Von der Pflanze in den Tank – Fermentation von Zuckerhirse zu Bioethanol

1. Bioethanol als Treibstoff der Zukunft – eine Schnapsidee? ……...2

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Zuckerhirse als Energiepflanze – ein nachwachsender Rohstoff……....3

2.1.1. Herkunft und Anbau……3

2.1.2. Eigenschaften und Zusammensetzung……4

2.1.3. Verwertungsmöglichkeiten…….....5

2.2. Grundlagen der alkoholischen Gärung……7

2.2.1. Bedeutung der Hefe……7

2.2.2. Ablauf der alkoholischen Gärung……8

2.2.2.1. Glykolyse……...9

2.2.2.2. Entstehung von Ethanol……...11

2.2.3. Einflussfaktoren auf die alkoholische Gärung……...12

3. Praktischer Teil

3.1. Analytik zur Überwachung des Fermentationsprozesses……..15

3.2. Untersuchungen zur Optimierung des Fermentationsprozesses……....17

3.2.1. Bestimmung der optimalen Hefeart……...17

3.2.2. Bestimmung der optimalen Hefeanfangskonzentration……22

3.2.3. Bestimmung der optimalen Gärtemperatur……...26

3.2.4. Verwendung von Nährsalzen……29

3.3. Überprüfung der Versuchsergebnisse……33

3.4. Reflexion - mögliche Fehlerquellen, Probleme und Verbesserungen……...35

4. Ausblick: Bioethanol als künftiger Treibstoff……...37

5. Zusammenfassung der Seminararbeit……38

6. Literaturverzeichnis……...39

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis……...44

8. Anhang……..46

9. Erklärung zur Anfertigung der Seminararbeit……...55

1. Bioethanol als Treibstoff der Zukunft – eine Schnapsidee ?

Abb. 1: Zuckerhirseversuchsanbau des TFZ Straubing

„Na, standen Sie heute Morgen auch an der Tankstelle und haben wieder einmal über das teure Benzin geschimpft?“ Grund dafür sind die steigenden Rohölpreise aufgrund begrenzter Ressourcen. Zudem hört man in den Medien beinahe täglich über den Treibhauseffekt und die damit einhergehende Klimaerwärmung. Schuld daran sind vor allem CO_2-Emissionen, welche bei der Verbrennung fossiler Energieträger entstehen. Das absehbare Ende der Erdölreserven und der Klimawandel führten daher zu Überlegungen, auch nachwachsende Rohstoffe wie Zuckerhirse als alternative Energiequelle zu nutzen. Da durch die Nutzung regenerativer Energien diese negativen Auswirkungen unterbleiben und Treibhausgase eingespart werden können, wird Bioethanol aus Zuckerhirse als alternativer Treibstoff der Zukunft gefördert und erforscht. Regenerative Energien aus nachwachsenden Rohstoffen werden immer häufiger eingesetzt, um einen Teil der fossilen Energieträger zu ersetzen. Jedoch tritt in diesem Zusammenhang auch immer wieder die Frage „Teller oder Tank?“ auf, das heißt, ob eine Konkurrenz zwischen der energetischen Nutzung von Biomasse und der Nahrungsmittelproduktion besteht, die zu steigenden Lebensmittelpreisen führt.

In dieser Seminararbeit wird daher die Eignung der Zuckerhirse als nachwachsender Rohstoff für die Bioethanolproduktion untersucht sowie die Optimierung des Fermentationsprozesses.

Abb. 2: Von der Pflanze in den Tank

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Zuckerhirse als Energiepflanze – ein nachwachsender Rohstoff

Die Zuckerhirse ist eine Energiepflanze, welche speziell für die energetische Nutzung angebaut wird. Über die Fotosynthese speichert sie in ihrer Biomasse Sonnenenergie in Form von Zucker. Das Kohlendioxid, welches die Pflanzen im Laufe ihres Wachstums aufgenommen haben, wird bei der energetischen Nutzung wie der Verbrennung wieder freigesetzt. Damit ist der Kohlendioxidkreislauf geschlossen und die Energiegewinnung CO_2-neutral.

2.1.1. Herkunft und Anbau

Abb. 3:
Sorghum saccharatum

Die Zuckerhirse (*Sorghum saccharatum*) zählt zur Familie der Süßgräser und ist eine besonders zuckerhaltige Form der Mohrenhirse (*Sorghum bicolor (L.) Moench*). Der oberirdische Teil der Zuckerhirse wird in Stängel, Blatt und Rispe unterteilt, bei Wuchshöhen bis ca. 4 m.

Außerdem gibt es verschiedene Nutzungstypen innerhalb der Vielfalt der Sorghumhirsen wie Futtter-, Körner-, und Zuckertypen. „Die Urheimat aller Sorghumarten liegt im innertropischen Afrika“ [12]. Dort wurden sie sehr früh in den trockenen halbwüstenartigen Gebieten Afrikas zur häufigst angebauten Nutzungspflanze. Anfang des 17. Jahrhunderts brachten afrikanische Sklaven die Zuckerhirse in die USA. Seit der Züchtung der modernen amerikanischen Sorten hat sich der Anbau auch in Ländern mit hochentwickelter Landwirtschaft stark ausgebreitet. Heute wird die Sorghumhirse vor allem in Ländern angebaut, in denen die Tagesmittelwerte für Sommertemperaturen über 20 °C liegen und die frostfreie Zeit zumindest 125 Tage dauert wie in den USA, Indien, Australien, Afrika, Mexiko und China, aber auch in Teilen Europas wie Frankreich. Seit mehreren Jahren werden verschiedene Sorten der Zuckerhirse auch in Bayern auf dem Versuchsfeld des Technologie- und Förderzentrums (TFZ) Straubing angebaut und erforscht.

[Nach: 11, 12, 17, 18, 21]

2.1.2. Eigenschaften und Zusammensetzung

Aufgrund ihrer tropischen Herkunft stellt die Zuckerhirse unter veränderten Klimabedingungen mit häufiger auftretenden Dürreperioden eine trockentolerantere Alternative zu Mais dar, wie Abb. 4 und 5 zeigen.

Abb. 4: Sorghum bei Wassermangel

Abb. 5: Mais bei Wassermangel

Das erklärt sich durch das dichte tiefreichende Wurzelsystem dieser Pflanze. *Sorghum saccharatum* hat des weiteren die Fähigkeit, bei langandauernder Dürre in die Trockenstarre, eine Art Ruhestarre, überzugehen, wobei das Wachstum eingestellt und erst nach neuen Niederschlägen wieder aufgenommen wird. Zur Erhöhung der Überlebensfähigkeit bei Dürrebelastung trägt auch der C_4-Dicarbonsäureweg bei. „Von diesem C_4-Zyklus machen neben Zuckerhirse auch Mais und Zuckerrohr Gebrauch, indem sie das CO_2 nachts in Form von C_4-Dicarbonsäure speichern, um es tagsüber wieder freizusetzen und in Zucker einzubauen“ [12]. Daher ist die Zuckerhirse in der Lage, am Tag trotz weitgehend geschlossener Stomata - um den Wasserverlust durch Transpiration zu minimieren - Photosynthese zu betreiben. Dies ermöglicht *Sorghum saccharatum* eine Anpassung an sehr trockene Standorte, womit eine besonders hohe Konversionsrate von Sonnenenergie zu Biomasse ermöglicht wird. C_4-Pflanzen benötigen außerdem nur die Hälfte an Wasser, um die gleiche Menge an Trockensubstanz zu bilden wie C_3-Pflanzen, z.B. Getreide und Zuckerrüben. Wegen der Klimaerwärmung kommt es auch in Deutschland zu anhaltend heißen Trockenphasen, die dem Klimaanspruch der Sorghumhirse und deren effiziente Wasserausnutzung entgegenkommt.

Gleichzeitig bedingt ihre Herkunft einen hohen Wärmeanspruch und eine ausgeprägte Kälteempfindlichkeit. „Entscheidend für den Ertrag ist gutes Wachstum in der

Jugendphase“ [12]. Daher sind vor allem niedrige Temperaturen während dieser Wachstumsphase kritisch. Diese Temperaturempfindlichkeit lässt daher eine Aussaat erst Mitte bis Ende Mai zu. Auch durch Züchtung wird versucht, die Kältetoleranz zu verbessern. Die Ernte sollte frühestens ab Mitte September beginnen, da gegen Ende der Vegetationsperiode noch eine erhebliche Zuckerbildung stattfindet. Außerdem stellt die Zuckerhirse keine besonderen Bodenansprüche und sie ist eine Alternative zu Mais in der Fruchtfolge, unter anderem auch wegen den Maisschädlingen, für die Sorghum keine Wirtspflanze ist.

Zucker ist der wertbestimmende Bestandteil der Zuckerhirse für die Gewinnung von Ethanol. Für die Produktion von Ethanol ist vor allem ein hoher Gesamtzuckergehalt entscheidend, dabei kommt dem Zuckermuster eine geringere Bedeutung zu. „Der Zuckergehalt in der Frischmasse liegt bei rund 8,8 %; davon sind etwa 5,5 % Saccharose, 1,8 % Glucose und ca. 1,4 % Fructose“ [11]. Als Faustregel für das Zuckermuster gilt: $^{2}/_{3}$ Saccharose und $^{1}/_{3}$ Fructose und Glucose.

Tab. 1: Zusammensetzung der Zuckerhirse [11]

Wasser	in % FM	70 – 76
Zucker	in % TM	18 – 20
Rohprotein	in % TM	7,5 – 9,5
Fett	in % TM	1,1 – 1,5
Rohfaser	in % TM	32 – 38
Asche	in % TM	8,0 – 8,5

TM = Trockenmasse
FM = Frischmasse

[Nach: 1, 11, 12, 16, 17, 18, 21, 26]

2.1.3. Verwertungsmöglichkeiten

Wegen der stark steigenden Energiekosten ist man bemüht, Energiepflanzen wie Zuckerhirse mit hohem Ertragspotenzial zu züchten. Neben dem Presssaft werden auch die Nebenprodukte, die zwangsläufig bei der Verwertung der Zuckerhirse anfallen, zur Nutzung herangezogen (s. Abb. 6).

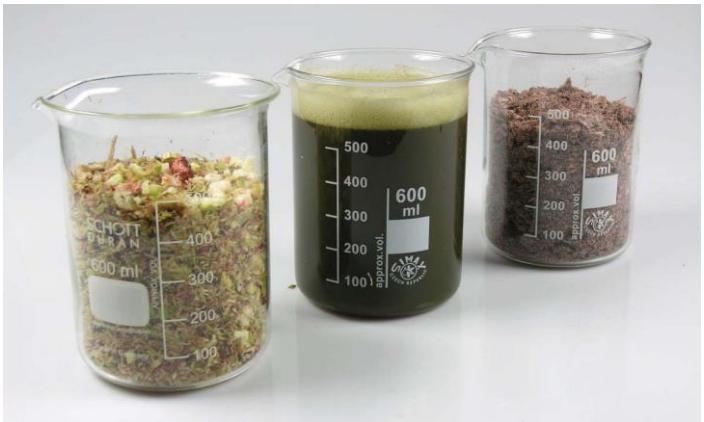

Abb. 6: gehäckselte Zuckerhirse, Presssaft und Bagasse

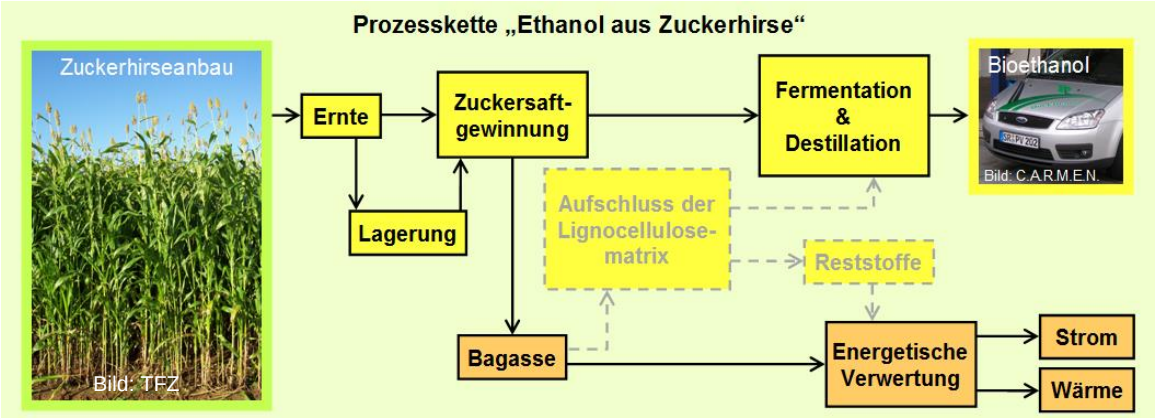

Abb. 7: Prozesskette „Ethanol aus Zuckerhirse“

Gewinnung und Nutzung des Zuckerhirsepresssaft

Bei der Ernte geht es darum, den Stängel vollständig zu erfassen, da dieser den meisten Zucker enthält (Zuckergehalt in Trockenmasse: Stängel 44,2 %, Blätter 10,4 %, Rispen 5,8 %) [16]. Am besten eignet sich zur Zuckersaftgewinnung aus dem Erntegut die Schneckenpresse, da sowohl „hohe Abpressgrade und Zuckerextraktionswerte erzielt werden“ [16]. Durch Fermentationsverfahren kann aus diesem Zuckerhirsesaft – ähnlich wie bei Zuckerrohr – direkt Bioethanol gewonnen werden, welcher als Biokraftstoff der „ersten Generation“ bezeichnet wird. Der durch Fermentation entstandene Ethanol muss durch Destillation bzw. Rektifikation abgetrennt werden und wird im Anschluss daran durch eine Absolutierung in Reinform gewonnen (s. Abb. 7).
Aus dem Zuckerhirsepresssaft kann auch alternativ Zucker oder Sirup hergestellt werden, die als Nahrungsmittel eingesetzt werden.

Nutzung der Bagasse

Bei der Bagasse handelt es sich um die faserigen Überreste, die beim Auspressen von Zuckerhirse entstehen. Der Pressrückstand besteht hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Die energetische Nutzung der Bagasse als Brennmaterial für die Erzeugung der nötigen Prozessenergie bei der Produktion von Ethanol ist die sinnvollste Verwendung (s. Abb. 7). Sie kann aber auch als Substrat für Biogasanlagen zur anschließenden Strom- bzw. Wärmegewinnung genutzt werden. Zudem kann der Pressrückstand vor allem bei Wiederkäuern als Ballastfutter beigemischt werden oder als organischer Dünger direkt auf das Feld ausgebracht werden.

Ganzpflanzennutzung

Durch neue enzymatische Aufschlussverfahren (zur Verflüssigung und Verzuckerung der Kohlehydrate) kann auch eine Ganzpflanzenkonversion der Zuckerhirse durchgeführt werden, bei der neben Zucker und Stärke auch die Gerüstsubstanzen wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin (=Lignocellulose) zu Ethanol umgewandelt werden. Dieser Bioethanol wird auch als Biokraftstoff der „zweiten Generation“ bezeichnet und befindet sich noch im Pilotstadium (s. Abb. 7, S. 6).
[Nach: 7, 12, 15, 16]

2.2. Grundlagen der alkoholischen Gärung

Die Grundlage jeder Ethanolgewinnung aus Biomasse, wie der Zuckerhirse, stellt die alkoholische Gärung dar. Dies ist eine biochemische Spaltung von Kohlenhydraten wie Mono- und Disacchariden, die durch das Zusammenwirken von mikrobiellen Enzymen ausgelöst werden und unter Ausschluss von Sauerstoff ablaufen. Als Mikroorganismen werden in der Technik bevorzugt Hefen (*Saccharomyces cerivisiae*) eingesetzt, da Hefen mikrobiologisch am meisten erforscht, einfach in der Verfahrensanwendung und leicht zu kultivieren sind.

2.2.1. Bedeutung der Hefe

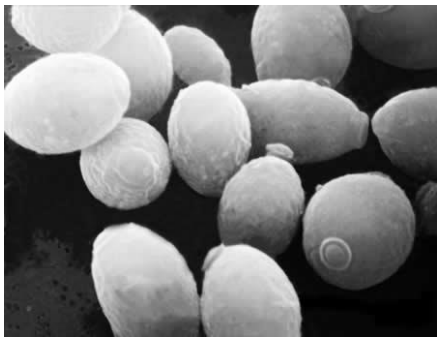

Abb. 8:
mikroskopische Aufnahme von *Saccharomyces cerivisiae*

„Grundsätzlich unterscheidet man zwischen homofermentativen und heterofermentativen Gärorganismen“ [14].

In dieser Seminararbeit werden die nachfolgenden Versuchsreihen mit *Saccharomyces cerivisae* (Gärhefen) durchgeführt, welche zu den homofermentativen Gärorganismen gehören. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Ethanol das einzige Hauptprodukt der Gärung ist. Außerdem entstehen Nebenprodukte. *Saccharomyces cerivisiae* können nur Hexosen verwerten, nicht aber Pentosen. Bei den C_6-Zuckern handelt es sich um die Monosaccharide Glucose und Fructose, die in die Zelle eingeschleust und für ihren Stoffwechsel genutzt werden. Disaccharide wie Saccharose werden zuvor extrazellulär durch Enzyme der Hefe, der Saccharase (Invertase), in Einfachzucker aufgespalten. Bei

der ethanolischen Gärung sind aber nicht die Hefen selbst für die Umwandlung von Glucose in Kohlenstoffdioxid und Ethanol verantwortlich, sondern die in den Hefezellen enthaltenen Enzyme. Dies sind Proteine, die als Biokatalysatoren eine Reaktion von Substraten zu Produkten durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie beschleunigen. Die Enzyme nehmen zwar an der Reaktion teil, liegen aber am Ende der Reaktion unverändert vor.

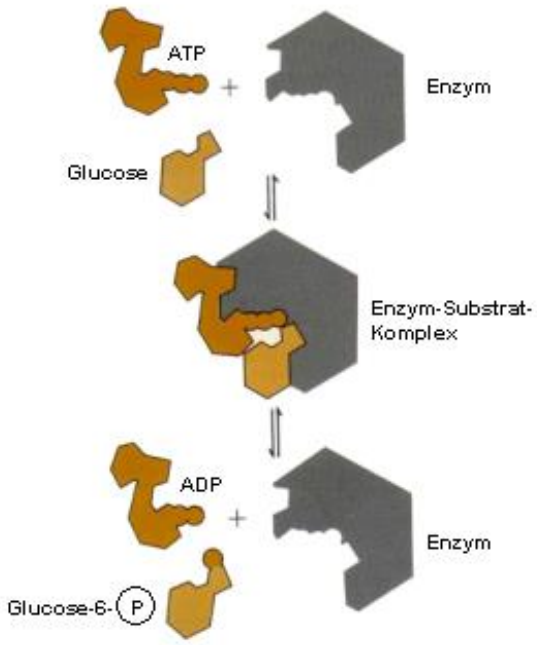

Abb. 9: Schlüssel-Schloss-Modell

Für ihre Wirkungsweise spielt die Tertiärstruktur der Biokatalysatoren eine entscheidende Rolle: In das aktive Zentrum, einer spezifischen Proteinfalte, passt genau ein bestimmtes Substrat, wie ein Schlüssel zum Schloss (Schlüssel-Schloss-Modell). Dabei bildet sich durch Bindung des Substrates an das aktive Zentrum ein „Enzym-Substrat-Komplex“. Aufgrund der Passgenauigkeit zwischen der Form des aktiven Zentrums und des Substrats ergibt sich ihre hochspezifische Wirkungsweise, denn Enzyme „setzen nur ein bestimmtes Substrat (Substratspezifität) auf eine ganz bestimmte Weise um (Wirkungsspezifität)“ [10]. Bei der alkoholischen Gärung ist aber nicht nur ein Enzym für die Katalysierung der einzelnen Reaktionsschritte verantwortlich, sondern ein ganzer „Enzymcocktail“. Erst diese Vielzahl an Enzymen in den Hefezellen ermöglicht die ablaufenden Einzelreaktionen der alkoholischen Gärung.

[Nach 2, 3, 4, 5, 10, 14, 16, 20, 27]

2.2.2. Ablauf der alkoholischen Gärung

Joseph Louis Gay-Lussac stellte bereits 1815 die summarische Gleichung der anaeroben Gärung auf: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$

Die Erforschung der Intermediärprodukte und Enzyme auf dem Wege von Zucker zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid dauerte jedoch mehr als hundert Jahre. Die komplexen Einzelschritte, die hinter dieser Reaktionsgleichung stehen, werden im Folgenden genauer betrachtet.

2.2.2.1. Glykolyse

Der erste große Teilschritt der ethanolischen Gärung ist die Glykolyse. Dabei handelt es sich um den anaeroben Abbau von Glucose zu Pyruvat über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg. Insgesamt besteht diese aus zehn Teilschritten, die man in eine Energieinvestitionsphase (Schritte 1-5) und eine Energiegewinnungsphase (Schritte 6-10) einteilen kann.

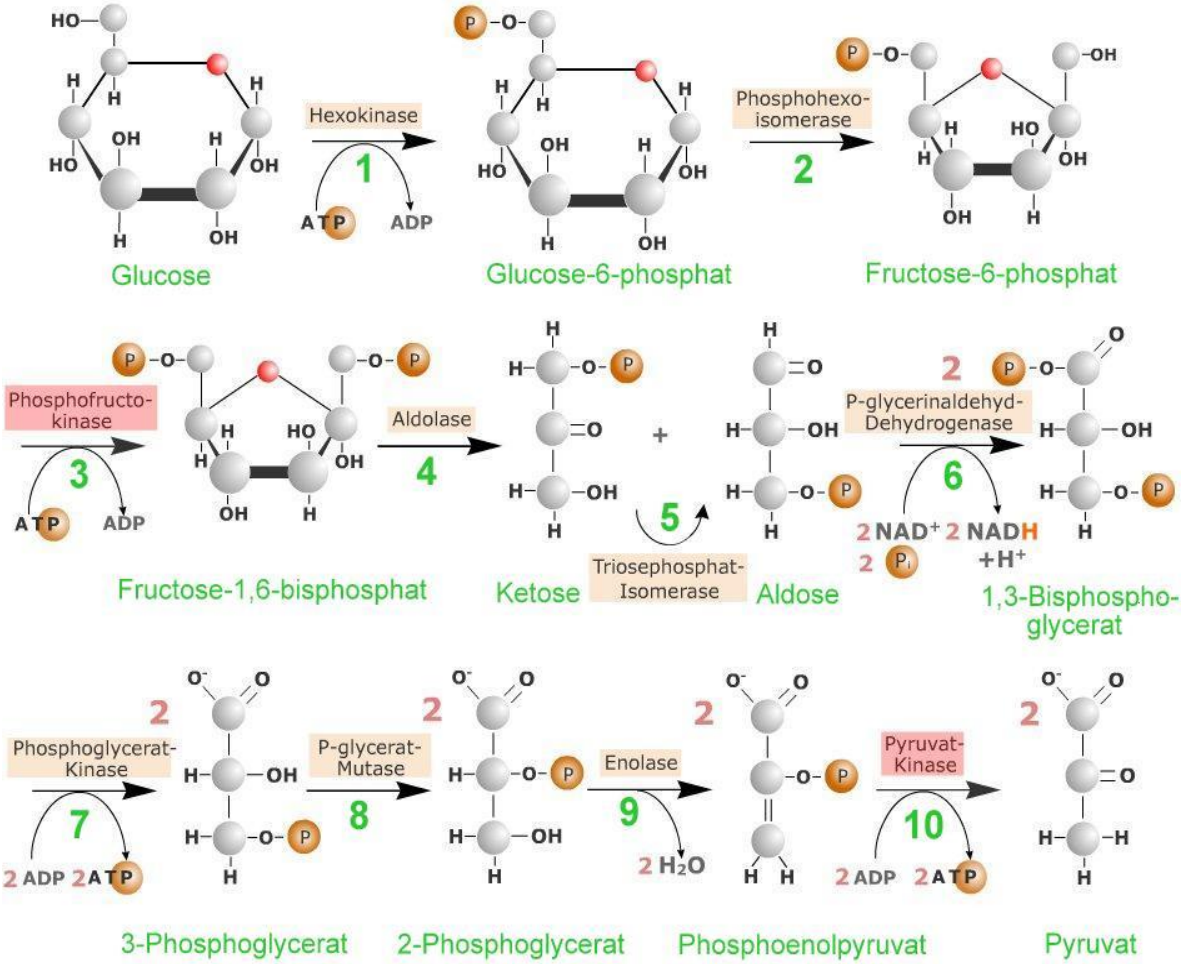

Abb. 10: Ablauf der Glykolyse

1. Schritt: Die einleitende Reaktion ist eine Phosphorylierung, die durch das Enzym Hexokinase katalysiert wird: Dabei wird ein Phosphat-Rest auf die Glucose übertragen, wodurch das energiereichere Glucose-6-phosphat entsteht. Die dafür benötigte Phosphatgruppe stammt aus der Umwandlung von ATP in ADP.

2. Schritt: Das Enzym Phosphohexoisomerase verändert lediglich die Konstitution des Moleküls: Glucose-6-phosphat wird zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert.

3. Schritt: Bei der zweiten Phosphorylierung wird eine weitere Phosphatgruppe an das Fructose-6-phosphat Molekül angelagert, sodass das charakteristische Zwischenprodukt dieses Abbauweges, Fructose-1,6-bisphosphat entsteht. Dabei liefert das Molekül ATP die zweite Phosphatgruppe. Das katalysierende Enzym heißt Phosphofructokinase und kann durch ADP aktiviert und ATP und Fettsäuren gehemmt werden.

4. Schritt: Das Fructose-1,6-bisphosphat-Molekül wird durch die Aldolase in zwei Triosen, also C_3-Körper, zerlegt. Es entstehen Glycerinaldehyd-3-phosphat (Aldose) und Dihydroxyacetonphosphat (Ketose), die zueinander Konstitutionsisomere sind.

5. Schritt: Da die Ketoform die energetische bevorzugte Konfiguration besitzt, würde sich im Reagenzglas ohne weitere Eingriffe ein Gleichgewicht von nur 4 % Glycerinaldehyd-3-phosphat und 96 % Dihydroxyacetonphosphat einstellen. In der Zelle geschieht dies aber nicht, denn bei der Glykolyse wird nur Glyceraldehyd-3-phosphat weiter abgebaut, weshalb das Enzym Triosephosphatisomerase das Dihydroxyacetonphosphat-Molekül in die benötigte Aldose umwandelt. Das Gleichgewicht wird so in Richtung des Glycerinaldehyd-3-phosphat verschoben.

In der Energiegewinnungsphase muss die Anzahl aller Moleküle mit zwei multipliziert werden, da die Glucose in zwei C_3-Körper gespalten wurde.

6. Schritt: Dieser Schritt besteht wiederum aus zwei Teilschritten, die jeweils durch das Enzym Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase katalysiert werden. Zuerst findet eine Redoxreaktion statt, bei der NAD^+ zu $NADH/H^+$ reduziert und Glycerinaldehydphosphat zu Phosphoglycerinsäure oxidiert wird. Diese exergonische Reaktion ist energetisch sehr günstig und die dadurch freigewordene Energie wird im zweiten Teilschritt ausgenutzt, um anorgansiches Phosphat auf die Carboxygruppe der Phosphoglycerinsäure zu übertragen. Es entsteht 1,3-Bisphosphoglycerat.

7. Schritt: Die Phosphoglyceratkinase katalysiert die Umwandlung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat. Dabei wird die zuvor aufgenommene Phosphatgruppe auf ADP übertragen, wodurch ein energiereiches ATP gebildet wird. Die bei der vorangegangen Oxidation frei gewordene Energie wird also konserviert, indem ATP aufgebaut wird. Diese Synthese von ATP nennt man

Substratkettenphosphorylierung. Damit ist die Energiebilanz der Glykolyse am Ende des 7. Schrittes ausgeglichen: zwei Moküle ATP wurden für die Aktivierung und Spaltung der Glucose benötigt und zwei Moleküle ATP wurden bei der Oxidation der Spaltprodukte, welche zwei mal abläuft, zurückgewonnen.

8. Schritt: Die Phosphoglyceratmutase verändert die Stellung der Phosphatgruppe und wandelt daher 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat um. Ohne diese Isomerisierung könnte der nächste Teilschritt nicht ablaufen.

9. Schritt: Mit Hilfe der Enolase wird ein Wassermolekül von 2-Phosphoglycerat abgespalten. Durch die so erhaltene Doppelbindung entsteht das relativ energiereiche Phosphoenolpyruvat.

10. Schritt: Im letzten Schritt der Glykolyse wird ein weiteres Molekül ATP gewonnen (Substratkettenphosphorylierung). Hierbei katalysiert das Enzym Pyruvatkinase die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat, indem eine Phosphatgruppe abgespalten wird und diese auf ADP übertragen wird.

Stoffbilanz: $C_6H_{12}O_6 + 2\ P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP$

Insgesamt wurden aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Pyruvat, wobei zwei Moleküle ATP entstanden sind. Außerdem wurde der Wasserstoffakzeptor NAD^+ verbraucht, welcher aber nun wieder regeneriert werden muss, um einen ungehinderten Ablauf der Glykolyse zu ermöglichen. Bei der Gärung steht kein Sauerstoff zur Verfügung, der das durch die Glykolyse angefallene $NADH/H^+$ oxidieren könnte. NAD^+ muss also auf eine andere Art und Weise regeneriert werden. Dies geschieht im zweiten großen Teilschritt der alkoholischen Gärung.

2.2.2.2. Entstehung von Ethanol

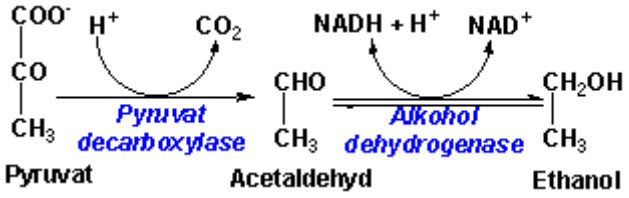

Abb. 11: Entstehung von Ethanol

Pyruvat wird mit Hilfe des Enzyms Pyruvatdecarboxylase zu Ethanal umgewandelt, wobei CO_2 abgespalten wird.
Das entstandene Acetaldehyd wird nun durch die Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert. Dabei wird $NADH/H^+$ verbraucht und zu NAD^+ reoxidiert.
[Nach: 2, 4, 6, 13, 24, 25, 27]

2.2.3. Einflussfaktoren auf die alkoholische Gärung

Da verschiedene Einflussfaktoren auf den Stoffwechsel und damit auf die Vermehrung der Hefe einwirken, muss die Gärung vor hemmenden Einflüssen geschützt werden, um einen optimalen Gärvorgang zu gewährleisten. Sind die Bedingungen nicht optimal, so können Risiken auftreten, d.h. eine Fehlentwicklung der Hefe bzw. Gärverluste sind möglich. In diesem Abschnitt sollen nun einige Einflussfaktoren genauer betrachtet werden.

<u>pH Wert</u>

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert ist auf die Struktur der Enzyme zurückzuführen. „Auf der Oberfläche der Enzymmoleküle befinden sich Gruppen, die je nach pH-Wert ihren Ladungszustand ändern, z.B. Amino-, Carboxy- oder Hydroxygruppen“ [10]. Bei einer Protonierung bzw. Deprotonierung können zwischenmolekulare Kräfte entstehen oder wegfallen, was so zu Veränderungen in der Tertiärstruktur führt. Substratmoleküle können daher schlecht oder gar nicht mehr an das aktive Zentrum binden.
Gärhefen wachsen im Allgemeinen in einem relativ breiten pH-Intervall (pH 2,5 – 8), wobei das Optimum zwischen pH 4 und pH 5 liegt. Der pH-Wert ist lediglich ein Indizparamter, der Auskunft über eventuelle Gärstörungen gibt. In den nachfolgenden Versuchsreihen wird der pH-Wert immer zu Beginn und am Ende der Fermentation (48 h) gemessen: Dieser wird während der Vergärung des Zuckerhirsepresssaftes zunehmend sauer (von pH 6 nach pH 5). Daher ist eine pH-Regulierung von außen nicht sinnvoll, zumal der pH-Wert nahezu im Optimalbereich liegt. Deshalb wird dieser Einfluss in den folgenden Versuchen nicht weiter untersucht.

Abb. 12: Messung des pH-Wert des Zuckerhirsesaftes vor (rechts) und nach (links) der Fermentation

Substratkonzentration

Die Michaelis-Menten-Theorie beschreibt unter anderem die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration: Je höher die Substratkonzentration ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Substratmolekül auf ein Enzym trifft und einen Enzym-Substrat-Komplex bildet. Wenn aber alle aktiven Zentren der Enzyme mit Substrat besetzt sind (= maximale Enzymaktivität), bringt eine weitere Zunahme der Substratkonzentration keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt also mit zunehmender Substratkonzentration und nähert sich immer langsamer der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit.

Bei sehr hohen Zuckerkonzentrationen (ab 25 % Zucker) verläuft die Gärung nur sehr schwer, da der Zucker den Hefen aufgrund ihres Bestrebens, Wasser aufzunehmen, dieses entzieht. Somit nehmen die Hefeaktivität und die Hefevermehrung ab, wodurch auch die Gärung an Intensität verliert. Aus Wirtschaftlichkeitsgründen wird die natürliche Zucker-hirsesaftkonzentration verwendet, womit der Einflussfaktor Substratkonzentration in den nachfolgenden Versuchsreihen vorgegeben ist.

Abb. 13: naturbelassener Zuckerhirsepresssaft

Einfluss von Hemmstoffen

Enzyme können durch eine Vielzahl von unphysiologischen und physiologischen Einwirkungen reversibel gehemmt oder irreversibel inaktiviert werden. In der Biochemie spricht man von vier verschieden wirkenden Inhibitoren: kompetitive, nicht-kompetitive, allosterische Inhibitoren sowie irreversible Hemmungen durch Schwermetallionen.

Ein besonders wichtiger Hemmstoff ist das von den Hefen selbst gebildete Stoffwechselprodukt Ethanol. Dieser Alkohol hemmt die Vermehrung der Mikroorganismen sowie die Gärung. Je höher die Ethanolkonzentration, desto stärker ist die Hemmwirkung auf die Gärleistung der Hefe. Je nach Hefeart überleben *Saccharomyces cerivisiae* bis zu 18 Vol% Ethanol. „Der Mechanismus der Einwirkung

des Ethanols auf den Mikroorganismus ist von sehr komplexer Natur und in seinen Einzelheiten noch nicht restlos ausgeklärt“ [14].

Es werden folgende Wirkungszusammenhänge diskutiert:

Ethanol könnte die Aktivität bzw. die Synthese bestimmter glykolytischer oder anderer Enzyme hemmen. Des weiteren wäre eine Denaturierung von Eiweißverbindungen denkbar, sowie die Zerstörung bzw. Beeinträchtigung von Zellmembranstrukturen. Außerdem könnte Ethanol auch die Osmose beeinflussen.

„In seiner Gesamtwirkung verhält sich Ethanol wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor des Zellwachstums“ [14]. Ethanol lagert sich an einer vom aktiven Zentrum entfernten Stelle an das Enzym an, wodurch dieses seine Konformation ändert und das aktive Zentrum nicht mehr länger voll funktionsfähig ist. Der Zucker kann zwar noch an das aktive Zentrum binden, wird aber weniger effektiv in das Produkt umgesetzt.

Denkbar wäre auch eine Inaktivierung der Enzyme durch Schwermetalle oder eine Hemmung durch andere Inhibitoren, welche die Zuckerhirse aus dem Boden aufnimmt. Diese könnten sich in der Pflanze anreichern und inhibierend bei der Fermentation des Presssaftes wirken.

Weitere Einflussfaktoren auf die alkoholische Gärung sind Temperatur, Enzymkonzentration, Hefeart und Nährsalze. Diese Faktoren werden im praktischen Teil genauer untersucht.

[Nach 2, 3, 10, 14, 29, 33]

3. Praktischer Teil

Um die alkoholische Gärung zielgerichtet und erfolgreich zu gestalten, sind zur Optimierung der äußeren Lebensfaktoren der Hefezellen die Physiologie und der damit verbundenen Ansprüche der Hefe zu beachten. Im nachfolgenden Teil werden Versuchsreihen durchgeführt, um eine effiziente Konversion des Presssaftes zu Bioethanol zu erreichen. Dazu ist auch eine geeignete Prozesskontrolle notwendig.

3.1. Analytik zur Überwachung des Fermentationsprozesses

Abb. 14: Startfenster des Messprogrammes XLS Mess 200

Die Versuchsreihen und der Prozessablauf der Gärung sollen optimal und kontinuierlich überwacht und dokumentiert werden. Gemessen wird „die durch den Kohlenstoffdioxid-Verlust bedingte Massenabnahme über die Dauer des Gärprozesses“ [9] (2 Tage), da die Ethanolbildung direkt proportional zur CO_2-Produktion ist. Daraus kann der Ethanolgehalt stöchiometrisch berechnet werden (s. Kapitel 8., S. 46). Dazu wird eine PC-gestützte Präzisionslaborwaage des Herstellers Sartorius (BP 310 S mit Ablesbarkeit von 0,001 g) verwendet, die für Langzeitversuche wie die alkoholische Gärung geeignet ist. Der Gäransatz wird mit dem Gärspund luftdicht verschlossen, auf die Waage gestellt und austariert, um die Gäraktivität der Hefe während des ganzen Fermentationsprozesses zu erfassen. Die Massenabnahme wird in halbstündlichen Abständen vom Mess-System protokolliert. Verwendet wird das Messdatenerfassungsprogramm XLS Mess 200, welches die direkte Messdatenübergabe in Rechenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms Excel schon während des Messvorganges sowie die grafische Darstellung der Messergebnisse ermöglicht. Der Gärabbruch erfolgt nach 48 Stunden, da die Hefezellen in die stationäre

Phase übergehen und die CO_2-Produktion nahezu eingestellt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit geht gegen Null.

Bestimmung des Anfangszuckergehaltes

Um den Anfangszuckergehalt des Zuckerhirsepresssaftes zu bestimmen, wird ein Digital-Refraktometer mit Temperaturkompensation der Marke Hanna Instruments (Modell HI 96801) verwendet. Das Refraktometer ist ein optisches Gerät zur Messung des Brechungsindex einer Zuckerlösung, bei dem Licht von optisch dichteren Medien (z.B. Zuckerlösung) stärker gebrochen wird als von optisch dünneren (z.B. Luft). Dabei wird durch Messung des Brechungsindex (kurz Brix) der Saccharosegehalt wässriger Lösungen in %Brix bestimmt. Der Refraktometer ist auf die Messung reiner Saccharoselösung eingestellt. 1 %Brix entspricht daher 1 g Saccharose pro 100 g Zuckerlösung. Da die verwendeten Zuckerhirsesäfte aus einer Charge stammen, enthalten sie stets 14,6 %Brix (± 0,1 %Brix Abweichung), d.h. 100 g Zuckerhirsesaft enthalten 14,6 g Saccharose. Da der Zuckerhirsesaft neben Saccharose (ρ= 1,57 g/cm^3) auch Fructose (ρ= 1,59 g/cm^3) und Glucose (ρ= 1,56 g/cm^3) enthält, ist der Brixwert wegen den abweichenden Dichten der Fructose und Glucose von Saccharose etwas ungenau. Geht man von vollständiger Vergärung aus, d.h. ohne Restzucker, kann man laut einer Umrechnungstabelle wie die des Kellereibedarfs Schmickl [35] bei 14,6 %Brix 7,86 Vol% Ethanol erzielen.

Abb.15: Bestimmung des Brix Wertes des Zuckerhirsesaftes mit einem Refraktometer

Bestimmung des Restzuckergehaltes

Um zu überprüfen wie effektiv die alkoholische Gärung war, wird nach Fermentationsende der Restzuckergehalt mit dem Clini-Test bestimmt. Dieser ist geeignet, da nach 48 Stunden Gärzeit weitgehend nur noch Monosaccharide vorhanden sind, auf die der Test anspricht. Beim Clini-Test handelt es sich um eine Fehling Probe. Dabei wird der Probe eine Reaktionstablette zugesetzt, welche Kupfersulfat enthält. In der Probe vorliegende reduzierende Zucker werden oxidiert, die Cu(II)-Ionen (blau) dabei zu gelbbraunem Kupfer-(I)-oxid reduziert. Der Farbton ist von der Zuckerkonzentration abhängig. Je dunkler die Verfärbung der Probe, desto geringer der Restzuckergehalt (s. Abb. 16). Laut Hersteller [37] ist bei der Vergärung ein hoher Endvergärungsgrad anzustreben, d.h. weniger als 0,5 g/L Restzucker, damit eine hohe Ethanolausbeute erreicht wird und der Gärprozess wirtschaftlich ist.

Abb. 16: Durchführung eines Clini-Tests

Die Bestimmung des Restzuckergehalts mit einem Refraktometer wäre sehr ungenau. Grund dafür ist, dass Ethanol einen anderen Lichtbrechungsindex hat, wie die gelösten Zucker, da Ethanol eine deutlich geringere Dichte (0,79 g/cm^3) hat als das gewichtete Mittel der Dichten (ca. 1,58 g/cm^3) der Zuckerarten Saccharose, Fructose und Glucose bzw. als Saccharose (1,57 g/cm^3), auf die das Refraktometer eingestellt ist. Der Alkoholgehalt würde so zur Verfälschung des Messwertes führen.

[Nach: 3, 9, 14, 35, 36, 37]

3.2. Untersuchungen zur Optimierung des Fermentationsprozesses

Es werden Versuchsreihen durch Variation der Hefeart, Hefeanfangskonzentration, Temperatur und Nährstoffzugabe durchgeführt. Damit soll die Kombination der Einflussfaktoren herausgefunden werden, die zu einer optimalen Ethanolausbeute führen.

3.2.1. Bestimmung der optimalen Hefeart

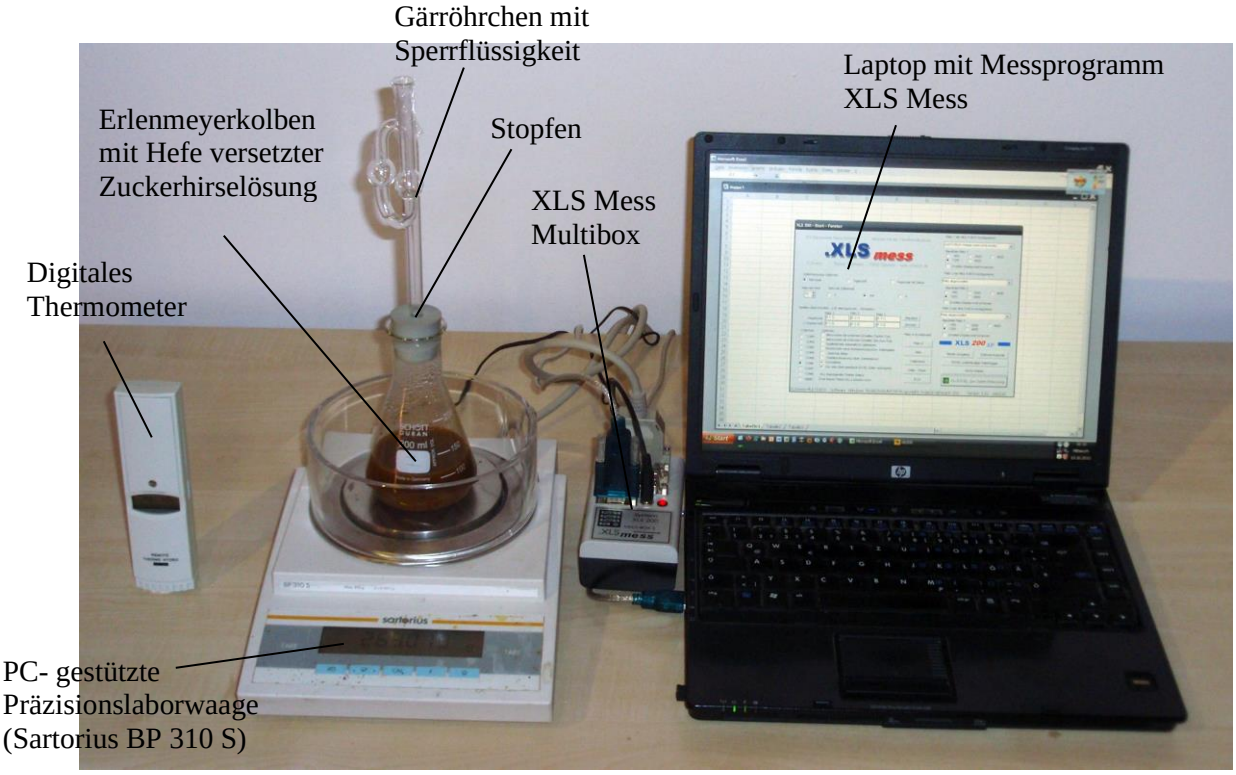

Abb. 17: Versuchsaufbau zur Prozesskontrolle des Gärvorganges

Versuchsbeschreibung

In dieser Versuchsreihe soll eine geeignete Hefeart für die Gärung gefunden werden. Dabei werden drei unterschiedliche Hefesorten untersucht: eine Backhefe, eine Weinhefe und eine Hochleistungshefe. Für diese Versuchszwecke sollte eine optimale Hefe folgende Anforderungen erfüllen: hohe Ethanolbildungsgeschwindigkeit und hohe Ethanolausbeute wegen der Wirtschaftlichkeit sowie Ethanol-, Temperatur- und Substrattoleranz für einen stabilen Gärprozess.

Abb. 18:
Dr. Oetker Backhefe

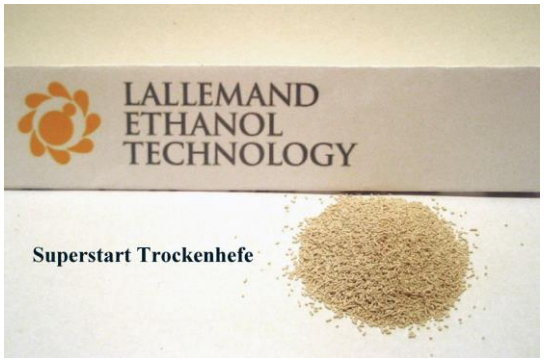

Abb. 19: Hochleistungshefe Superstart der Firma Lallemand Ltd.

Abb. 20: Kitzinger Trockenreinhefe der Firma Arauner

Geräte

3 Erlenmeyerkolben (200 mL)

3 Gummistopfen mit Glasgärröhrchen

3 Plastikgefäße zum Rehydrieren der Trockenhefe

1 PC-gestützte Präzisionswaage (Sartorius BP 310 S) mit Multibox für XLS Mess 200

1 Laptop mit Messprogramm XLS Mess 200 (inkl. Anschluss- und Verbindungskabel)

1 digitales Thermometer

Chemikalien, Substrate und Gärorganismen

3 x 100 mL Zuckerhirsepresssaft (14,6 %Brix, pH 6)

0,2 g Superstart Hefe (Hochleistungshefe von Lallemand Ltd.)

0,2 g Dr. Oetker Backhefe

0,2 g Kitzinger Reinzucht- und Weinhefe (von Arauner)

3 x 10 mL isotone Natriumchloridlösung (Ampullen von Braun)

2,230 g destilliertes Wasser (Sperrflüssigkeit)

Durchführung

Da jeder Versuchsansatz ca. zwei Tage dauert und nur eine Präzisionswaage vorhanden ist, mit der der CO_2-Ausstoß gemessen kann, müssen die Versuchsansätze nacheinander durchgeführt werden. Um die Versuchsreihen dennoch miteinander vergleichen zu können, werden die Parameter Temperatur konstant bei 24 °C (± 0,5 °C Abweichung) gehalten, Zuckerhirsesaft mit gleicher Konzentration verwendet, bei gleicher Versuchslaufzeit (48 Stunden). In der ersten Messreihe wird nur die Hefeart variiert.

<u>Die Versuchsvorbereitung ist in allen Versuchen gleich:</u>

Es werden 100 mL Zuckerhirselösung im Erlenmeyerkolben abgemessen, was in etwa 103 g entspricht. Anschließend werden 0,2 g der jeweiligen Trockenhefe abgewogen und mit 10 mL 0,9%iger Natriumchloridlösung bei Raumtemperatur eine Stunde lang rehydriert, um die getrockneten Hefezellen zu reaktivieren. Das auf Kultivierungstemperatur eingestellte Fermentationsmedium wird dann mit der Hefelösung beimpft. Der Versuchsansatz enthält nun 110 mL. Als nächstes werden 2,230 g destilliertes Wasser in das Gärröhrchen gefüllt und der Erlenmeyerkolben mit dem Gärspund verschlossen. Die mit dem PC verbundene und austarierte Waage misst alle 30 Minuten den CO_2-Massenverlust und zeichnet die Werte in Excel auf. Nach Abbruch des Gärvorganges (48 h) wird der Restzuckergehalt mit dem Clini-Test bestimmt.

Beobachtung und Auswertung

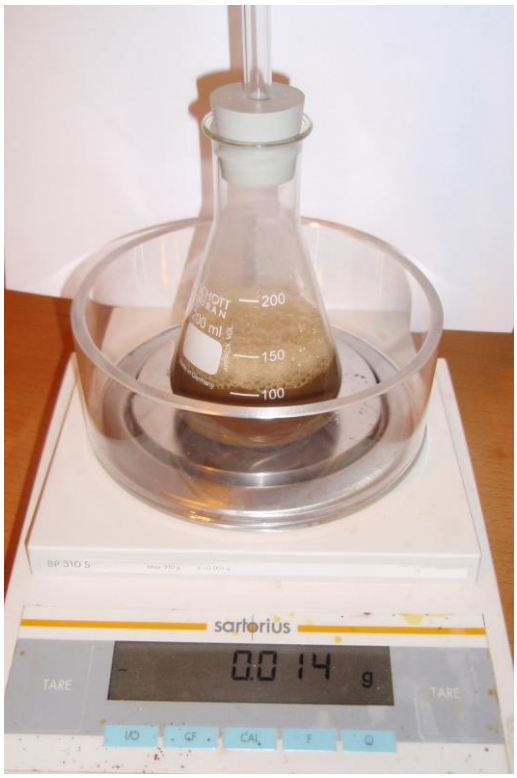

Abb. 22: Schaumbildung bei der Fermentation

Abb. 21: Schaumbildung bei der Fermentation

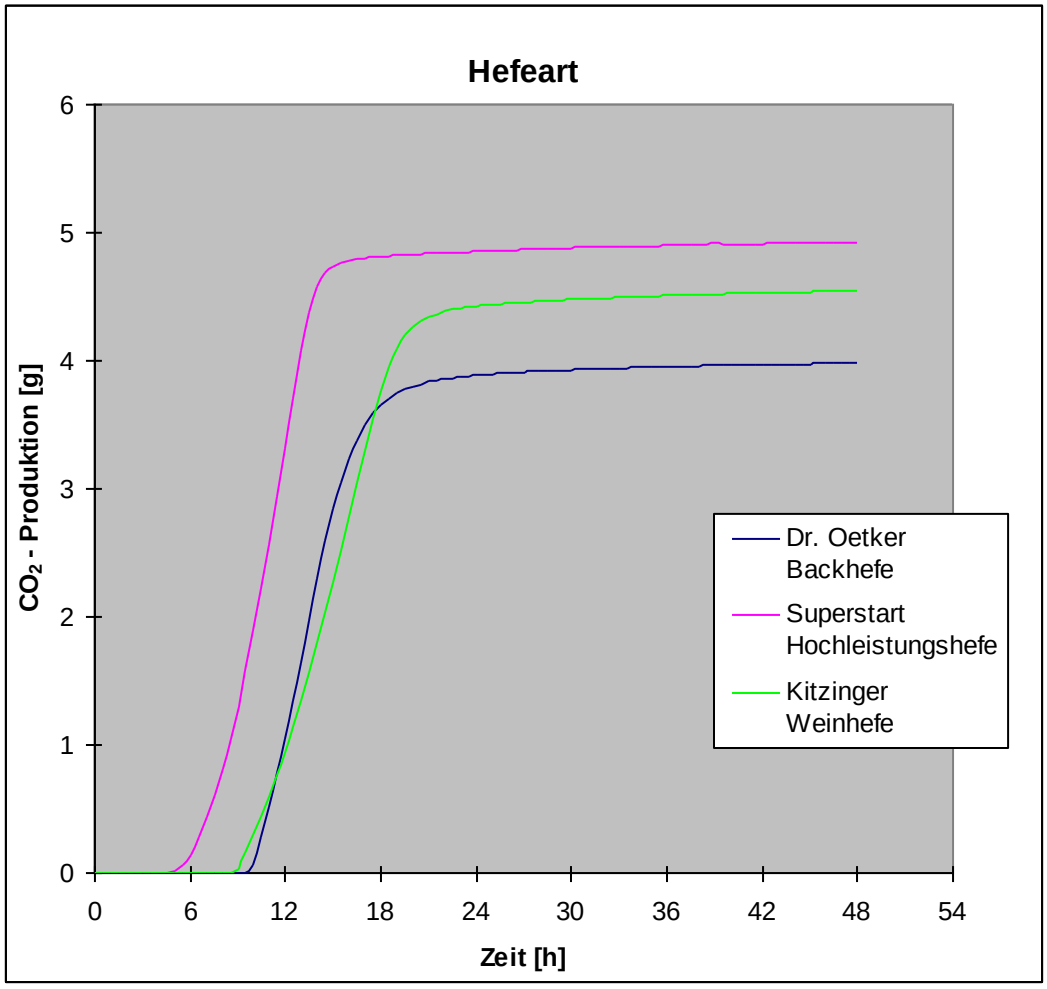

Abb. 23: Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Hefeart

Tab. 2: Auszug aus Messreihen zur Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Hefeart bezogen auf 100 mL Versuchsansatz
(Berechnungen s. Kapitel 8, S. 46; vollständige Messreihen s. Kapitel 8, S. 47)

Hefeart	Gärbeginn [nach h]	CO_2-Ausstoß [g] nach				berechneter Ethanolgehalt [mL] nach 48 h
		6 h	**12 h**	**24 h**	**48 h**	
Dr. Oetker Backehefe	10	0	1,051	3,885	3,984	5,294
Kitzinger Weinhefe	9	0	0,945	4,426	4,548	6,043
Lallemand Superstart	5	0,147	3,317	4,854	4,928	6,548

Es zeigt sich, je stärker und schneller die CO_2-Produktion ist, desto mehr Schaum bildet sich an der Oberfläche des Fermentationsmediums. Eine erhöhte Schaumbildung deutet auf eine starke Gärung und CO_2-Bildung hin. (s. Abb. 21 & 22, S. 20) Die Superstart Hefe, als produktivste Hefe, bildet dabei am meisten Schaum.

Die Hochleistungshefe von Lallemand beginnt als Erste, nach 5 Stunden zu gären und produziert nach 48 Stunden mit 4,928 g den höchsten CO_2-Ausstoß im Vergleich zu den anderen beiden Hefen. Dies entspricht 6,548 mL Ethanol. Die CO_2-Produktion nähert sich dem grafisch ermittelten Grenzwert 5 g an. Laut Herstellerangaben [23] enthält die Superstart Trockenhefe *Saccharomyces cerivisiae* in hochkonzentrierter und stabiler Form, welche speziell für die Bioethanolproduktion entwickelt wurde. Sie zeichnet sich durch einen schnellen Start der alkoholischen Gärung und einer hohen Toleranz bezüglich Stressfaktoren wie Temperatur, pH-Wert, osmotischer Stress, Ethanol (bis 18 Vol%) aus. Der schnelle Fermentationsbeginn beugt zudem Bakterienkontaminationen vor und verbessert die Ethanolausbeute pro Zeiteinheit. Außerdem ist die Bildung von Nebenprodukten wie Glycerol verringert, so Lallemand Ltd [23].

Die Weinhefe beginnt nach 9 Stunden den Gärprozess und produziert innerhalb 48 Stunden 4,548 g Kohlenstoffdioxid, was 6,043 mL Ethanol entspricht. Die Ethanolbildungsgeschwindigkeit (= Steigung der Massenverlustkurve) dieser Hefe ist etwas geringer als die der Hochleistungshefe, da die Kurve der Weinhefe in der Wachstumsphase etwas flacher ist als die der Hochleistungshefe. Der CO_2-Ausstoß der Kitzinger Reinzuchthefe nähert sich dem grafisch ermittelten Grenzwert 4,6 g. Reinzucht Weinhefen werden üblicherweise verwendet, um alkoholische Getränke wie Wein herzustellen. Die Kitzinger Reinzuchthefe wurde laut Hersteller [38] für die Vergärung von Mosten und Herstellung von Fruchtweinen gezüchtet und optimiert.

Die Dr. Oetker Backhefe beginnt als Letzte nach 10 Stunden zu gären und erzielt nach 48 Stunden nur 3,984 g CO_2. Die Ethanolbildungsgeschwindigkeit der Backhefe ist in der Wachstumsphase höher als die der Weinhefe, wie die Steigungen der Kurven zeigen. Der CO_2-Ausstoß nähert sich dem grafisch ermittelten Grenzwert von 4 g.
Da der Restzuckergehalt nach 48 Stunden bei allen drei Versuchsreihen laut Farbskala des Clini-Tests bei ca. 1 g/L liegt (entspricht 0,11 g pro 100 mL Zuckerhirsesaft ohne 10 mL Hefelösung), aber die CO_2-Produktion unterschiedlich groß ist, ist anzunehmen, dass der Zucker von der Hefe nicht nur für die Ethanolproduktion verwertet wird, sondern auch für die Bildung von Gärungsnebenprodukten, Zellwachstum bzw. -vermehrung der Hefe. Es lässt sich vermuten, dass die Hochleistungshefe am wenigsten Neben- und Stoffwechselprodukte bildet, da sie im Vergleich zu den anderen Hefen am meisten CO_2 produziert. Die Kitzinger Weinhefe benötigt sicherlich einen Teil des Substrates neben dem Zellaufbau auch für die Bildung von Nebenprodukten wie Aromastoffe, die für die Bouquetbildung von Weinen erwünscht sind. Daher ist die CO_2-Ausbeute verringert. Backhefen werden als Trieb- und Teiglockerungsmittel bei der Herstellung von Hefegebäcken eingesetzt, bei denen eine starke Gärung erwünscht ist. Auf eine maximale Ethanolbildung kommt es dabei nicht an. Der Zucker, der bei der Bäckerhefe nicht in Ethanol umgewandelt wird, wird vermutlich vermehrt für den Aufbau von Hefezellen verwendet, da die CO_2-Produktion im Vergleich zu den anderen Hefen am geringsten ist.
Die Hochleistungshefe Superstart von Lallemand Ltd. erfüllt aufgrund der gezeigten Versuchsergebnisse am Besten die Anforderungen an eine optimale Hefe. Alle weiteren Versuche werden nun mit dieser Hefe durchgeführt.
[Nach: 3, 16, 23, 38]

3.2.2. Bestimmung der optimalen Hefeanfangskonzentration

Versuchsaufbau

siehe Abb. 17, Seite 18

Versuchsbeschreibung

Diese Versuchsreihe soll die optimale Hefeanfangskonzentration herausstellen. Dabei soll der Literaturwert [8] von 2 g Trockenhefe pro Liter überprüft werden.

Geräte

siehe Kapitel 3.2.1., Seite 19

Chemikalien, Substrate und Gärorganismen

3 x 100 mL Zuckerhirsepresssaft (14,6 %Brix, pH 6)

0,1 g; 0,2 g; 0,4 g Superstart Hefe (Hochleistungshefe von Lallemand Ltd.)

3 x 10 mL isotone Natriumchloridlösung (Ampullen von Braun)

2,230 g destilliertes Wasser (Sperrflüssigkeit)

Durchführung

Um die Versuchsreihen zur Hefekonzentration vergleichen zu können werden folgende Parameter konstant gehalten: Temperatur (24 °C), Hefeart (Superstart), Presssaft aus einer Charge. Variiert wird nur die Hefeanfangskonzentration. Ansonsten wird verfahren wie unter Kapitel 3.2.1., S. 19 (s. Versuchsvorbereitung) bereits beschrieben.

Beobachtung und Auswertung

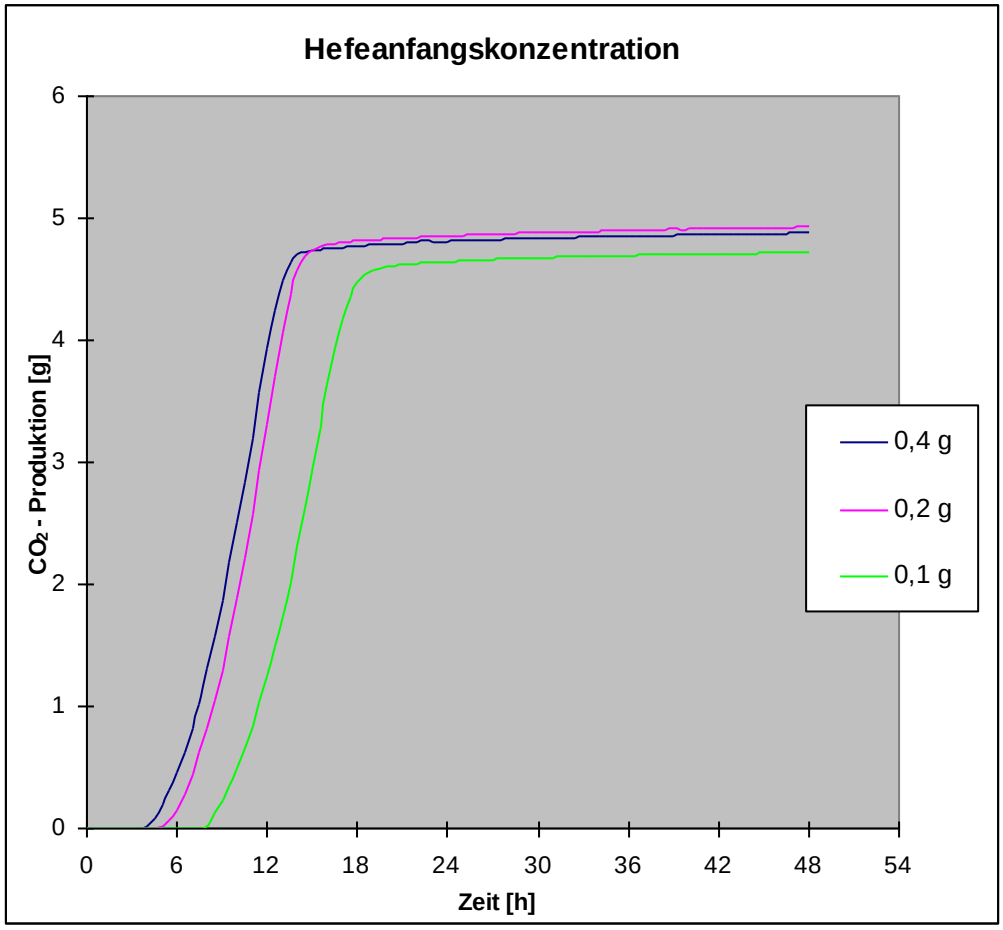

Abb. 24: Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Hefeanfangskonzentration

Tab. 3: Auszug aus Messreihen zur Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Hefeanfangskonzentration bezogen auf 100 mL Versuchsansatz (Berechnungen s. Kapitel 8, S. 46; vollständige Messreihen s. Kapitel 8, S. 48)

Hefe-anfangs-konzentration	Gärbeginn [nach h]	CO_2-Ausstoß [g] nach				berechneter Ethanolgehalt [mL] nach 48 h
		6 h	**12 h**	**24 h**	**48 h**	
0,1 g	8	0	1,247	4,644	4,722	6,274
0,2 g	5	0,147	3,317	4,854	4,928	6,548
0,4 g	4	0,46	3,932	4,808	4,88	6,484

Die Lag-Phase der Hefen ist bei variierender Hefekonzentration unterschiedlich. Während dieser Phase passen sich die Hefezellen an ihr neues Medium Zuckerhirsesaft an. Diese dauert bei 0,1 g Hefe 8 Stunden, bei 0,2 g 5 Stunden und bei 0,4 g 4 Stunden. Dabei findet wegen der CO_2-Gasentwicklung auch eine Schaumbildung an der Oberfläche des Gärmediums statt (s. Abb. 21 & 22, S. 20). Diese ist umso stärker, je höher die Anfangskonzentration der Hefe ist bzw. je intensiver die Gärung ist.

Die Konzentration der Hefe sollte keinesfalls zu gering sein, da sich die Hefe sonst öfter vermehren muss, um die nötige Konzentration an Lebendhefen für den Hauptgärgang zu erreichen. Der Versuchsansatz mit 0,1 g Hefe fordert der Hefe zusätzliche Generationen ab, bis sie die gleiche Zellzahl erreicht wie bei den beiden anderen Versuchsansätzen. Daher wird mehr Zucker für die Hefevermehrung verbraucht, welcher nicht mehr in Ethanol umgesetzt werden kann, wodurch weniger CO_2 bzw. Ethanol produziert wird. „Dadurch verzögert sich nicht nur der Beginn der Gärung, die Hefe hat sich stärker verausgaben müssen, sie ist dadurch stressanfälliger geworden“ [3]. Die „0,1 g Kurve“ flacht bei einem geringeren CO_2-Niveau ab, im Vergleich zu den Versuchen mit 0,2 bzw. 0,4 g Hefeanfangskonzentration. Bei 0,4 g ist zwar der Gärbeginn früher als bei 0,2 g aber die Ethanolausbeute dennoch nicht höher. Die „0,2 g Kurve“ zeigt mit 4,928 g den größten CO_2-Ausstoß.

Bei diesem Versuch zeigt sich analog der Michaelis-Menten-Theorie eine deutliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Hefekonzentration im Zuckerhirsesaft. Grund dafür ist, dass bei der Erhöhung der Hefekonzentration in der gleichen Zeit mehr Substrat gebunden und umgesetzt werden kann. Daher beginnt einerseits die ethanolische Gärung bei einer Hefeanfangskonzentration von 0,4 g früher als bei 0,2 g bzw. 0,1 g (s. Abb. 24, S. 23).

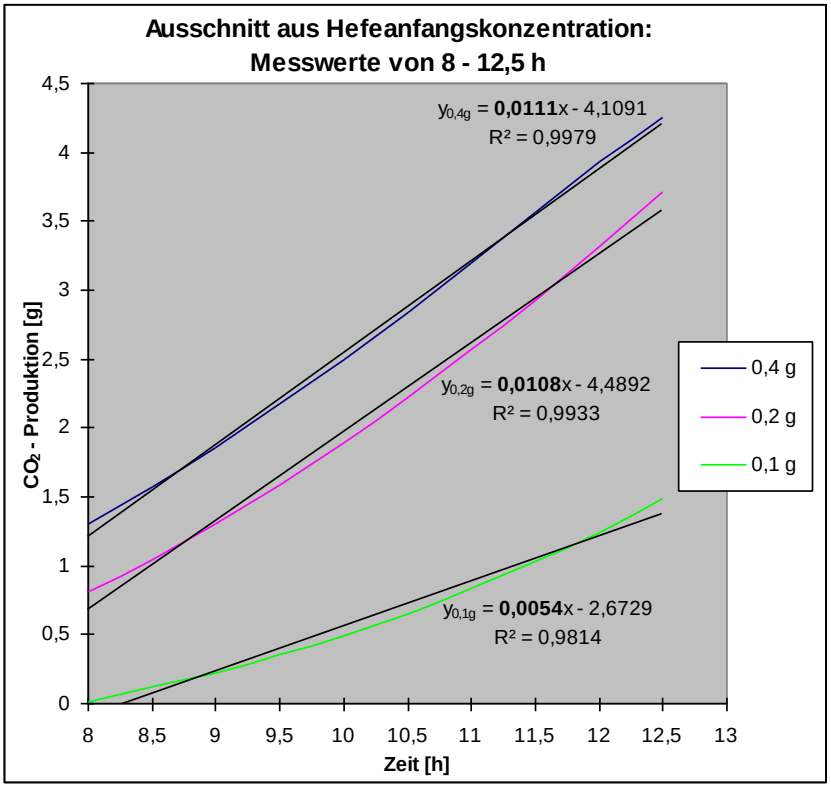

Abb. 25: Ausschnitt aus Messergebnisse der verschiedenen Hefeanfangskonzentrationen mit Trendlinien

Andererseits sind in der Wachstumsphase die Ethanolbildungsgeschwindigkeiten unterschiedlich groß, bezogen auf den gleichen Zeitpunkt (vgl. Abb. 25): Bei 0,4 g ist die Steigung der linearisierten CO_2-Produktion (= schwarze Trendlinie) am steilsten (0,0111 g/h) und bei 0,1 g am flachsten (0,0054 g/h). Wird die Enzymkonzentration immer weiter erhöht, so nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit immer langsamer einem Maximalwert an, bei dem alle Substratmoleküle an ein Enzym gebunden sind. Da die Steigung der 0,4 g-Trendlinie (0,0111g/h) und die der 0,2 g-Trendlinie (0,0108 g/h) nahezu gleich sind, ist anzunehmen, dass bei 0,2 bis 0,4 g Hefe die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Ist eine Lösung mit Substrat gesättigt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt von der Enzymkonzentration abhängig. Die Verwendung von 0,4 g Hefeanfangskonzentration wäre nicht wirtschaftlich, da die Gärung zwar um eine Stunde eher startet als bei einem Ansatz mit 0,2 g Hefe, aber letztendlich zu keinem höheren CO_2-Ausstoß führt, sondern nur zu doppelt so hohen Kosten für die Hefe. Die optimale Hefeanfangskonzentration liegt also, wie auch Gyalai-Korpos et al. [8] herausgefunden haben, bei 2 g/L bzw. 0,2 g pro 100 mL, die für die weitere Versuchsdurchführung verwendet wird.

[Nach: 3, 8, 19, 33]

3.2.3. Bestimmung der optimalen Gärtemperatur

Versuchsaufbau

siehe Abb. 17, Seite 18

Versuchsbeschreibung

Ein weiterer wichtiger Prozessparameter bei der alkoholischen Gärung ist die Temperatur. Um die optimale Fermentationstemperatur herauszufinden wurden Versuche bei drei unterschiedlichen Temperaturen (Abweichung ± 0,5 °C) durchgeführt: bei 14 °C im Kühlschrank, 24 °C bei Zimmertemperatur und 35 °C im mit Zusatzaggregaten beheizten Badezimmer.

Geräte

siehe Kapitel 3.2.1., Seite 19

Chemikalien, Substrate und Gärorganismen

3 x 100 mL Zuckerhirsepresssaft (14,6 %Brix, pH 6)

3 x 0,2 g Superstart Hefe (Hochleistungshefe von Lallemand Ltd.)

3 x 10 mL isotone Natriumchloridlösung (Ampullen von Braun)

2,230 g destilliertes Wasser (Sperrflüssigkeit)

Durchführung

Um die für die Ethanolproduktion ertragreichste Gärtemperatur feststellen zu können, werden folgende Parameter konstant gehalten: Hefekonzentration (2 g/L), Hefeart (Superstart), Presssaft aus einer Charge. Nur die Temperatur, als variable Versuchsgröße, wird spezifisch eingestellt. Dabei ist wichtig, dass Gefäße und Zuckerhirsesaft bei Versuchsbeginn auf Kultivierungstemperatur eingestellt sind, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Ansonsten wird verfahren, wie unter Kapitel 3.2.1. S. 19 unter Versuchsbeschreibung beschrieben.

Beobachtung und Auswertung

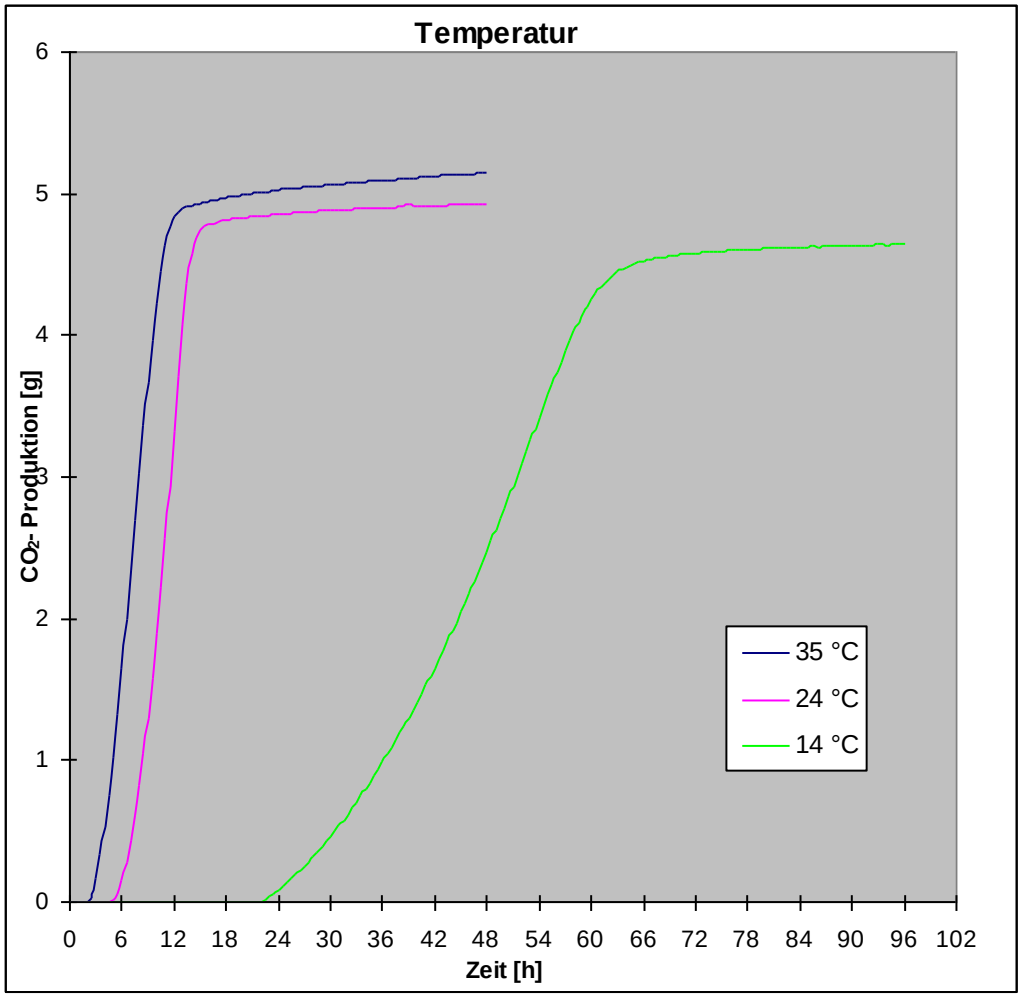

Abb. 26: Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Temperatur

Tab. 4: Auszug aus Messreihen zur Abhängigkeit der CO_2-Produktion von der Temperatur bezogen auf 100 mL Versuchsansatz
(Berechnungen s. Kapitel 8, S.46; vollständige Messreihen s. Kapitel 8, S. 49f)

Temperatur	Gärbeginn [nach h]	CO_2-Ausstoß [g] nach				berechneter Ethanolgehalt [mL] nach 48 h
		6 h	**12 h**	**24 h**	**48 h**	
14 °C	22,5	0	0	0,086	2,473	3,286
24 °C	5	0,147	3,317	4,854	4,928	6,548
35 °C	2,5	1,646	4,838	5,026	5,154	6,848

Hefewachstum und Ethanolbildung sind das Resultat vieler aufeinanderfolgender enzymkatalysierter Reaktionen, die wie jede chemische Reaktion stark durch die Temperatur beeinflusst werden. Die Schaumbildung ist umso kräftiger, je höher die

Temperatur ist. Dies ist ein Indikator für die beginnende Gäraktivität und für die temperaturabhängige Gärintensität (s. Abb. 21 & 22, S. 20). Wie aus der Grafik ersichtlich wird, zeigt die alkoholische Gärung eine typische Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit.

Bei 14 °C beginnt die Gärung nach 22,5 Stunden, 24 °C nach 5 Stunden und bei 35 °C bereits nach 2,5 Stunden. Bei niedrigen Temperaturen können sich die Hefezellen wegen langsamer Stoffwechselvorgänge nicht so schnell vermehren, was zu einem verzögertem Gärbeginn und einer längeren Gärdauer führt. Außerdem ist die Ethanolausbeute bei höherer Temperatur wesentlich größer, denn die 35 °C Kurve nähert sich dem Grenzwert von ca. 5,5 g, wogegen sich die 24 °C Kurve an ca. 5 g annähert und die 14 °C Kurve nur an ca. 4,8 g.

Die RGT-Regel (Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel) bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit. Diese besagt, dass eine Temperaturerhöhung von 10 °C bei chemischen Reaktionen, wie der alkoholischen Gärung zu einer Verdoppelung bis Vervierfachung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

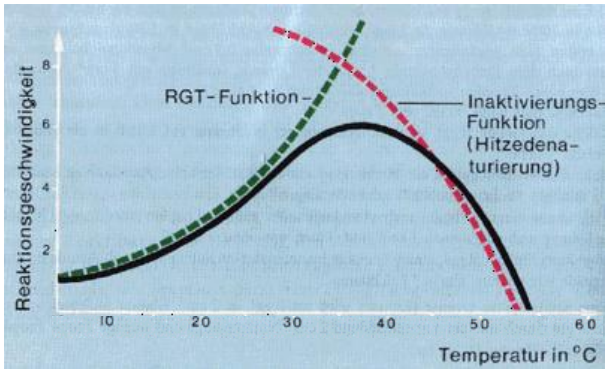

Abb. 27: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Laut Hefner et al. [10] nimmt die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen, wie die alkoholische Gärung, bis zu 38 °C zu, weil die Zuckermoleküle aufgrund schnellerer Molekülbewegung durch eine Temperaturerhöhung öfter mit den aktiven Zentren der Enzyme zusammenstoßen. Ab dieser Temperatur jedoch fällt die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion mit jedem weiteren Temperaturanstieg ab, da es zur Hitzedenaturierung der thermolabilen Enzymproteine kommt. Durch die Hitze lösen sich die zwischenmolekularen Wechselwirkungen, wodurch die Tertiärstruktur verändert wird und damit auch das aktive Zentrum. Die Substratmoleküle können nicht mehr umgesetzt werden und die Enzyme verlieren ihre Wirkung. Beide Einflüsse, RGT-Regel und Denaturierung wirken einander entgegen. Als Resultat erhält man eine Optimumskurve: jedes Enzym hat eine bestimmte optimale Temperatur, bei der die Wechselzahl (Zahl der Substratmoleküle, die ein Enzym pro Sekunde umsetzen kann) maximal ist.

Die Gültigkeit der RGT-Regel zeigt sich auch bei diesen Versuchsergebnissen: Die alkoholische Gärung verläuft bei 24 °C ca. dreimal so schnell wie bei 14 °C, da die Steigung der 24 °C Kurve in etwa um das dreifache steiler ist als die 14 °C Kurve. Die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt sich jedoch nicht bei einer Temperaturerhöhung von 24 °C auf 35 °C. Der Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit von 24 °C auf 35 °C ist deshalb so gering, weil die Zuwächse immer kleiner werden, je näher man dem Optimum (ca. 38 °C) kommt. Mit 35 °C ist man schon sehr nahe der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. In Folge der RGT-Regel, ist der Gärbeginn bei 35 °C (2,5 Stunden) doppelt so schnell wie bei 24 °C (5 Stunden). Nach 48 Stunden errechnen sich folgende CO_2-Ausbeutezunahmen pro ca. 10 °C Temperaturanstieg: von 14 °C auf 24 °C nimmt die CO_2-Produktion bzw. Ethanolausbeute um 99 %, von 2,473 auf 4,928g Ethanol, zu und von 24 °C auf 35 °C nur um 4,6 %, entsprechend einer Steigerung von 0,23 g Ethanol. Bei 35 °C zeigt sich nach 48 Stunden die höchste absolute Ethanolausbeute von 6,848 mL, im Vergleich zu den anderen Prozesstemperaturen, weshalb dies als Optimaltemperatur betrachtet werden kann. Unter wirtschaftlicher Betrachtungsweise ist allerdings zu überlegen, ob die Zusatzkosten für die Temperaturerhöhung von 24 °C auf 35 °C den Zusatznutzen eines schnelleren Gärbeginns und einer Mehrausbeute von unter 5 % rechtfertigen.

„Jedoch ist [auch] zu beachten, dass mit steigender Temperatur die Gefahr einer Kontamination, meist durch Milchsäurebakterien steigt, die Ethanolresistenz abnimmt und die Bildung der Gärungsnebenprodukte zunimmt“ [16]. Dies sind Glycerol, Ester und höhere Alkohole. Für die Bioethanolproduktion sind diese Bestandteile unerwünscht, da sie die Qualität des Ethanols für Kraftstoffe mindern.

[Nach: 2, 3, 10, 16, 29]

3.2.4. Verwendung von Nährsalzen

Versuchsaufbau

siehe Abb. 17, Seite 18

Versuchsbeschreibung

Es soll getestet werden, ob durch Nährsalzzugabe die Ethanolbildungsgeschwindigkeit und –ausbeute gesteigert werden kann. Dabei werden zwei Nährsalze der führenden

Markthersteller Erbslöh (EnerTrace KS) und Lallemand Ltd. (AYF 1000) verwendet, die speziell für die Fermentation von Bioethanol eingesetzt werden.

Abb. 28: Nährsalz AYF 1000 (Lallemand Ltd.)

Abb. 29: Nährsalz EnerTrace KS (Erbslöh)

Geräte

siehe Kapitel 3.2.1., S.19

Chemikalien, Substrate und Gärorganismen

3 x 100 mL Zuckerhirsepresssaft (14,6 %Brix, pH 6)

0,2 g Superstart Hefe (Hochleistungshefe von Lallemand Ltd.)

3 x 10 mL isotone Natriumchloridlösung (Ampullen von Braun)

2,230 g destilliertes Wasser (Sperrflüssigkeit)

0,2 g „EnerTrace KS“ (Nährsalz von Erbslöh)

0,2 g „AYF 1000“ (Nährsalz von Lallemand Ltd.)

Durchführung

Es soll eine effiziente Konversion zu Ethanol durch den Einsatz von Nährsalzen erreicht werden. Dazu werden folgende Parameter konstant gehalten: Hefekonzentration (2 g/L), Temperatur (24 °C), Hefeart (Superstart) und Presssaft aus einer Charge. Die abgewogenen Nährsalze EnerTraceKS (0,2 g) und AYF 1000 (0,2 g) werden laut Herstellerangaben [22; 28] jeweils in den Gäransatz gegeben. Eine weitere Zugabe während des Fermentationsprozesses erfolgt nicht. Ansonsten wird verfahren, wie unter Kapitel 3.2.1., S. 19 unter Versuchsbeschreibung beschrieben.

Beobachtung und Auswertung

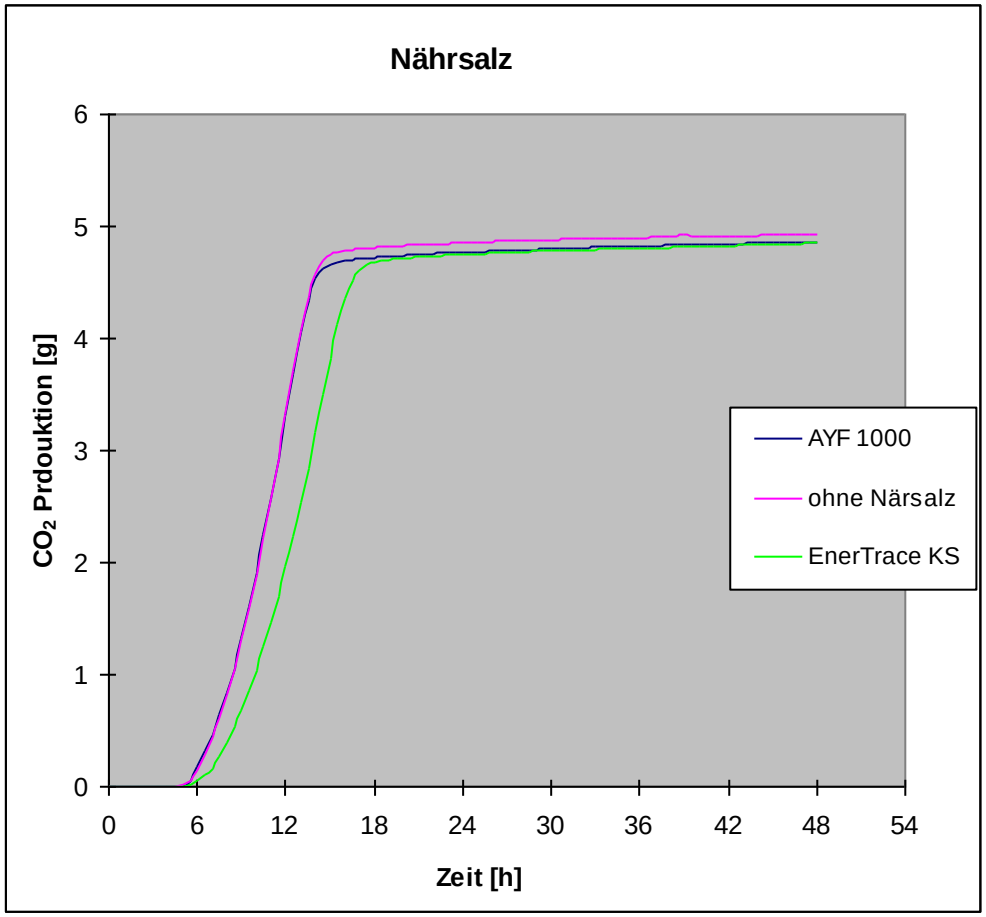

Abb. 30: Abhängigkeit der CO_2-Produktion von Nährsalzzugaben

Tabelle 5: Auszug aus Messreihen zur Abhängigkeit der CO_2-Produktion von Nährsalzzugaben bezogen auf 100 mL Versuchsansatz
(Berechnungen s. Kapitel 8, S.46; vollständige Messreihen s. Kapitel 8, S. 51)

Nährsalz	Gärbeginn [nach h]	CO_2-Ausstoß [g] nach				berechneter Ethanolgehalt [mL] nach 48 h
		6 h	**12 h**	**24 h**	**48 h**	
EnertraceKS Erbslöh	5,5	0,052	1,959	4,750	4,852	6,447
AYF 1000 Lallemand	5,5	0,173	3,301	4,768	4,864	6,463
Ohne Nährsalz	5	0,147	3,317	4,854	4,928	6,548

Je nach Lebensphase benötigt die Hefe für ihren Stoffwechsel und ihr anaerobes Wachstum, neben einer Kohlenstoffquelle, verschiedene Nährsalze wie anorganische Ionen: Magnesium (Mg^{2+}), Zink (Zn^{2+}), Kalium (K^{+}), Eisen (Fe^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), Mangan (Mn^{2+}), Calcium (Ca^{2+}), aber auch Phosphate, Sulfate, Aminosäuren, Stickstoff

und Vitamine. Diese können sie unter anaeroben Bedingungen selbst nicht produzieren. Laut Lallemand Ltd. [28] enthält das Nährsalz AYF 1000 eine Mischung aus Enzymen, anorganischen und organischen Stickstoff und Spurenelemente, um die Hefe beim Wachstum und der Zellvermehrung mit der richtigen Nährstoffbalance zu versorgen. Höhere Konzentrationen an wirksamen Hefezellen produzieren schneller Alkohol und konsumieren Zucker effizienter bei niedrigem Restzuckergehalt. Das Nährsalz soll die Nebenproduktbildung minimieren und eine sichere Endvergärung fördern, so der Hersteller. Laut Angaben der Firma Erbslöh [22] soll EnerTrace KS bei nährstoffarmen Medien eingesetzt werden, um die Hefeaktivität zu fördern. Stickstoff, Phosphat, Vitamine, Mineralien und Spurenelemente fördern die Gäraktivität und die Hefevitalität. Gärstörungen durch Nährstoffmangel werden verhindert.

In dieser Versuchsreihe wurde durch die Zugabe von Nährsalzen wie AYF 1000 bzw. EnerTrace KS keine Erhöhung der CO_2- bzw. Ethanolausbeute erzielt im Vergleich zum Gärversuch ohne Nährsalz. Die Ethanolbildungsgeschwindigkeit ist bei EnerTrace KS sogar etwas geringer als bei den beiden anderen Versuchen. Die alkoholische Gärung beginnt bei beiden Versuchsansätzen mit Nährsalz nach 5,5 Stunden, ohne Nährsalz nach 5 Stunden. Der Versuchsansatz mit AYF 1000 produziert nach 48 Stunden 4,864 g CO_2, mit EnerTraceKS 4,852 g und der ohne Nährsalz 4,928 g.

Es lässt sich also vermuten, dass im Presssaft ein ausreichendes Nährstoffangebot vorhanden ist. Die eingelagerten Nährstoffe in der Pflanze finden sich teilweise im Presssaft wieder, die auch die Hefen für die Fermentation benötigen. Die Gehalte an Mineralstoffen im Erntegut weisen folgende Mittelwerte bei verschiedenen Sorghumsorten auf:

Tab. 6: Ausschnitt aus: Mineralstoffentzüge (in g pro kg Trockenmasse) der Sorghumsorten zur Ernte am 05.10.2009 [16]

N	P	K	Ca	Mg
12,7	1,8	15,8	2,8	2,2

Laut Rückfrage bei Mitarbeitern des TFZ Straubing werden insbesondere die Jungpflanzen mit 120 kg Stickstoff pro ha gedüngt. Der Stickstoff spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für das Hefewachstum und den Stoffwechsel. Wenn sich Hefe in einem Gärsubstrat vermehren soll, so ist die Synthese stickstoffhaltiger und anderer Zellinhaltsstoffe dafür Voraussetzung. Da die Zuckerhirse ein hohes Nährstoffaneignungsvermögen besitzt, reichen die stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe und

Mineralien, die anscheinend auch im Presssaft vorliegen, zur Vermehrung der Hefe und zur Vergärung aus.
Auch Strehler et al. [15] zeigten, dass Nährstoffzugaben wie Stickstoff und Phosphor bei der Fermentation von Zuckerhirse keinen bedeutenden Einfluss auf die Vermehrungsphase der Hefe haben und die Ethanolausbeute dadurch nicht gesteigert werden konnte.
Nährstoffe sollten daher erst von außen zugesetzt werden, wenn im Medium eine Mangelsituation vorliegt.
[Nach: 3, 14, 15, 16, 22, 28]

3.3. Überprüfung der Versuchsergebnisse

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Hefeart, Hefeanfangskonzentration sowie die Temperatur einen entscheidenden Beitrag zur Erhöhung der Ethanolausbeute leisten und zur Verkürzung der Lag-Phase führen. Mit der Superstarthefe von Lallemand, einer Anfangskonzentration von 2 g/L, bei einer Temperatur von 35 °C und ohne Nährsalzzugabe werden die besten Ergebnisse erzielt.
Basierend auf diesen Ergebnissen wird ein Gäransatz unter optimalen Versuchsbedingungen durchgeführt, um einerseits den Ethanolgehalt stöchiometrisch über den CO_2-Verlust zu berechnen und andererseits die Ethanolausbeute über die HPLC-Messung zu ermitteln. Dazu wird vor Messbeginn eine Probe vom unvergorenen Zuckerhirsesaft entnommen, als auch nach Gärende (48 h). Während des Gärvorganges wird keine Probe entnommen, da dies sonst als CO_2-Massenverlust gemessen würde. Es soll der stöchiometrisch berechnete Ethanolgehalt durch CO_2-Massenverlust mit der tatsächlichen Ethanolausbeute, gemessen durch die HPLC, verglichen und überprüft werden. Zudem soll bestimmt werden, wie effizient Zucker in Ethanol umgewandelt wird.
Bei der HPLC handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Je nach Molekülbeschaffenheit wandern die verschiedenen Verbindungen schneller oder langsamer durch die Trennsäule und erreichen den Messdetektor nach unterschiedlicher Zeit. In der Messzelle wird je nach Menge des Stoffes ein unterschiedlich starker Messausschlag mit der zugehörigen

Zeitangabe festgehalten. Die HPLC-Analyse ist vom Wissenschaftszentrum Straubing durchgeführt worden.

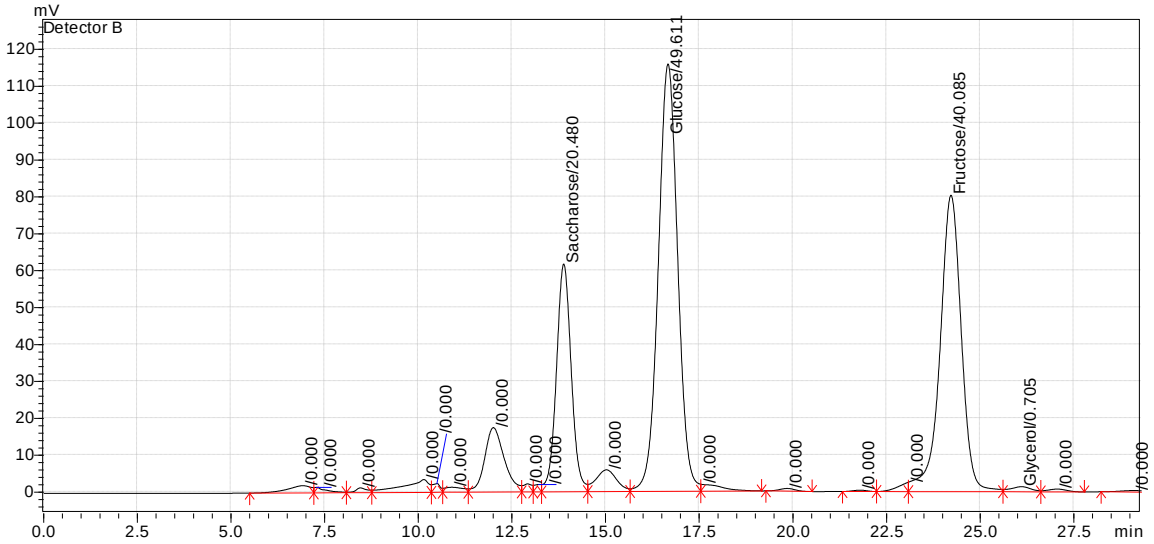

Abb. 31: HPLC-Chromatogramm des unvergorenen Zuckerhirsesaftes

Im Gäransatz sind vor Gärbeginn laut HPLC-Messung 20,48 g/L Saccharose, 40,08 g/L Fructose und 49,61 g/L Glucose enthalten (s. Abb. 31). Daraus ergeben sich bei 100 mL Zuckerhirsesaft Absolutwerte von 2,048 g Saccharose, 4,008 g Fructose und 4,961 g Glucose. Das typische Zuckermuster der Zuckerhirse (vgl. 2.1.2. S. 5) zeigt sich in der HPLC-Analyse nicht, da der Saft aus gelagerter Zuckerhirse stammt und die Abbauprozesse der Saccharose schon begonnen haben. Aus den Zuckermengen lässt sich eine theoretische Ethanolausbeute von 7,222 mL errechnen, denn laut Technologie- und Förderzentrum [16] entsteht aus 1 t Saccharose 0,68 m^3 Ethanol und aus 1 t Fructose oder Glucose 0,65 m^3 Ethanol.

Nach 48 Stunden ergeben sich 5,154 g CO_2, was 6,848 mL Ethanol entspricht (Berechnung s. Kapitel 8, S. 46). Die HPLC-Messung ermittelt 46,99 g/L Ethanol was bei 100 mL Zuckerhirsesaft einem absoluten Ethanolgehalt von 6,569 mL entspricht (Berechnungen zur HPLC s. Kapitel 8, S. 52f).

Die Ethanolbildung ist jedoch von Zellwachstum, Zellvermehrung und Nebenproduktbildung der Hefe begleitet. Die für diese Prozesse gebrauchte Substratmenge (Zucker) kann demnach nicht in Ethanol umgesetzt werden. Dadurch ist die tatsächlich ermittelte Ethanolausbeute, sowohl mit HPLC als auch über CO_2-Massenverlust gemessen, kleiner als der theoretisch errechnete Wert. Bezogen auf den mit der HPLC gemessenen Ethanolgehalt werden 91 % der theoretischen Ausbeute erzielt. Der Praxiswert ist zudem niedriger, da die Gärung zunehmend langsamer wird

und deshalb aus Effizienzgründen abgebrochen wird, bevor der ganze Zucker vergoren wurde. Laut HPLC-Analyse (s. Abb. 33, S. 52) sind nach Gärabbruch (48 h) 0,23 g/L Sacchaorse und 0,37 g/L Glucose und keine Fructose enthalten. Es bleibt also ein absoluter Restzuckergehalt von 0,066 g, aus dem 0,044 mL Ethanol gewonnen werden könnte (Berechnungen s. Kapitel 8, S. 53).
Der stöchiometrisch berechnete Ethanolgehalt über den CO_2-Massenverlust (6,848 mL) und der über die HPLC gemessene Ethanolgehalt (6,569 mL) haben eine relative Abweichung von ca. 4 %, sodass man sagen kann, dass die gravimetrische Messung des CO_2-Verlustes mit der Präzisionswaage ein sehr verlässliches Ergebnis liefert. Es zeigt sich, dass unter optimalen Gärbedingungen ein sehr hoher Anteil des Zuckers (91 %) in Ethanol umgewandelt wird. Die restlichen 9 % des Zuckers sind einerseits Restzucker (0,6 %) und andererseits wird er für den Aufbau von Zellsubstanz der Hefe und Bildung von Nebenprodukten verbraucht (8,4 %).
[Nach: 16, 34]

3.4. Reflexion – Probleme, Fehlerquellen und Verbesserungen

Bei der Erfassung des CO_2-Massenverlustes stellen sich drei Fehlerquellen heraus: zum einen ist zu beachten, dass sich 1,7 g CO_2 pro Liter (bei 20 °C) in der Sperrflüssigkeit Wasser löst. Folglich kann dieser CO_2-Verlust nicht als Masseverlust gemessen werden. Das Volumen der Sperrflüssigkeit Wasser beträgt 2,230g (entspricht 2,236 mL) und daher haben sich 0,0038g ≈ 0,004 g CO_2 gelöst, welches in der Messung nicht erfasst werden konnte (Berechnungen s. Kapitel 8, S. 54). Dieser Betrag ist vernachlässigbar klein und daher werden die Messergebnisse nicht wesentlich verfälscht. Des weiteren ergab sich das Problem, dass die Sperrflüssigkeit Wasser verdunstet. Um die Verdunstung zu minimieren, verschloss ich die Öffnung des Gärspundes mit einer Frischhaltefolie, die mit winzig kleinen Löchern perforiert war. Dadurch ist der durchschnittliche Gewichtsverlust bedingt durch Verdunstung vernachlässigbar gering. Als letzter messtechnischer Fehler ist die Messungenauigkeit der Waage zu nennen. Die Standardabweichung der Präzisionswaage Sartorius BP 310 S ist kleiner ± 0,001 g und die Linearitätsabweichung kleiner ± 0,002 g. Diese Messungenauigkeiten bei der Erfassung des Masseverlustes liegen im tausendstel Bereich und sind daher vernachlässigbar gering.

Um die Ethanolausbeute weiter zu erhöhen spielt die Zuckermenge im Zuckerhirsesaft eine entscheidende Rolle. In meinen Vorversuchen habe ich einen Presssaft mit 19 %Brix verwendet. Dadurch war die Kohlenstoffdioxidproduktion größer als bei 14,6 %Brix und damit auch die Ethanolausbeute (s. Kapitel 8, S. 54, Abb. 34). Um die Ethanolausbeute weiter zu optimieren ist bei der Sortenwahl unbedingt auf ein hohes Zuckerertrags-Potenzial der Zuckerhirse zu achten sowie auf den richtigen Erntezeitpunkt, wenn die Zuckerbildung weitgehend erfolgt ist. Entscheidend für den Zuckergehalt sind auch die Lagerung der Pflanze nach der Ernte sowie das Verfahren zur Saftgewinnung. Nur eine optimierte Prozesskette liefert auch ein optimales Endprodukt als Gärsubstrat.

Eine weitere Maßnahme zur Erhöhung der Ethanolausbeute ist eine ordnungsgemäße Rehydrierung der Trockenhefe. Zur zügigen Vergärung des Presssaftes ist es erforderlich, die Vermehrungsbedingungen der Hefe schon frühzeitig so zu gestalten, dass ihre Zellmasse und Vitalität dazu ausreicht. Ich habe die Rehydrierung immer bei Zimmertemperatur (24 °C) durchgeführt. Wird die Hefe aber bei 35 °C rehydriert, so wäre die Lag-Phase kürzer und die Fermentation könnte früher starten.

Außerdem sollte der Gäransatz zu Beginn der Messung gut durchmischt werden, sodass sich die Hefezellen im Gäransatz gleichmäßig verteilen. Auch während des Fermentationsprozesses ist ein regelmäßiges Schwenken des Versuchsansatzes sinnvoll, da die Hefen in ihrer nächsten Umgebung Nährstoffe und Substrat verbraucht haben und somit die Zelle wieder mit neuer Lösung versorgt wird. Dies wurde in meinen Versuchen nicht ausreichend durchgeführt, weshalb die Ethanolausbeute noch weiter gesteigert bzw. die Gärung schneller abgeschlossen werden könnte.

[Nach: 3, 39]

4. Ausblick: Bioethanol als künftiger Treibstoff

Abb. 32: Zapfpistole für Bioethanol

Bioethanol wird entweder als Reinkraftstoff genutzt (geringere Marktbedeutung) oder mit unterschiedlichen Anteilen zu konventionellem Otto-Kraftstoff (große Marktbedeutung) beigemischt und mit diesem vermarktet. Allein Brasilien und die USA realisieren rund 70 %, also ca. 40 Mrd. Liter der Weltproduktion an Bioethanol für den Kraftstoffsektor. In der EU wurden 2006 etwa 1,5 Mrd. Liter Bioethanol produziert. In Deutschland ist derzeit laut DIN EN 228 eine 5 %-ige Beimischung (E5-Kraftstoff) zum Ottokraftstoff zugelassen. In den folgenden Jahren wird eine sukzessive Erhöhung des Ethanolanteils bis zu 10 % (E10-Kraftstoff) verpflichtend. Herkömmliche Ottomotoren vertragen diese Beimischungen. Bei Verwendung des E85 (85 % Ethanol, 15 % Benzin) als Treibstoff sind Ethanolmotoren bzw. sogenannte „Flexible Fuel Vehicles“, nötig.

Biotreibstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen leisten einen wertvollen Beitrag zur Streckung der begrenzt verfügbaren fossilen Rohstoffressourcen und zum Klimaschutz. Ein umfangreiches Sortenscreening bei Zuckerhirse am Technologie- und Förderzentrum Straubing hat gezeigt, dass der Anbau von Sorghumhirse in Bayern erfolgreich möglich ist. Es besteht aber noch Züchtungsbedarf um Ertrag und Kältetoleranz zu verbessern. Um diese Potenziale zu erforschen, hat der Freistaat Bayern die Aktivitäten um das Thema Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen im Straubinger Kompetenzzentrum gebündelt. Im Energiemix der Zukunft kommt gerade den Biokraftstoffen eine große Bedeutung zu, welche durch steigende Erdölpreise an Wettbewerbsfähigkeit gewinnen. Biotreibstoffe wachsen in Zukunft auf dem Feld und Zuckerhirse könnte eine der bedeutenden Energiepflanzen der Zukunft in unseren Regionen werden.

[Nach: 7, 11, 16]

5. Zusammenfassung der Seminararbeit

Im Zuge der Klimaerwärmung aufgrund von CO_2-Emissionen und der Verknappung der Erdölreserven ist man bemüht, alternative und umweltfreundliche Treibstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen zu finden. Bioethanol aus Zuckerhirse (*Sorghum saccharatum*) könnte in gewisser Weise eine deutsche Antwort auf den weltweiten Klimawandel sein, weil es fossile Kraftstoffe ersetzen kann. Als tropische C_4-Pflanze kommt sie mit Extremsituationen wie Trockenheit besser zurecht als viele heimische Getreide. Dies und die Erdölknappheit machen die Sorghumhirse als alternativen CO_2-neutralen Rohstofflieferant für die Bioethanolproduktion interessant.

Aus dem zuckerhaltigen Presssaft der Hirsepflanze lässt sich direkt durch alkoholische Gärung Bioethanol gewinnen. Die Mikroorganismen *Saccharomyces cerivisiae*, welche spezifische Enzyme enthalten, verstoffwechseln die im Zuckerhirsesaft enthaltenen C_6-Zucker über den Emden-Meyer-Parnas-Weg (Glykolyse) zu Pyruvat und unter CO_2-Abspaltung weiter zu Ethanol. Da CO_2 zu gleichen Teilen wie Ethanol gebildet wird, ist ein Massenverlust bei der Fermentation zu verzeichnen.

Auf dem Weg von der Pflanze zum Kraftstoff sind viele Schritte zu optimieren, insbesondere die Einflussfaktoren auf die Fermentation von Zuckerhirse. Im Praxisteil der Arbeit werden Hefeart, Hefeanfangskonzentration, Temperatur und Nährstoffe bei der Vergärung von Zuckerhirsesaft bei gegebener Zuckerkonzentration untersucht. Es zeigt sich, dass die optimale Wahl der Hefeart (Superstart von Lallemand Ltd.), Hefeanfangskonzentration (2 g/L) und Temperatur (35 °C) zu einer maximalen Ethanolausbeute führen, sodass 91 % der theoretischen Ethanolausbeute erzielt worden sind. Außerdem führt die Hefe Superstart bei hoher Temperatur zu einem schnellen Gärbeginn als auch zu einer hohen Ethanolausbeute. Eine weitere Erhöhung der Hefeanfangskonzentration über den Optimalwert hinaus, führt zwar zu einem früheren Gärbeginn, nicht aber zur Erhöhung der Ethanolausbeute, sondern nur zu hohen Kosten für die Hefe. Von Vorteil ist der ausgewogene Nährstoffgehalt im Presssaft, sodass Nährstoffzugaben, die die Ethanolproduktion zusätzlich verteuern würden, entfallen können, ohne dass die Ethanolausbeute leidet.

Die Optimierung der Konversion von Zuckerhirsesaft zu Bioethanol stellt dabei nur einen von vielen Prozessschritten dar, die auf dem Weg von der Pflanze in den Tank bewerkstelligt werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

Bücher und Zeitschriften:

1. Bolik, C. J.;
   Anbau und Nutzung der Zuckerhirse im Süddeutschen Raum (Sorghum bicolor (L.) Moench), Einbeck, 1994

2. Campbell, N. A.; Dt. Übers. Von Markl J.;
   Biologie, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akad. Verlag, 1997

3. Dittrich, H. H., Großmann, M.;
   Mikrobiologie des Weines, Stuttgart, Verl. Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005[3]

4. Dahlhausen, G.;
   Über den Einfluss einiger pharmakologisch interessanter Verbindungen auf die alkoholische Gärung und das Wachstum untergäriger Reinzuchthefe, Frankfurt a. M, 1959

5. Follmann, H.;
   Biochemie – Grundlagen und Experimente, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, B. G. Teubner GmbH, 2001

6. Fritsche, W.;
   Mirkobiologie, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 2002[3]

7. Grosskopf, W., Henze, A., Kloos, R.;
   Forschungsförderung Nachwachsende Rohstoffe, Bereich Gärungsalkohol – Stand und Perspektiven, Frankfurt a. M., Verlagsunion Agrar, 1988

8. Gyalai-Korpos, M., Feczák, J.,Réczey, K.;
   Sweet Sorghum juice as a possible feedstock for bioethanol production. Hungarian Journal of Industrial Chemistry, p.43-48, Budapest, 2008

9. Hartmann, R.;
Prozesskontrolle von Gärvorgängen - Langzeitversuche mit PC – gestützten Laborwaagen, in: Praxis der Naturwissenschaften: Chemie in der Schule, 2002, Heft 1/51, S.18 – 24

10. Hefner, A., Herrmann, G., Kraus, W., Kreß, C., Orlik, F., Spichtinger, R.;
Galvani – Chemie 11, Ausgabe B, München, Bay. Schulbuchverlag München GmbH, 2009

11. Kaltschmitt, M., Hartmann, H., Hofbauer, H.;
Energie aus Biomasse – Grundlagen, Techniken und Verfahren, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 2009[2]

12. Liebhard, P.;
Zuckerhirse (*Sorghum saccharatum*) – ein nachwachsender Rohstoff für die Bioalkoholerzeugung, in: Die Bodenkultur – Journal für landwirtschaftliche Forschung, 1988, 39. Band Heft 1, S. 15- 36

13. Meinhard, B., Moisl, F.;
Abitur Training – Biologie 1 Leistungskurs, o. O, Stark Verlag, 1995

14. Richter, K.;
Biotechnologische Grundlagen der ethanolischen Gärung - Möglichkeiten und Grenzen der Intensivierung dieses Fermentationsprozesses, Berlin, 1987

15. Strehler, A., Stützle, W., Buldau, D.;
Erarbeitung verfahrenstechnischer Vorschläge zur Gewinnung von Zucker, Futtermitteln und Ethanol aus Zuckerhirse in Bezug auf die Verfahrensschritte vom Anbau bis zum Endprodukt unter besonderer Beachtung der Wirtschaftlichkeit, Freising- Weihenstephan, 1987

16. Technologie- und Förderzentrum (TFZ) im Kompetenzzentrum für Nachwachsende Rohstoffe;
Ethanol aus Zuckerhirse – Gesamtkonzept zur nachhaltigen Nutzung von

Zuckerhirse als Rohstoff für die Ethanolherstellung (Zwischenbericht), Straubing, 2010

Internetseiten

17. Zuckerhirse
http://www.tfz.bayern.de/rohstoffpflanzen/16022/mb_p_rl_anbauhinweise_sorghum.pdf
(Stand: 25.06.2010)

18. Mohrenhirse
http://de.wikipedia.org/wiki/Mohrenhirse
(Stand: 26.06.2010)

19. Optimierung der alkoholischen Gärung
http://mitglied.multimania.de/genie1805/Pflanzenphysiologie/Theorie/hefephysiologie.htm
(Stand: 08.07.2010)

20. Prinzip der Biokatalyse
http://www.u-helmich.de/bio/stw/biokatalyse/katalyse01.html
(Stand: 08.07.2010)

21. Zuckerhirse
http://www.energiepflanzen.info/pflanzen/portraets/zuckerhirse.html
(Stand: 15.08.2010)

22. Datenblatt zu Nährsalz EnerTraceKS, Erbslöh
per E-Mail angefordert
(Stand: 20.08.2010)

23. Datenblatt Superstart Hocheistungshefe, Lallemand
http://www.ethanoltech.com/PDF/Superstart.pdf
(Stand: 20.08.2010)

24. Glykolyse
http://www.u-helmich.de/bio/stw/reihe3/glyco1.htm#Anchor-Schritt-37516
http://www.u-helmich.de/bio/stw/reihe3/glyco2.htm
http://www.u-helmich.de/bio/stw/reihe3/glyco3.html
(Stand: 23.08.2010)

25. Glykolyse
http://de.wikipedia.org/wiki/Glykolyse
(Stand: 23.08.2010)

26. C_4-Pflanze
http://de.wikipedia.org/wiki/C4-Pflanze
(Stand: 26.08.2010)

27. Alkoholische Gärung
http://www.alkoholischegaerung.de/
(Stand: 29.08.2010)

28. Datenblatt Nährsalz AYF 1000, Lallemand Ltd.
http://www.ethanoltech.com/PDF/AYF1000.pdf
(Stand: 30.08.2010)

29. Abhängigkeit der Enzymaktivität von Außenfaktoren
http://www.u-helmich.de/bio/stw/biokatalyse/katalyse03.html
(Stand: 06.09.2010)

30. Dichte von Ethanol
http://www.tu-chemnitz.de/chemie/physchem/files/praktika/bmp/V-D-Anleitung09.pdf
(Stand: 27.09.2010)

31. Dichte von Wasser

http://www.wissenschaft-technik-ethik.de/wasser_dichte.html
(Stand: 27.09.2010)

32. Löslichkeit von CO_2 in Wasser
http://de.wikipedia.org/wiki/Kohlenstoffdioxid
(Stand: 27.09.2010)

33. Enzyme in der Labormedizin
http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/enzyme/lbef_enzyme.htm
(Stand: 09.10.2010)

34. HPLC
http://de.wikipedia.org/wiki/HPLC
(Stand: 23.10.2010)

35. Kellereibedarf Schmickl GesnbR - Zucker Alkohol Umrechnung
http://www.schnapsbrennen.at/zuckerAlkohol.php?focus=bri&oec=&kmw=&bri=14%2C6&zgl=&apg=&agl=&apv=&x=20&y=6
(Stand: 23.10.2010)

Sonstiges :

36. Bedienungsanleitung für HI 96801 – Refraktometer für den Zuckergehalt, Stand 08/09 (Version 2), Hanna Instruments Deutschland GmbH, Lazarus-Mannheimer Straße 2-6, D-77694 Kehl am Rhein

37. Anleitung zum Clini-Test, Stand 09/ 2007
C. Schliessmann Kellerei-Chemie GmbH & Co. KG, Auwiesenstraße 5, 74523 Schwäbisch Hall

38. Verpackung der Kitzinger Weinhefe
Paul Arauner GmbH & Co. KG, Wörthstraße 34/36, D-97318 Kitzingen

39. Bedienungsanleitung Sartorius BP 310 S, Stand 12/1999
Sartorius AG, Weender Landstraße 94-108, 37075 Göttingen

7. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

- Abb.1: selbst erstellt
- Abb.2: http://www.istockphoto.com/stock-illustration-8453530-green-biofuel.php
- Abb.3: http://chestofbooks.com/reference/American-Cyclopaedia-11/images/Chinese-Sugar-Cane-Sorghum-vulgare-var-saccharatum.jpg
- Abb.4: Powerpoint Präsentation im Masterstudiengang Nachwachsende Rohstoffe in Straubing, 2010
- Abb.5: Powerpoint Präsentation im Masterstudiengang Nachwachsende Rohstoffe in Straubing, 2010
- Abb.6: TFZ - Ethanol aus Zuckerhirse (Zwischenbericht), S.173 [16]
- Abb.7: TFZ Straubing, Plakat: Ethanol aus Zuckerhirse - Gesamtkonzept zur nachhaltigen Nutzung von Zuckerhirse als Rohstoff für die Ethanolherstellung
- Abb.8: http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3411-html&image=3411_levures1
- Abb.9: http://www.vetmed.uni-giessen.de/biochem/Folien/Folie4-3.png
- Abb.10:http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/stoffwechsel/glykolyse.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/stoffwechsel/glycolyse/ablauf.vscml.html
- Abb.11: http://www.biosite.dk/leksikon/images/alcoferm.gif
- Abb.12: selbst erstellt
- Abb.13: selbst erstellt
- Abb.14: selbst erstellt
- Abb.15: selbst erstellt
- Abb.16: selbst erstellt
- Abb.17: selbst erstellt
- Abb.18: selbst erstellt
- Abb.19: selbst erstellt
- Abb.20: selbst erstellt
- Abb.21: selbst erstellt
- Abb.22: selbst erstellt
- Abb.23: selbst erstellt
- Abb.24: selbst erstellt

- Abb.25: selbst erstellt
- Abb.26: selbst erstellt
- Abb.27: http://www.seisppmo80.com/funktionsweise/einfluss.htm
- Abb.28: selbst erstellt
- Abb.29: selbst erstellt
- Abb.30: selbst erstellt
- Abb.31: HPLC Chromatogramm, Wissenschaftszentrum Straubing
- Abb.32: http://www.welt.de/motor/article7937535/Benzin-von-der-Plantage.html
- Abb.33: HPLC Chromatogramm, Wissenschaftszentrum Straubing
- Abb.34: selbst erstellt

- Tab. 1: Kaltschmitt, M.; Energie aus Biomasse, S.116 [11]
- Tab. 2: selbst erstellt
- Tab. 3: selbst erstellt
- Tab. 4: selbst erstellt
- Tab. 5: selbst erstellt
- Tab. 6: TFZ – Ethanol aus Zuckerhirse, S.120 [16]

8. Anhang

Zu 3.2. Untersuchungen zur Optimierung des Fermentationsprozesses und zu 3.3. Überprüfung der Versuchsergebnisse

Stoffbilanz der alkoholischen Gärung:

$C_6H_{12}O_6 + 2\ P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP$

Stöchiometrische Berechnung von Ethanol:

$$\frac{46\ g}{44\ g} = \frac{m\ (Ethanol)}{m\ (CO_2)}$$

Auflösen nach m (Ethanol) : m (Ethanol) = $^{46}/_{44} * m(CO_2)$

$$\rho\ (Ethanol) = \frac{m\ (Ethanol)}{V\ (Ethanol)}$$

ρ (Ethanol) = 0,7868 g/ mL bei 24 °C [30]

Auflösen nach V (Ethanol) : V (Ethanol) = $\frac{^{46}/_{44} * \mathbf{m(CO_2)}}{\rho\ (Ethanol)} = \frac{^{46}/_{44} * \mathbf{m(CO_2)}}{0{,}7868\ g/\ mL}$

Zu 3.2.1. Bestimmung der optimalen Hefeart

Vollständige Messreihen (CO_2-Verlust in g):

[min]	Dr. Oetker Backhefe	Superstart Hefe	Kitzinger Weinhefe
0	0	0	0
30	0	0	0
60	0	0	0
90	0	0	0
120	0	0	0
150	0	0	0
180	0	0	0
210	0	0	0
240	0	0	0
270	0	0	0
300	0	0,018	0
330	0	0,061	0
360	0	0,147	0
390	0	0,283	0
420	0	0,439	0
450	0	0,615	0
480	0	0,817	0
510	0	1,047	0
540	0	1,302	0,039
570	0	1,581	0,16
600	0,065	1,892	0,293
630	0,278	2,221	0,438
660	0,516	2,566	0,594
690	0,775	2,932	0,764
720	1,051	3,317	0,945
750	1,34	3,708	1,138
780	1,645	4,072	1,346
810	1,968	4,372	1,563
840	2,292	4,577	1,79
870	2,598	4,689	2,024
900	2,85	4,742	2,269
930	3,054	4,768	2,521
960	3,228	4,783	2,778
990	3,373	4,792	3,04
1020	3,494	4,8	3,295
1050	3,588	4,807	3,543
1080	3,656	4,812	3,771
1110	3,708	4,816	3,96
1140	3,746	4,821	4,099
1170	3,777	4,825	4,196
1200	3,801	4,829	4,262
1230	3,82	4,832	4,308
1260	3,836	4,836	4,341
1290	3,849	4,839	4,366
1320	3,858	4,842	4,385
1350	3,867	4,846	4,399
1380	3,874	4,848	4,41
1410	3,879	4,851	4,418
1440	3,885	4,854	4,426
1470	3,89	4,857	4,433
1500	3,895	4,859	4,438
1530	3,899	4,861	4,442
1560	3,904	4,864	4,447
1590	3,908	4,867	4,452
1620	3,911	4,869	4,456
1650	3,915	4,871	4,46
1680	3,918	4,874	4,465
1710	3,921	4,876	4,467
1740	3,925	4,878	4,471
1770	3,927	4,88	4,474
1800	3,929	4,882	4,477
1830	3,932	4,883	4,48
1860	3,935	4,885	4,483
1890	3,937	4,887	4,486
1920	3,939	4,888	4,489
1950	3,941	4,889	4,492
1980	3,942	4,891	4,495
2010	3,945	4,892	4,497
2040	3,946	4,893	4,5
2070	3,948	4,895	4,502
2100	3,95	4,898	4,504
2130	3,953	4,898	4,507
2160	3,954	4,9	4,509
2190	3,955	4,901	4,511
2220	3,957	4,903	4,513
2250	3,959	4,904	4,515
2280	3,96	4,905	4,517
2310	3,962	4,907	4,519
2340	3,963	4,924	4,521
2370	3,964	4,909	4,522
2400	3,965	4,91	4,525
2430	3,967	4,912	4,526
2460	3,968	4,913	4,527
2490	3,969	4,914	4,529
2520	3,97	4,914	4,531
2550	3,971	4,915	4,532
2580	3,972	4,916	4,534
2610	3,973	4,918	4,535
2640	3,975	4,919	4,537
2670	3,975	4,92	4,539
2700	3,976	4,921	4,539
2730	3,977	4,922	4,541
2760	3,978	4,924	4,543
2790	3,979	4,925	4,543
2820	3,981	4,926	4,545
2850	3,982	4,927	4,546
2880	3,984	4,928	4,548

Zu 3.2.2. Bestimmung der optimalen Hefeanfangskonzentration

Vollständige Messreihen (CO_2-Verlust in g):

[min]	0,4 g	0,2 g	0,1 g
0	0	0	0
30	0	0	0
60	0	0	0
90	0	0	0
120	0	0	0
150	0	0	0
180	0	0	0
210	0	0	0
240	0,015	0	0
270	0,089	0	0
300	0,193	0,018	0
330	0,316	0,061	0
360	0,46	0,147	0
390	0,625	0,283	0
420	0,812	0,439	0
450	1,023	0,615	0
480	1,309	0,817	0,016
510	1,571	1,047	0,125
540	1,861	1,302	0,226
570	2,175	1,581	0,352
600	2,502	1,892	0,497
630	2,841	2,221	0,658
660	3,198	2,566	0,835
690	3,568	2,932	1,032
720	3,932	3,317	1,247
750	4,254	3,708	1,486
780	4,496	4,072	1,746
810	4,641	4,372	2,020
840	4,713	4,577	2,315
870	4,714	4,689	2,628
900	4,731	4,742	2,960
930	4,741	4,768	3,299
960	4,749	4,783	3,633
990	4,755	4,792	3,936
1020	4,761	4,8	4,186
1050	4,766	4,807	4,368
1080	4,77	4,812	4,481
1110	4,775	4,816	4,544
1140	4,779	4,821	4,576
1170	4,782	4,825	4,593
1200	4,785	4,829	4,604
1230	4,789	4,832	4,611
1260	4,792	4,836	4,617
1290	4,796	4,839	4,623
1320	4,798	4,842	4,628
1350	4,82	4,846	4,632
1380	4,803	4,848	4,636
1410	4,805	4,851	4,640
1440	4,808	4,854	4,644
1470	4,814	4,857	4,648
1500	4,817	4,859	4,651
1530	4,82	4,861	4,653
1560	4,822	4,864	4,656
1590	4,824	4,867	4,659
1620	4,825	4,869	4,662
1650	4,827	4,871	4,665
1680	4,829	4,874	4,668
1710	4,831	4,876	4,669
1740	4,833	4,878	4,671
1770	4,835	4,88	4,674
1800	4,836	4,882	4,675
1830	4,838	4,883	4,678
1860	4,839	4,885	4,680
1890	4,841	4,887	4,681
1920	4,843	4,888	4,683
1950	4,844	4,889	4,685
1980	4,845	4,891	4,686
2010	4,846	4,892	4,688
2040	4,848	4,893	4,689
2070	4,849	4,895	4,690
2100	4,851	4,898	4,692
2130	4,852	4,898	4,693
2160	4,853	4,9	4,695
2190	4,855	4,901	4,697
2220	4,856	4,903	4,698
2250	4,857	4,904	4,699
2280	4,858	4,905	4,700
2310	4,859	4,907	4,701
2340	4,86	4,924	4,702
2370	4,862	4,909	4,703
2400	4,862	4,91	4,704
2430	4,864	4,912	4,706
2460	4,864	4,913	4,707
2490	4,866	4,914	4,708
2520	4,867	4,914	4,709
2550	4,867	4,915	4,710
2580	4,868	4,916	4,711
2610	4,869	4,918	4,712
2640	4,871	4,919	4,713
2670	4,872	4,92	4,713
2700	4,873	4,921	4,715
2730	4,874	4,922	4,716
2760	4,876	4,924	4,717
2790	4,877	4,925	4,718
2820	4,878	4,926	4,718
2850	4,879	4,927	4,719
2880	4,88	4,928	4,722

Zu 3.2.3. Bestimmung der optimalen Gärtemperatur

Vollständige Messreihen (CO_2-Verlust in g):

[min]	35 °C	24 °C	14 °C
0	0	0	0
30	0	0	0
60	0	0	0
90	0	0	0
120	0	0	0
150	0,029	0	0
180	0,163	0	0
210	0,328	0	0
240	0,524	0	0
270	0,754	0	0
300	1,022	0,018	0
330	1,326	0,061	0
360	1,646	0,147	0
390	1,991	0,283	0
420	2,344	0,439	0
450	2,692	0,615	0
480	3,033	0,817	0
510	3,362	1,047	0
540	3,671	1,302	0
570	3,961	1,581	0
600	4,223	1,892	0
630	4,454	2,221	0
660	4,639	2,566	0
690	4,768	2,932	0
720	4,838	3,317	0
750	4,872	3,708	0
780	4,892	4,072	0
810	4,906	4,372	0
840	4,914	4,577	0
870	4,922	4,689	0
900	4,926	4,742	0
930	4,935	4,768	0
960	4,944	4,783	0
990	4,952	4,792	0
1020	4,958	4,8	0
1050	4,964	4,807	0
1080	4,97	4,812	0
1110	4,975	4,816	0
1140	4,979	4,821	0
1170	4,984	4,825	0
1200	4,991	4,829	0
1230	4,996	4,832	0
1260	5,001	4,836	0
1290	5,005	4,839	0
1320	5,009	4,842	0
1350	5,011	4,846	0,016
1380	5,016	4,848	0,035
1410	5,021	4,851	0,062
1440	5,026	4,854	0,086
1440	5,026	4,854	0,086
1470	5,031	4,857	0,108
1500	5,033	4,859	0,138
1530	5,036	4,861	0,165
1560	5,038	4,864	0,192
1590	5,043	4,867	0,225
1620	5,047	4,869	0,253
1650	5,051	4,871	0,284
1680	5,054	4,874	0,321
1710	5,057	4,876	0,35
1740	5,056	4,878	0,388
1770	5,059	4,88	0,426
1800	5,062	4,882	0,457
1830	5,066	4,883	0,499
1860	5,07	4,885	0,54
1890	5,072	4,887	0,576
1920	5,075	4,888	0,62
1950	5,077	4,889	0,664
1980	5,077	4,891	0,704
2010	5,08	4,892	0,751
2040	5,083	4,893	0,798
2070	5,087	4,895	0,839
2100	5,09	4,898	0,89
2130	5,092	4,898	0,938
2160	5,092	4,9	0,985
2190	5,095	4,901	1,04
2220	5,098	4,903	1,086
2250	5,098	4,904	1,139
2280	5,102	4,905	1,195
2310	5,105	4,907	1,243
2340	5,108	4,924	1,3
2370	5,11	4,909	1,356
2400	5,113	4,91	1,41
2430	5,117	4,912	1,47
2460	5,12	4,913	1,531
2490	5,123	4,914	1,587
2520	5,125	4,914	1,653
2550	5,127	4,915	1,714
2580	5,129	4,916	1,776
2610	5,131	4,918	1,844
2640	5,133	4,919	1,906
2670	5,134	4,92	1,974
2700	5,136	4,921	2,045
2730	5,139	4,922	2,107
2760	5,141	4,924	2,181
2790	5,14	4,925	2,255
2820	5,146	4,926	2,324
2850	5,151	4,927	2,399
2880	5,154	4,928	2,473

2910			2,548
2940			2,627
2970			2,7
3000			2,779
3030			2,859
3060			2,934
3090			3,017
3120			3,098
3150			3,175
3180			3,259
3210			3,34
3240			3,418
3270			3,502
3300			3,58
3330			3,659
3360			3,741
3390			3,812
3420			3,89
3450			3,964
3480			4,027
3510			4,095
3540			4,154
3570			4,206
3600			4,259
3630			4,298
3660			4,338
3690			4,374
3720			4,398
3750			4,425
3780			4,447
3810			4,463
3840			4,482
3870			4,492
3900			4,506
3930			4,518
3960			4,522
3990			4,533
4020			4,539
4050			4,544
4080			4,554
4110			4,552
4140			4,559
4170			4,565
4200			4,565
4230			4,571
4260			4,574
4290			4,576
4320			4,582
4350			4,58
4380			4,584
4410			4,59
4440			4,586
4470			4,591
4500			4,595

4530			4,593
4590			4,598
4620			4,601
4650			4,606
4680			4,6
4710			4,606
4740			4,611
4770			4,606
4800			4,612
4830			4,614
4860			4,613
4890			4,618
4920			4,613
4950			4,618
4980			4,622
5010			4,62
5040			4,624
5070			4,624
5100			4,624
5130			4,63
5160			4,624
5190			4,629
5220			4,632
5250			4,628
5280			4,633
5310			4,633
5340			4,632
5370			4,637
5400			4,631
5430			4,636
5460			4,639
5490			4,635
5520			4,639
5550			4,639
5580			4,64
5610			4,644
5640			4,638
5670			4,643
5700			4,645
5730			4,643
5760			4,648

Zu 3.2.4. Verwendung von Nährsalzen

Vollständige Messreihen (CO_2-Verlust in g):

[min]	AYF 1000	ohne Nährsalz	EnerTrace KS
0	0	0	0
30	0	0	0
60	0	0	0
90	0	0	0
120	0	0	0
150	0	0	0
180	0	0	0
210	0	0	0
240	0	0	0
270	0	0	0
300	0	0,018	0
330	0,047	0,061	0,015
360	0,173	0,147	0,052
390	0,313	0,283	0,109
420	0,468	0,439	0,165
450	0,634	0,615	0,267
480	0,832	0,817	0,389
510	1,06	1,047	0,529
540	1,325	1,302	0,685
570	1,611	1,581	0,856
600	1,916	1,892	1,041
630	2,242	2,221	1,242
660	2,578	2,566	1,462
690	2,931	2,932	1,702
720	3,301	3,317	1,959
750	3,684	3,708	2,236
780	4,05	4,072	2,531
810	4,347	4,372	2,842
840	4,537	4,577	3,167
870	4,628	4,689	3,505
900	4,662	4,742	3,829
930	4,68	4,768	4,127
960	4,697	4,783	4,365
990	4,702	4,792	4,523
1020	4,709	4,8	4,612
1050	4,715	4,807	4,656
1080	4,721	4,812	4,680
1110	4,726	4,816	4,694
1140	4,729	4,821	4,703
1170	4,734	4,825	4,714
1200	4,739	4,829	4,717
1230	4,744	4,832	4,721
1260	4,747	4,836	4,726
1290	4,751	4,839	4,731
1320	4,756	4,842	4,734
1350	4,759	4,846	4,737
1380	4,762	4,848	4,742
1410	4,765	4,851	4,746
1440	4,768	4,854	4,750
1470	4,771	4,857	4,753
1500	4,772	4,859	4,756
1530	4,776	4,861	4,759
1560	4,778	4,864	4,762
1590	4,779	4,867	4,765
1620	4,782	4,869	4,769
1650	4,785	4,871	4,771
1680	4,787	4,874	4,773
1710	4,79	4,876	4,776
1740	4,793	4,878	4,779
1770	4,797	4,88	4,780
1800	4,798	4,882	4,783
1830	4,801	4,883	4,785
1860	4,803	4,885	4,786
1890	4,806	4,887	4,788
1920	4,807	4,888	4,790
1950	4,81	4,889	4,791
1980	4,815	4,891	4,794
2010	4,817	4,892	4,795
2040	4,819	4,893	4,797
2070	4,819	4,895	4,800
2100	4,82	4,898	4,802
2130	4,822	4,898	4,803
2160	4,824	4,9	4,805
2190	4,826	4,901	4,807
2220	4,827	4,903	4,809
2250	4,829	4,904	4,811
2280	4,831	4,905	4,812
2310	4,835	4,907	4,815
2340	4,835	4,924	4,816
2370	4,835	4,909	4,818
2400	4,837	4,91	4,821
2430	4,837	4,912	4,823
2460	4,84	4,913	4,824
2490	4,843	4,914	4,826
2520	4,846	4,914	4,828
2550	4,846	4,915	4,830
2580	4,848	4,916	4,832
2610	4,851	4,918	4,834
2640	4,852	4,919	4,836
2670	4,853	4,92	4,837
2700	4,855	4,921	4,840
2730	4,855	4,922	4,842
2760	4,857	4,924	4,844
2790	4,858	4,925	4,846
2820	4,86	4,926	4,848
2850	4,862	4,927	4,850
2880	4,864	4,928	4,852

Zu 3.3. Überprüfung der Versuchsergebnisse

<u>HPLC Auswertung:</u>

Saccharose: 2,048 g

Fructose: 4,008 g

Glucose: 4,961 g

→ 0,68 m^3 Ethanol pro t Saccharose → 0,68 cm^3/ g

→ 0,65 m^3 Ethanol pro t Glucose oder Fructose → 0,65 cm^3/ g

Theoretische Ethanolausbeute:

Saccharose: 0,68 cm^3/g * 2,048 g = 1,39264 mL

Fructose: 0,65 cm^3/g * 4,008 g = 2,6052 mL

Glucose: 0,65 cm^3/g * 4,961 g = 3,22465 mL

Gesamte theoretische Ethanolausbeute :

1,39264 mL+ 2,6052 mL+ 3,22465 mL = 7,22249 mL

Tatsächliche Ethanolausbeute (über HPLC ermittelt):

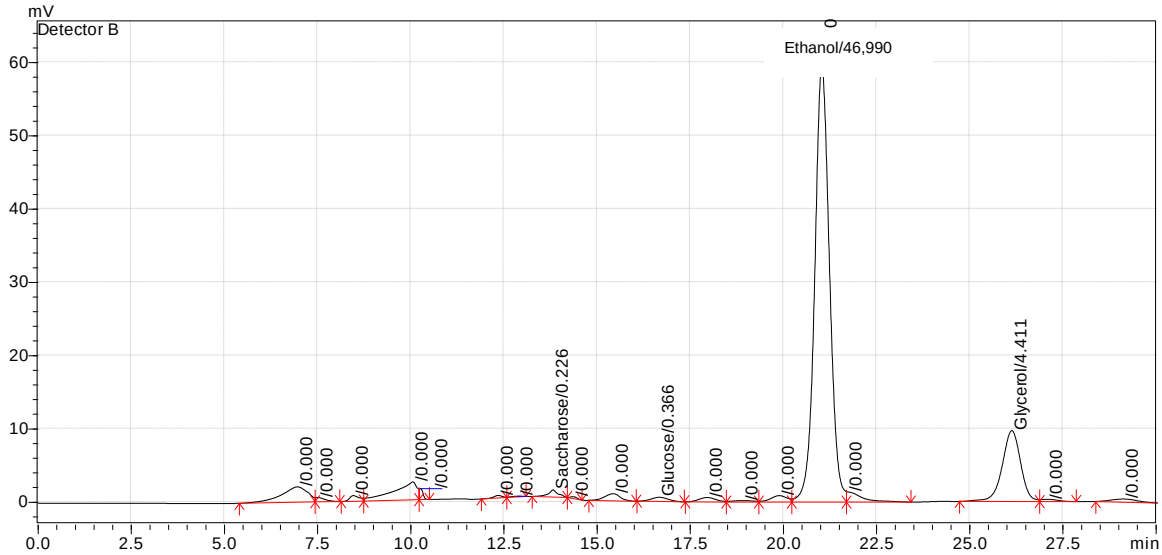

Abb. 33: HPLC-Chromatogramm des vergorenen Zuckerhirsesaftes

46,99 g/L (Probe wurde aus verdünnten Versuchsansatz (110 mL) entnommen)

→ Absoluter Ethanolgehalt bezogen auf 100 mL:

46,99 g/L * 0,11 = 5,1689 g Ethanol

$$\rho\,(\text{Ethanol}) = \frac{m\,(\text{Ethanol})}{V\,(\text{Ethanol})}$$

ρ (Ethanol) = 0,7868 g/ mL bei 24 °C [30]

$$V\,(\text{Ethanol}) = \frac{m\,(\text{Ethanol})}{\rho\,(\text{Ethanol})} = \frac{5{,}1689\ \text{g}}{0{,}7868\ \text{g/mL}} = 6{,}569522\ \text{mL}$$

Restzuckergehalt: (Probe wurde aus verdünnten Versuchsansatz (110 mL) entnommen)

→ Absolute Restzuckergehalte bezogen auf 100 mL:

Saccharose : 0,23 g/L * 0,11 = 0,0253 g/ 100mL

Glucose: 0,37 g/L * 0,11 = 0,0407 g/ 100mL

Fructose: 0 g/L

Gesamter Restzucker: 0,066 g in 100mL

→ Daraus könnte noch so viel Ethanol gewonnen werden:

0,0253 g * 0,68 cm^3/ g + 0,0407 g * 0,65 cm^3/g = 0,017204 mL + 0,026455 mL

= 0,043659 mL ≈ 0,044 mL Ethanol

$$\frac{\text{Praxisausbeute Ethanol HPLC}}{\text{Theoretische Ethanolausbeute}} = \frac{6{,}569522\ \text{mL}}{7{,}22249\ \text{mL}} = 0{,}90959\ldots \approx \mathbf{91\ \%}$$

$$\frac{\text{mögl. Ethanol aus Restzucker}}{\text{Theoretische Ethanolausbeute}} = \frac{0{,}043659\ \text{mL}}{7{,}22249\ \text{mL}} = 0{,}0060448\ldots \approx \mathbf{0{,}6\ \%}$$

Differenz zu 100 % (Aufbau von Zellsubstanzen der Hefe und Nebenprodukte):

100 % - 91 % - 0,6 % = **8,4 %**

Zu 4. Reflexion

Berechnung des gelösten CO_2 in der Sperrflüssigkeit:

Dichte von Wasser bei 24°C : ρ (H_2O) = 997, 29 kg / m^3 = 0,99729 g / mL [31]

Löslichkeit von CO_2 in Wasser (20 °C, 1030 hPa) = 1,7 g / L [32]

Umrechnung der Masse von Wasser in Volumen:

$\rho = m / V$ → Auflösen nach V

$$V(H_2O) = \frac{m(H_2O)}{\rho(H_2O)} = \frac{2,23\ g}{0,99729\ g/L} = 2,236059\ mL = 0,002236\ L$$

Löslichkeit von CO_2 in Wasser:

$L = m / V$ → Auflösen nach m (CO_2)

$m(CO_2) = V(H_2O) * L(CO_2) = 0,002236\ L * 1,7\ g/L = 0,0038012\ g \approx 0,004\ g$

Bild zu Vorversuch:

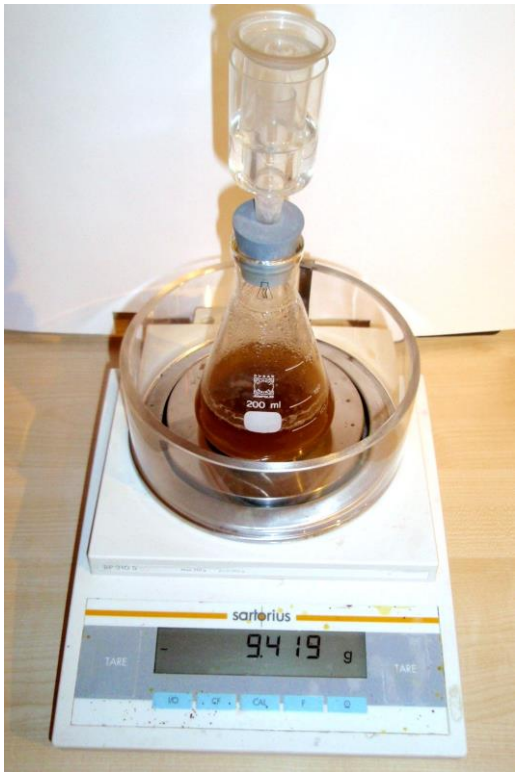

Abb. 34: Vorversuch zu Messreihen mit Zuckerhirsesaft (19 %Brix) aus anderer Charge;

Durchführung bei Raumtemperatur (24°C) mit 0,2 g/100mL Superstart Hefe

CO_2-Produktion nach 48 h: 9,419 g

9. Erklärung zur Anfertigung der Seminararbeit

Ich erkläre hiermit, dass ich die Seminararbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe.

Bogen, den 09.11.2010 _____

Unterschrift der Schülerin