

# Sensorbasierte Analyse und Optimierung der thermischen Vorbehandlung und enzymatischen Hydrolyse von Lignocellulose-Biomasse

*Tianyi Guo<sup>1</sup>, Joshua Zilliken<sup>1</sup> und Nils Tippkötter<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Bioverfahrenstechnik und Downstream Processing, FH Aachen, Jülich, Deutschland  
Kontakt: Guo@fh-aachen.de*

## Einleitung

Die katalytische Umwandlung pflanzlicher Polysaccharide in Biokunststoffe und Grundchemikalien ist ein bedeutender Fortschritt in Richtung nachhaltiger Produktionsmethoden. Lignocellulose, die als Hauptbestandteil der Pflanzenbiomasse in großen Mengen verfügbar ist, besteht aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Diese Komponenten bieten wertvolle Bausteine für Plattformchemikalien und biobasierte Materialien [1]. Die hohe strukturelle Stabilität der Lignocellulose macht sie jedoch widerstandsfähig gegen enzymatische Depolymerisation, was die Verarbeitung erschwert und effiziente thermische Vorbehandlungen erforderlich macht, um die enzymatische Hydrolyse zu verbessern [2].

Im Rahmen dieses Projekts konzentrieren wir uns auf die sensorbasierte Analyse und Optimierung der thermischen Vorbehandlung sowie der enzymatischen Hydrolyse, um die Effizienz der Lignocellulose-Umwandlung zu steigern. Ein solches Vorgehen erhöht die Produktivität und unterstützt eine nachhaltige Kreislaufwirtschaft [3]. Darüber hinaus wird in diesem Projekt an der automatisierten sensorbasierten Methode zu dem schnellen Organosolv-Aufschluss von Biomasse-Proben sowie der anschließenden Analyse der Ergebnisse entwickelt. Hierbei werden automatische Mikrowellenaufschlussysteme sowie auf Sensoren basierende Fluoreszenzanalysetechniken eingesetzt. Dies ermöglicht eine schnelle und effiziente Parameter-Screening und unterstützt die Optimierung von Verfahrensbedingungen für eine gezielte Lignin-Extraktion.

## Methoden und Materialien

### Rohmaterial

In dieser Studie wurde Weizenstroh aus Nordrhein-Westfalen, Deutschland, verwendet. Das Stroh wurde auf dem Feld geerntet, in Ballenform gepresst und anschließend im Labor bis zur Verwendung gelagert.

### Mikrowellenaufschluss

Der Aufschluss nach dem Organosolv-Verfahren wurde in einer Mikrowelle (Discover SP-D, CEM GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Etwa 1 g Trockenmasse (TM) der Proben wurde in 80 mL-Reaktionsgefäßen eingewogen (XA204DR METTLER TOLEDO, USA) Anschließend wurde eine

60 % Ethanol-Wasser-Lösung in unterschiedlichen Flottenverhältnissen zugegeben.

Zur Optimierung des Aufschlussprozesses wurden verschiedene Parameter variiert, darunter Extraktionszeit, Temperatur, Flottenverhältnis und Katalysatorkonzentration.

### Reinigung der Probe

Nach dem Organosolv-Aufschluss wurden die Proben gereinigt. Die Reinigung erfolgte in drei Schritten, die jeweils bei 60 °C und für eine Dauer von 10 Minuten durchgeführt wurden. Die spezifischen Schritte der Waschung sind in Tabelle 1 aufgeführt. Um eine gleichmäßige Reinigung der Proben sicherzustellen, wurden diese während des gesamten Reinigungsvorgangs kontinuierlich gerührt.

**Tab. 1:** Reinigungsprotokoll für die Organosolv-Proben

Wasch-schritte	Lösemittel	Flottenverhältnis
1	60 % EtOH/Wasser	1:5
2	Wasser	1:20
3	Wasser	1:10

### Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse wurde an den Proben nach der Reinigung durchgeführt. Dazu wurden die Proben in Zentrifugenröhrchen eingewogen, und pro 1 g Trockenmasse (XA204DR METTLER TOLEDO, USA) wurden 25 mL Natriumacetat-Puffer hinzugegeben. Der Puffer wurde durch Mischen von 1 M Essigsäure und 1 M Natriumacetat auf eine Konzentration von 1 M eingestellt und auf pH 5,0 eingestellt. Die Proben wurden anschließend für 2 Stunden bei 77 °C pasteurisiert (UNE 500, Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland). Nach der Pasteurisierung wurde 30 % (w/w) einer Cellic CTec2<sup>®</sup> Enzymlösung (Sigma, Deutschland) entsprechend der Trockenmasse der Probe hinzugefügt. Die Röhrchen wurden danach für 72 Stunden in einem Rotator (RM-2M, neoLab Migge GmbH, Deutschland) bei 55 °C und einer Geschwindigkeit von 10 U/min inkubiert (UNE 500, Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland). Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Proben in 1,5 mL Kunststoffreaktionsgefäße pipettiert und durch Erhitzen auf 90 °C für 5 Minuten inaktiviert.

### Fluoreszenzanalyse

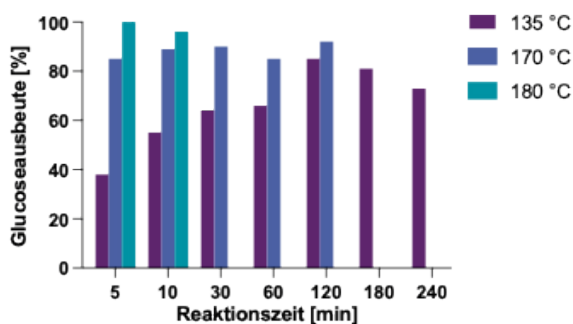
Die Proben wurden zuvor in etwa  $3 \times 3$  mm große Stücke zerkleinert. Für die Analyse der Proben betrug die Anregungswellenlänge 353 nm und die Emissionswellenlänge 465 nm.

## Ergebnisse

In dieser Studie wurden zur Optimierung des Mikrowellenaufschlussprozesses verschiedene Parameter variiert, darunter Extraktionszeit, Temperatur, Flottenverhältnis und Katalysatorkonzentration. Nach dem Aufschlussprozess wurden die Proben gereinigt und einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen.

### Temperatur und Reaktionszeit Validierung

Um den Einfluss der Temperatur und Reaktionszeit beim Mikrowellen-Organosolv-Aufschluss auf die Proben sowie auf die anschließenden Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse zu untersuchen, wurde der Aufschluss bei 135 °C, 170 °C und 180 °C durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Reaktionszeiten von 5 bis 240 Minuten getestet.



**Abb. 1:** Optimierung des Mikrowellenaufschlussprozesses, Temperatur und Reaktionszeit Validierung

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 1), dass sich die Effizienz des Aufschlusses mit steigender Temperatur deutlich erhöht. Bereits bei 180 °C und einer Reaktionszeit von nur 5 Minuten wurde eine Glucoseausbeute von 100 % erreicht. Gleichzeitig ließ sich beobachten, dass auch eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer sichtbaren Verbesserung der nachfolgenden enzymatischen Hydrolyseergebnisse führte, insbesondere bei einer Aufschluss-Temperatur von 135 °C. Hier stieg die Glucoseausbeute von 38 % bei 5 Minuten Reaktionszeit auf 85 % bei 120 Minuten.

Beim Aufschluss bei 170 °C waren die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse vergleichsweise stabil, mit einem Maximum von 92 % nach 120 Minuten. Bei einer Verlängerung der Reaktionszeit von 5 auf 120 Minuten erhöhte sich die Glucoseausbeute durch die Hydrolyse lediglich um 7 %.

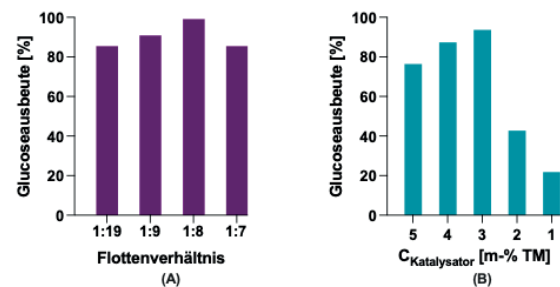
Es wurde zudem festgestellt, dass bei sehr langen Reaktionszeiten die Glucoseausbeute nach Erreichen des Maximums wieder abnimmt. Dies könnte auf die Bildung von Nebenprodukten zurückzuführen sein, die die enzymatische Hydrolyse

beeinträchtigen. Zusätzlich trat ein verbrannter Geruch der Proben auf, was ebenfalls auf die Entstehung von Nebenprodukten hindeutet.

### Flottenverhältnis und Katalysatorkonzentration Validierung

Im Organosolv-Aufschluss haben das Flottenverhältnis und die Katalysatorkonzentration ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Aufschluss-Effizienz. In diesem Experiment wurden verschiedene Flottenverhältnisse von 1:19 bis 1:7 sowie Katalysatorkonzentrationen von 1 bis 5 m-% TM untersucht.

Für die Validierung des Flottenverhältnisses wurden Reaktionsbedingungen von 135 °C, 120 Minuten und 5 m-% TM Schwefelsäure als Katalysator verwendet. Zur Validierung der Katalysatorkonzentration wurden die Parameter 135 °C, 120 Minuten und ein Flottenverhältnis von 1:19 festgelegt.



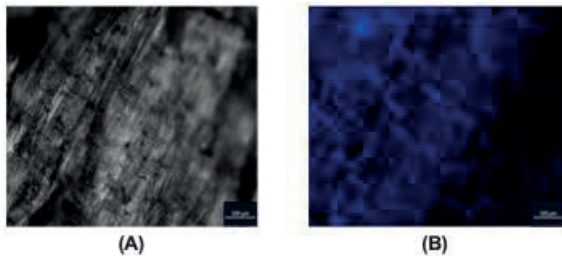
**Abb. 2:** Optimierung des Mikrowellenaufschlussprozesses, Flottenverhältnis (A) und Katalysatorkonzentration (B) Validierung

Bei der Validierung des Flottenverhältnisses zeigte sich (Abb. 2 A), dass der Aufschluss mit zunehmendem Flottenverhältnis, also bei geringerem Lösungsmittelanteil, effizienter wurde. Die Glucoseausbeute stieg von 85 % bei einem Flottenverhältnis von 1:19 auf 99 % bei 1:8. Bei einer weiteren Erhöhung des Flottenverhältnisses auf 1:7 sank die Glucoseausbeute jedoch wieder auf 84 %. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein geringerer Lösungsmittelanteil die gleichmäßige Durchmischung der Probe erschwert und zu einer ungleichmäßigen Erwärmung führt, was die Aufschluss-Effizienz beeinträchtigt.

Bei der Validierung der Katalysatorkonzentration zeigte sich (Abb. 2 B), dass die optimale Konzentration bei 3 m-% TM lag, was eine Glucoseausbeute von 93 % ermöglichte. Dies deutet darauf hin, dass bei zu niedriger Katalysatorkonzentration nicht genügend Katalysator vorhanden ist, um den Aufschlussprozess vollständig zu unterstützen. Gleichzeitig könnten Nebenreaktionen die Schwefelsäure teilweise verbrauchen, wodurch die Reaktionsaktivität weiter verringert wird. Eine zu hohe Katalysatorkonzentration hingegen könnte zusätzliche Nebenreaktionen fördern, was die Aufschlussleistung negativ beeinflusst und zu einer geringeren Glucoseausbeute bei der anschließenden enzymatischen Hydrolyse führt.

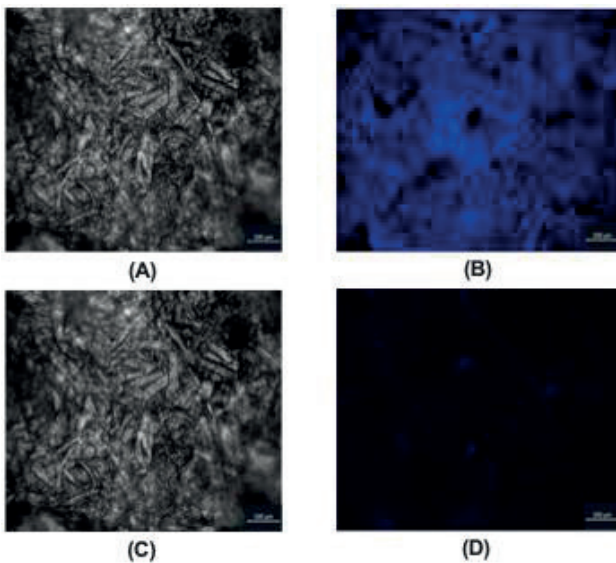
### Fluoreszenzanalyse

Die Autofluoreszenz-Eigenschaften von Lignin ermöglichen eine schnelle und effiziente Analyse verschiedener Aufschlussproben mittels sensorbasierter Fluoreszenzanalysetechnik.



**Abb. 3:** Vergleich der Faserstruktur un behandelter Strohproben unter sichtbarem Auflicht (A) und Fluoreszenzbeleuchtung (B)

Im Vergleich zur Beobachtung von Strohproben im sichtbaren Auflicht (Abb. 3 A) liefert die Betrachtung unter Fluoreszenzbeleuchtung (Abb. 3 B) wesentlich detailliertere Informationen über die Ligninverteilung in den Fasern. Dies eröffnet vielversprechende Möglichkeiten, den Organosolv-Aufschluss zur effektiveren Entfernung von Lignin weiter zu optimieren.



**Abb. 4:** Vergleich der Faserstruktur von Strohproben nach Mikrowellenaufschluss: Darstellung vor und nach der Reinigung unter sichtbarem Auflicht und Fluoreszenzbeleuchtung. A: Vor Reinigung, Auflicht | B: Vor Reinigung, Fluoreszenz | C: Nach Reinigung, Auflicht | D: Nach Reinigung, Fluoreszenz

Mithilfe der Fluoreszenzanalyse lässt sich der Reinigungsprozess der Organosolv-Aufschluss-Proben sowie der Ligningehalt effizient bewerten (Abb. 4). Anhand der Größe und Intensität der Fluoreszenzbilder kann der Ligningehalt der Proben präzise analysiert werden, wobei diese Methode im Vergleich zur herkömmlichen Totalhydrolyse nach dem NREL-Protokoll erhebliche Zeitvorteile bietet. Zudem zeigt sich, dass die Lignin-Autofluoreszenz in den gereinigten

Proben im Vergleich zu den un gereinigten Proben deutlich abnimmt, was die Effektivität des aktuellen Reinigungsprotokolls bestätigt. Diese schnelle und benutzerfreundliche sensorbasierte Technik liefert somit wertvolle Informationen zur Optimierung des Reinigungsprotokolls und zur Verbesserung der Effizienz des Lösungsmittelverbrauchs.

### Diskussion

Durch die Experimente dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Mikrowellenaufschluss eine effektive Methode für die Aufbereitung von lignocellulosehaltigen Materialien ist. Die Untersuchungen zur Optimierung der Reaktionsparameter, insbesondere von Temperatur, Reaktionszeit, Flottenverhältnis und Katalysatorkonzentration, bestätigen, dass eine präzise Einstellung dieser Faktoren die Glucoseausbeute der nachfolgenden enzymatischen Hydrolyse erheblich beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass höhere Temperaturen und angepasste Reaktionszeiten, wie etwa bei 180 °C und 5 Minuten, eine maximale Glucoseausbeute von 100 % erzielen können. Ebenso konnte durch die Variation des Flottenverhältnisses und der Katalysatorkonzentration festgestellt werden, dass ein Flottenverhältnis von 1:8 und eine Katalysatorkonzentration von 3 m-% TM optimale Bedingungen für eine hohe Aufschluss-Effizienz schaffen. Die Analyse verdeutlicht auch, dass Nebenprodukte durch zu lange Reaktionszeiten oder eine zu hohe Katalysatorkonzentration die Hydrolyse negativ beeinflussen können. Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise zur weiteren Optimierung und zeigen, dass der Mikrowellenaufschluss eine praktikable und zeitsparende Methode darstellt.

Basierend auf den autofluoreszenten Eigenschaften von Lignin bietet die neu entwickelte, sensorbasierte Fluoreszenzanalysemethode eine schnelle und effiziente Möglichkeit, die Faserstruktur sowie die Verteilung und den Gehalt an Lignin in den Proben zu analysieren. Die Geschwindigkeit und Benutzerfreundlichkeit dieser Technik schaffen zudem eine wertvolle Grundlage für die weitere Optimierung des Reinigungsprotokolls, wodurch die Effizienz des Lösungsmittelverbrauchs gezielt verbessert werden kann. Diese Form der Online-Analytik eröffnet zudem vielversprechende Möglichkeiten für eine kontinuierliche Prozessüberwachung und eine präzise Steuerung der Reinigungsprozesse.

### Literatur

- [1] C.-H. Zhou, X. Xia, C.-X. Lin, D.-S. Tong, und J. Beltramini, „Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels“, *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 40, Nr. 11, S. 5588, 2011, doi: 10.1039/c1cs15124j.
- [2] Y. Jing, Y. Guo, Q. Xia, X. Liu, und Y. Wang, „Catalytic Production of Value-Added Chemicals and Liquid Fuels from Lignocellulosic Biomass“, *Chem*, Bd. 5, Nr. 10, S. 2520–2546, Okt. 2019, doi: 10.1016/j.chempr.2019.05.022.

- [3] H. Xu, X. Che, Y. Ding, Y. Kong, B. Li, und W. Tian, „Effect of crystallinity on pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass based on multivariate analysis“, *Bioresource Technology*, Bd. 279, S. 271–280, Mai 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.096.

## Danksagung

Wir danken der FH Aachen und dem BMBF sowie dem Projektträger VDI für die Unterstützung und Förderung dieses Projekts. Förderkennzeichen: 13FH115KX1