): Techno-economics of integrating bioethanol production from spent sulfite liquor for reduction of greenhouse gas emissions from sulfite pulping mills. In: *Biotechnology for biofuels* (7), S. 2–14.
- Petronio, M. S.; Zeraik, M. L.; da Fonseca, L. M.; Ximenes, V. F. (2013): Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 18 (3), S. 2821–2839.
- Pinchot, G. B. (1967): The Mechanism of Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by 2,4-Dinitrophenol. In: *J. Biol. Chem.* (242), S. 4577–4583.
- Qureshi, N.; Bowman, M. J.; Saha, B. C.; Hector, R.; Berhow, M.A.; Cotta, M. A. (2012): Effect of cellulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. In: *Food and Bioproducts Processing* (90), S. 533–540.

- Rainey, F. A.; Oren, A. (2006): *Extremophiles*. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press (1).
- Ramey, D.; Yang, S. T. (2004): *Production of Butyric Acid and Butanol from Biomass*. U.S. Department of Energy. Morgantown, WV.
- Ranatunga, T. D.; Jervis, J.; Helm, R. F.; McMillan, J. D.; Wooley, R. J. (2000): The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. In: *Enzyme and Microbial Technology* (27), S. 240–247.
- Ravindran, R.; Jaiswal, A. K. (2016): A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. In: *Bioresource Technology* 199, S. 92–102.
- Ren, N.-Q.; Zhao, L.; Chen, C.; Guo, W.-Q.; Cao, G.-L. (2016): A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H<sub>2</sub>: Key challenges and new insights. In: *Bioresource Technology* 215, S. 92–99.
- Reuben, J. (1984): Description and Analysis of (Hydroxyethyl)cellulose. In: *Macromolecules* 17, S. 156–161.
- Reuben, J. (1986): Analysis of the <sup>13</sup>C-NMR. Spectra of Hydrolysed and Methanolysed *o*-Methylcelluloses: Monomer Compositions and Models for their Description. In: *Carbohydr.Res.* 157, S. 201–213.
- Reuben, J. (1987): Analysis of the Carbon-13 NMR Spectrum of Methanolysed *o*-Ethylcellulose: Monomer Composition and Models for its Description. In: *Carbohydr.Res.* 161, S. 23–30.
- Richardson, S.; Gorton, L. (2003): Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives. In: *Analytica Chimica Acta* 497, S. 27–65.
- Rigoulet, M.; Devin, A.; Averet, N.; Vandais, B.; Guerin, B. (1996): Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. In: *Eur. J. Biochem.* (241), S. 280–285.
- Rodrigues, R. C. L. B.; Felipe, M. G. A.; Silva, J. B. A.; Vitolo, M.; Gómez, P. V. (2001): The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. In: *Braz. J. Chem. Eng.* 18 (3), S. 1–16.
- Rogovin, Z. A. (1982): *Chemiefasern: Chemie - Technologie*. Stuttgart: Thieme (Wilhelm Albrecht).
- Rottenberg, H. (1990): Decoupling of oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1018 (1), S. 1–17.
- Rydholm, S. A. (1965): *Pulping Processes*. Florida: Krieger Publishing Co. Inc.
- Salemme, L.; Olivieri, G.; Raganati, F.; Salationo, P.; Marzochella, A. (2016): Analysis of the energy efficiency of some butanol recovery processes. In: *Chemical Engineering Transactions* 49, S. 109–114.
- Sanchez, O. J.; Cardona, C. A. (2008): Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. In: *Bioresource Technology* 99 (13), S. 5270–5295.
- Sangster, J. (1997): *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. Wiley.

- Schuster, K. C.; van den Heuvel, R.; Gutierrez, N. A.; Maddox, I. S. (1998): Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (6), S. 669–676.
- Schwaighofer, A.; Zuckerstätter, G.; Schlagnitweit, J.; Sixta, H.; Müller, N. (2011): Determination of the xanthate group distribution on viscose by liquid-state <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, S. 2449–2456.
- Shen, L.; Patel, M. K. (2010): LCA single score analysis of man-made cellulose fibres. In: *Lenzinger Berichte* 88, S. 60–66.
- Sixta, H. (2006): Handbook of pulp. Weinheim: Wiley-VCH (1).
- Sjöde, A.; Frölander, A.; Lersch, M.; Rodrud, G.: Lignocellulosic Biomass Conversion [PCT/EP2009/009046].
- Sjöström, E. (1993): Wood Chemistry-Fundamentals and Applications: Elsevier/Academic Press (2).
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, C. (2012): Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618.
- Smole, M. S.; Hribernik, S.; Kleinschek, K. S.; Kreze, T. (2013): Plant Fibres for Textile and Technical Applications. In: *Advances in Agrophysical Research: InTech*.
- Stoutenburg, R. M.; Perrotta, J. A.; Nakas, J. P. (2011): Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and adaptation of *Pichia stipitis*. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38 (12), S. 1939–1945.
- Stratford, M.; Nebe-von-Caron, G.; Steels, H.; Novodvorska, M.; Ueckert, J.; Archer, D. B. (2013): Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *International journal of food microbiology* 161 (3), S. 164–171.
- Stratford, M.; Plumridge, A.; Nebe-von-Caron, G.; Archer, D. B. (2009): Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. In: *International journal of food microbiology* 136 (1), S. 37–43.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002): Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. In: *Bioresource Technology* (83), S. 1–11.
- Survase, S. A.; Sklavounos, E.; Jurgens, G.; Van Heiningen, A.; Granström, T. (2011): Continuous acetone-butanol-ethanol fermentation using SO<sub>2</sub>-ethanol-water spent liquor from spruce. In: *Bioresource Technology* 102, S. 10996–11002.
- Tashiro, Y.; Takeda, K.; Kobayashi, G.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A.; Yoshino, S. (2004): High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-Stat continuous butyric acid and glucose feeding method. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (4), S. 263–268.
- Tauber, H. (1953): Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. In: *J. Biol. Chem.* (205), S. 395–400.
- Tesfaw, A.; Assefa, F. (2014): Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. In: *International Scholarly Research Notices* 2014 (3), S. 1–11.

- Tran, A. V.; Chambers, R. P. (1985): Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis*. In: *Biotechnology letters* (7), S. 841–846.
- Vertes, A. A.; Qureshi, N.; Blaschek, H. P.; Yukawa, H. (2010): Biomass to Biofuels. United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Villegas, J. D.; Gnansounou, E. (2008): Techno-economic and environmental evaluation of lignocellulosic biochemical refineries: need for a modular platform for integrated assessment (MPIA). In: *Journal of Scientific & Industrial Research* (67), S. 927–940.
- Wang, Y.; Yin, J.; Chen, G.-Q. (2014): Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. In: *Current opinion in biotechnology* 30, S. 59–65.
- Weissgram, M.; Gstöttner, J.; Lorantfy, B.; Tenhaken, R.; Herwig, C.; Weber, H. (2015a): Generation of PHB from Spent Sulfite Liquor Using Halophilic Microorganisms. In: *Microorganisms* 3 (2), S. 268–289.
- Weissgram, M.; Ters, T.; Weber, H.; Herwig, C. (2015b): Investigating the potential of thermophilic species for ethanol production from industrial spent sulfite liquor. In: *AIMS Energy* 3 (4), S. 592–611.
- Weng, Y.-X.; Wang, X.-L.; Wang, Y.-Z. (2011): Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. In: *Polymer Testing* 30 (4), S. 372–380.
- Wickramasinghe, S. R.; Grzenia, D. L. (2008): Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. In: *Desalination* (234), S. 144–151.
- Wynn, J.; Fore, W. (1965): The Effect of Hindered Phenols on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. In: *The Journal of Biological Chemistry* (240), S. 1766–1771.
- Xavier, A. M. R. B.; Correia, M. F.; Pereira, S. R.; Evtuguin, D. V. (2010): Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. In: *Bioresource Technology* 101 (8), S. 2755–2761.
- Zellcheming Merkblatt III/21/72 (1972). Veresterungsgrad (Gammawert) des Cellulose-xanthogenates nach dem Ionenaustausch-Verfahren (Batch-Methode). Darmstadt: Verein Zellcheming.
- Zhuang, J.; Liu, Y.; Wu, Z.; Sun, Y.; Lin, L. (2009): Hydrolysis of wheat straw hemicellulose and detoxification of the hydrolysate for xylitol production. In: *BioResources* (4), S. 674–686.