



**AiF-Forschungsvorhaben Nr. 14649 BR**

Laufzeit: 01.05.2006 - 31.10.2008

gefördert aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



**Entwicklung eines Verfahrens zur Energieeinsparung  
und zur Verbesserung der Festigkeit von Holzstoff in  
der Papier- und Dämmplattenindustrie durch Einsatz  
hydrolytischer Enzyme**

**Januar 2009**

Technische Universität Dresden  
Professur für Holz- und  
Faserwerkstofftechnik

Prof. Dr.-Ing. André Wagenführ

Technische Universität Dresden  
Professur für Papiertechnik

Prof. Dr. Ing. Harald Großmann

Sächsisches Institut für Angewandte  
Biotechnologie e. V. - SIAB

Prof. Dr. Christian Wilhelm



Technische Universität Dresden,  
Institut für Holz und Papiertechnik  
Professur für Holz- u. Faserwerkstofftechnik  
01062 Dresden

Technische Universität Dresden,  
Institut für Holz und Papiertechnik  
Professur für Papiertechnik  
01062 Dresden

SIAB e.V. – Sächsisches Institut für Angewandte  
Biotechnologie e.V.  
Permoserstr. 15  
04318 Leipzig

Name der Forschungsstelle

14649BR/ 2

IGF-Vorhaben-Nr./GAG

01.05.2006 bis 31.10.2008

Bewilligungszeitraum

## Schlussbericht für den Zeitraum: 01.05.2006 bis 31.10.2008

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

### Forschungsthema :

Entwicklung eines Verfahrens zur Energieeinsparung und zur Verbesserung der Festigkeit von Holzstoff in der Papier- und Dämmplattenindustrie durch Einsatz hydrolytischer Enzyme

Dresden, 20.01.2009

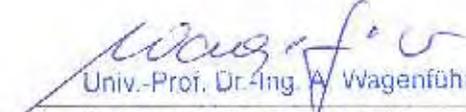
Ort, Datum

Dresden, 20.01.2009

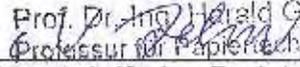
Ort, Datum

Leipzig, 20.01.2009

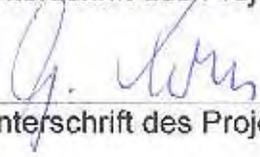
Ort, Datum

  
Univ.-Prof. Dr.-Ing. A. Wagenführ

Unterschrift des Projektleiters

  
Prof. Dr.-Ing. Harald Großmann  
Professur für Papiertechnik

Unterschrift des Projektleiters

  
Unterschrift des Projektleiters



## Zusammenfassung

Das Ziel des Projektes bestand in der Verbesserung der Herstellungsprozesse sowie der Qualität von Papieren und Dämmplatten aus Holzstoffen durch den Einsatz biotechnologischer Verfahren. Aufbauend auf vorhandenen Ergebnissen zur Enzymapplikation wurden Cellulase-/Xylanase Enzymsysteme weiterentwickelt und anwendungsbezogen charakterisiert. Die Enzymsysteme wurden zur Modifikation von Holzstoffen, insbesondere TMP, SGW, PGW und PGW-Grobstoff eingesetzt. Hierbei wurde die Korrelation der Inkubationsbedingungen sowie der Art und Zusammensetzung der Enzymsysteme mit den Prozess- und Produkteigenschaften untersucht. Die Arbeiten mündeten in einen Pilotversuch zur Dämmplattenherstellung und einen Produktionsversuch zur Papierherstellung bei Industriepartnern. Folgende wesentliche Ergebnisse wurden erzielt:

- Im Bereich der Enzymgewinnung konnte mittels Optimierung der Prozessführung eine Steigerung der Produktivität des eingesetzten Stammes *Trichoderma reesei*-M18.2 erreicht werden. Durch Variation des Nährmediums lässt sich die Zusammensetzung der Enzymkomplexe applikationsbezogen verändern. Die Enzymfermentation auf Basis von Schlempe bietet Möglichkeiten zur Reduzierung der Enzymkosten.
- Der Einsatz von Cellulase-/Xylansesystemen mit einer Dosierung von 1 % über 10 min führte bei TMP (ohne Nachmahlung) zu einer Erhöhung des Tensile-Index um ca. 10 %.
- Sowohl eine hohe Dosierung und niedrige Inkubationszeit oder eine geringe Dosierung und lange Inkubationszeit bewirken eine Verringerung des Entwässerungswiderstandes von Holzstoffen. Bei einer Dosierung von 1 % wird bei TMP nach einer Behandlungszeit von 10 min eine Verringerung um ca. 10 % und bei 30 min um ca. 18 % erreicht. Bei Holzschliff werden nach 30 min Behandlungszeit ca. 7 %-ige Verringerung erreicht.
- Durch die Mahlung werden die Festigkeitseigenschaften der Holzstoffe stärker verändert, als durch die Enzymbehandlung.
- Bei der TMP-Herstellung konnte durch eine Enzymbehandlung mit dem Cellulase-/Xylanase- System SIAB II mit einer Enzymdosierung von 1 % und einer Behandlungszeit von 30 min zwischen der 1. und 2. Mahlstufe ein 20 % niedrigerer Mahlaufwand bei gleichen bis besseren Festigkeitseigenschaften erzielt werden.
- Bei der Nachmahlung von PGW-Grobstoffen können durch eine Enzymbehandlung (0,5 %) im Labormaßstab Erhöhungen der statischen Festigkeiten von bis zu 25 % erreicht werden (Einsparung einer Mahlstufe).
- Bei einem Produktionsversuch konnte durch den Enzymeinsatz bei PGW-Grobstoff der Energieaufwand in der Schleiferei der Papierfabrik um ca. 11 % gesenkt werden.
- Cellulase/Xylanase-Systeme führen bei Holzfaserdämmplatten, hergestellt nach dem Nassverfahren, zu deutlichen Verbesserungen der Biegefestigkeit (bis 32%). Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und traditionellen Additiven führte zu einer Verbesserung der Biegefestigkeit um ca. 50 %.
- Die massebezogene Wasseraufnahme verringert sich durch Enzymeinsatz um ca. 41 %. Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und Additiven führt zu einer Verringerung 77 %. Die flächenbezogene Wasseraufnahme sinkt hier um 95 % auf unter 1 kg/m<sup>2</sup>.
- Im Hinblick auf eine Kreislaufnutzung der Enzyme wurde nachgewiesen, dass insbesondere bei der Dämmplattenherstellung unter Einsatz einer thermostabilen Xylanase bis zu 80 % der Enzymaktivitäten erhalten bleiben.
- Die organische Belastung der Prozesswässer wird durch Enzyme nur leicht erhöht.

Die erfolgreiche Realisierung der Forschungsarbeiten ermöglicht es, kleinen und mittelständischen Unternehmen der Papier- und Holzwerkstoffindustrie die Eigenschaften ihrer Produkte zu verbessern bzw. den spezifischen Energiebedarf für energieintensive Prozesse der Holzschliff- bzw. TMP-Erzeugung zu senken.

**Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.**



## Inhaltsverzeichnis

|          | Seite   |
|----------|---|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> <span style="float: right;"><b>1</b></span>   |
| <b>2</b> | <b>Enzymeinsatz in der Papier- und Holzwerkstoffindustrie</b> <span style="float: right;"><b>2</b></span>                                       |
| 2.1      | Enzymatische Entfernung von Störstoffen mit Lipasen <span style="float: right;">2</span>  |
| 2.2      | Enzymatische Hackschnitzelbehandlung <span style="float: right;">3</span>   |
| 2.3      | Enzymatische Holzstoffbehandlung <span style="float: right;">5</span>   |
| 2.4      | Enzymatische Aktivierung von TMP zur Herstellung von<br>Holzfaserwerkstoffen im Trocken- und Nassverfahren <span style="float: right;">6</span> |
| 2.4.1    | Einsatz phenoloxidierender Enzyme <span style="float: right;">6</span>  |
| 2.4.2    | Einsatz hydrolytischer Enzymsysteme <span style="float: right;">6</span>  |
| 2.5      | Enzymgewinnung und -applikation <span style="float: right;">7</span>  |
| <b>3</b> | <b>Forschungsziele und Lösungsweg</b> <span style="float: right;"><b>9</b></span>   |
| 3.1      | Forschungsziel <span style="float: right;">9</span>   |
| 3.2      | Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels <span style="float: right;">9</span>  |
| <b>4</b> | <b>Entwicklung und Herstellung geeigneter Enzymsysteme</b> <span style="float: right;"><b>10</b></span>   |
| 4.1      | Enzymgewinnung <span style="float: right;">10</span>  |
| 4.2      | Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und<br>Gesamtprotein <span style="float: right;">14</span>   |
| 4.2.1    | Proteinbestimmung nach Lowry <span style="float: right;">14</span>  |
| 4.2.2    | Bestimmung der Xylanaseaktivität nach Ghose <span style="float: right;">15</span>   |
| 4.2.3    | Bestimmung der Cellulaseaktivität mittels Filterpapier <span style="float: right;">16</span>  |
| 4.2.4    | Bestimmung der Aktivität der endo- $\beta$ -1,4-Glucanase mittels Azo-<br>CMC <span style="float: right;">17</span>                             |
| 4.3      | Enzymaktivitäten und Gesamtprotein der verwendeten<br>Enzymsysteme <span style="float: right;">18</span>  |
| 4.3.1    | Untersuchungen zur Temperaturstabilität und der pH-Toleranz<br>ausgewählter Enzyme <span style="float: right;">20</span>                        |
| 4.3.2    | Untersuchungen zur Adsorption der Enzyme am Substrat <span style="float: right;">21</span>  |
| <b>5</b> | <b>Holzstoffherzeugung für die Papierherstellung unter Einsatz<br/>von Enzymen</b> <span style="float: right;"><b>23</b></span>                 |
| 5.1      | Holzstoffaufschlussverfahren im Überblick <span style="float: right;">23</span>   |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.2      | Material und Methoden und Versuchsvarianten für die Papierherstellung                              | 29        |
| 5.2.1    | Auswahl der Holzstoffe   | 29        |
| 5.2.2    | Auswahl der Enzyme   | 30        |
| 5.2.3    | Laboruntersuchungen zur Bestimmung optimaler Enzymzugabemengen und Variation der Inkubationszeiten | 30        |
| 5.2.4    | Enzymbehandlung von TUD-TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe in einer Labor-CTMP Anlage            | 33        |
| 5.2.5    | Enzymatische Behandlung von PGW-Grobstoff vor einer Nachmahlung im Laborscheibenrefiner            | 36        |
| 5.2.6    | Großversuch bei der Mochenwangen Papier GmbH   | 38        |
| 5.3      | Forschungsergebnisse des Enzymeinsatzes bei der Papierherstellung                                  | 40        |
| 5.3.1    | Optimale Enzymdosierungen und Inkubationszeiten  | 41        |
| 5.3.2    | Ergebnisse der Laboruntersuchungen unter Einsatz von SIAB-Enzymen                                  | 46        |
| 5.3.3    | Enzymbehandlung von TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe   | 52        |
| 5.3.4    | Enzymbehandlung von PGW-Grobstoff mit Nachmahlung  | 53        |
| 5.3.5    | Großversuch bei der Mochenwangen Papier GmbH   | 61        |
| <b>6</b> | <b>Dämmplattenherstellung unter Einsatz von Enzymen</b>  | <b>71</b> |
| 6.1      | Material, Methoden und Versuchsdurchführung zur Dämmplattenherstellung                             | 71        |
| 6.1.1    | Charakterisierung der verwendeten Faserstoffe  | 71        |
| 6.1.1.1  | Bestimmung des Cellulosegehaltes   | 72        |
| 6.1.1.2  | Bestimmung des Ligningehaltes  | 72        |
| 6.1.1.3  | Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes  | 73        |
| 6.1.1.4  | Bestimmung des Kaltwasserextraktes   | 73        |
| 6.1.1.5  | Bestimmung des pH-Wertes des Faserstoffes  | 73        |
| 6.1.1.6  | Aufnahme der Siebkennlinie   | 73        |
| 6.1.1.7  | Bestimmung der Zugfestigkeit von Laborblättern   | 74        |
| 6.1.2    | Versuchsdurchführung zur Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung                           | 74        |
| 6.1.2.1  | Inkubation des Faserstoffes unter Einsatz von Frischwasser   | 74        |
| 6.1.2.2  | Inkubation von Faserstoff unter Einsatz von Prozesswasser  | 75        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 6.1.2.3  | Untersuchung des Einflusses von Prozesswasser auf die Enzymaktivitäten                                     | 75         |
| 6.1.2.4  | Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung im Labormaßstab  | 76         |
| 6.1.2.5  | Upscaling von Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung bei Firma Gutex                              | 77         |
| 6.1.2.6  | Analyse der Enzym-Restaktivitäten bei der Dämmplattenherstellung im Upscalingversuch                       | 79         |
| 6.1.2.7  | Bestimmung des chemischen und biologischen Sauerstoffbedarf des Abwassers (CSB & BSB5)                     | 79         |
| 6.1.2.8  | Untersuchung des Einflusses der Enzymdosierung und der Additive auf die Eigenschaften von Dämmplatten      | 80         |
| 6.2      | Ergebnisse der Dämmplattenherstellung unter Einsatz von Enzymen  | 81         |
| 6.2.1    | Eigenschaften der verwendeten Faserstoffe  | 81         |
| 6.2.2    | Einfluss von Enzymart und -dosierung auf die Eigenschaften von Laborblätter aus Fichten-TMP-Faserstoff     | 82         |
| 6.2.3    | Einfluss des Prozesswassers auf die Enzymaktivitäten   | 85         |
| 6.2.4    | Einfluss des Prozesswassers auf die Eigenschaften von Laborblättern  | 85         |
| 6.2.5    | Eigenschaften von Dämmplatten hergestellt im Labormaßstab  | 87         |
| 6.2.6    | Ergebnisse der Upscalingversuche bei der Fa. Gutex   | 90         |
| 6.2.7    | Restaktivitäten bei der Dämmplattenherstellung im Upscalingversuch   | 93         |
| 6.2.8    | Einfluss von Enzymdosierung und Additiven auf die Eigenschaften von Dämmplatten aus Fichten-TMP-Faserstoff | 94         |
| 6.2.9    | Einfluss der Enzyme und Additive auf CSB und BSB5 im Prozesswasser   | 96         |
| <b>7</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>99</b>  |
| 7.1      | Zusammenfassung zur Enzymgewinnung   | 99         |
| 7.2      | Zusammenfassung zur Papierherstellung  | 101        |
| 7.3      | Zusammenfassung zur Dämmplattenherstellung   | 102        |
| <b>8</b> | <b>Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse</b>  | <b>102</b> |
| 8.1      | Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse   | 102        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 8.2      | Industrielle Umsetzung der angestrebten Forschungsergebnisse | 104        |
| <b>9</b> | <b>Literatur- und Normenverzeichnis</b>                      | <b>105</b> |
| 9.1      | Literaturverzeichnis   | 105        |
| 9.2      | Normenverzeichnis  | 108        |

## 1 Einleitung

Holzstoffe, d. h. mechanisch erzeugte ligninhaltige Faserstoffe werden sowohl in der Papierindustrie in Form von TMP, CTMP SGW und PGW zur Produktion Buchdruck-, Zeitungs- und Magazinpapier sowie für Kartonage und Verpackungen verarbeitet als auch in der Holzwerkstoffindustrie zur Herstellung von Faserwerkstoffen, wie HDF, MDF oder Faserdämmplatten für die Möbel- und Bauindustrie eingesetzt.

Die Produktionsmenge an Holzstoffen für den Papierbereich lag im Jahr 2007 bei ca. 1,636 Mio. t in Deutschland (N.N. 2008).

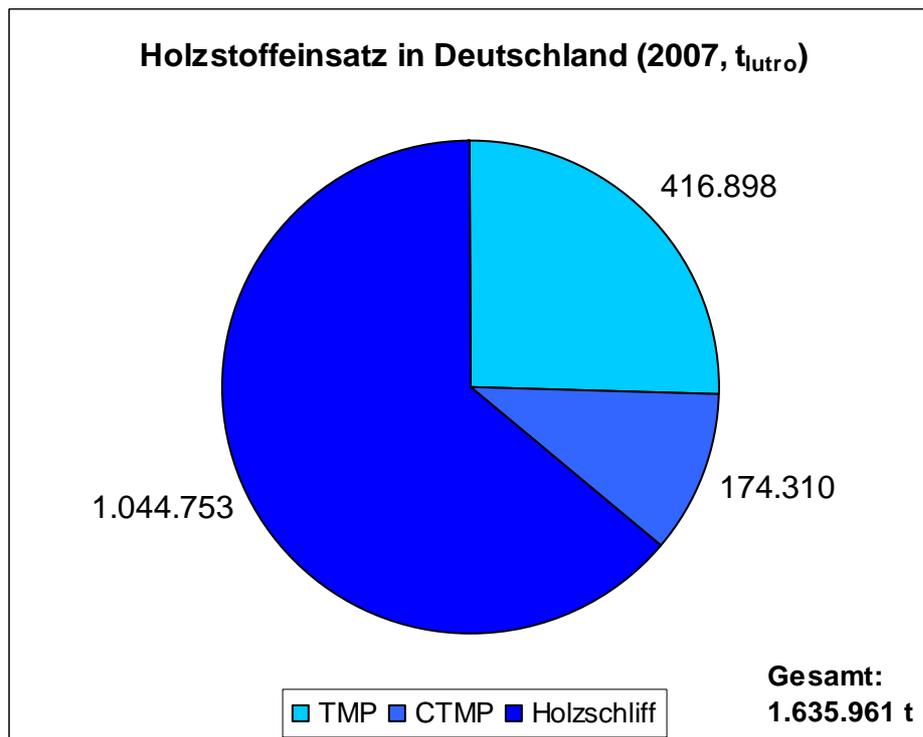


Abb. 1-1: Holzstoffeinsatz 2007 (N.N. 2008)

Holzstoffe werden mechanisch durch Mahlen oder Schleifen des Holzes erzeugt. Aufgrund der in den letzten Jahren stark gestiegenen Energie- und Rohstoffkosten ergab sich zu Projektbeginn ein hoher Forschungsbedarf zur Verringerung des Mahl- und Prozessenergieverbrauchs bei gleichbleibenden oder verbesserten Papiereigenschaften.

Ähnliche Probleme ergaben sich für die Holzwerkstoffindustrie. Hier werden Faserstoffe aus der ersten und zweiten Zerkleinerungsstufe verarbeitet. Man unterscheidet das Nass- und Trockenverfahren. Insbesondere im Nassverfahren werden die Werkstoffe ähnlich wie bei der Papierherstellung durch Entwässerung einer Fasersuspension und anschließender Trocknung erzeugt. Es werden Werkstoffe mit einer Dichte im Bereich von 150 bis 300 kg/m<sup>3</sup> und einer Dicke im Bereich von 5 bis 30 mm hergestellt. Diese Werkstoffe werden vielfältig für die Wärme- und Schallschließung von Gebäuden und Innenräume eingesetzt. Die Einsatzmenge von Dämmstoffen in Deutschland lag im Jahre 2007 bei ca. 24 Mio. m<sup>3</sup>. Der Anteil an Naturfaserdämmstoffen lag bei ca. 1 Mio. m<sup>3</sup> (GDI 2007). Forschungsbedarf besteht hier vor allem bei

der Verbesserung der hydrophoben und mechanischen Eigenschaften und einer Verringerung des Prozessenergiebedarfs.

Das Ziel des Forschungsvorhabens bestand in der Untersuchung von Potenzialen zum Einsatz von Enzymen zur gezielten Verbesserung von Prozessbedingungen und Produkteigenschaften bei der Holzstofferzeugung und -verarbeitung. Mit Hilfe von Enzymen lassen sich Stoffwandlungsprozesse unter Normalbedingungen umweltfreundlich substratspezifisch katalysieren. Insbesondere Cellulasen, Hemizellulasen und ligninoxidierende Enzyme sind für eine Modifikation von Holzstoffen geeignet. In der Textil- und Lebensmittel und Futtermittelindustrie finden diese Enzymsysteme bereits breite Anwendung. In der Papier- und Holzwerkstoffindustrie werden die Anwendungspotenziale jedoch bisher kaum genutzt.

## **2 Enzymeinsatz in der Papier- und Holzwerkstoffindustrie**

In der Zellstoff- und Papierindustrie werden überwiegend mechanische und chemische Verfahren angewendet. Außer in der Abwasserreinigung spielen biotechnologische Verfahren nur eine untergeordnete Rolle. In den letzten Jahren sind jedoch beträchtliche Fortschritte in der Enzymologie des Cellulose-, Hemicellulosen- und Ligninabbaus erzielt worden. Folgende biotechnologische Entwicklungen in der Zellstoff- und Papierindustrie werden derzeit mit besonderem Nachdruck vorangetrieben:

- Enzymatisch Entfernung von Störstoffen bei der Papiererzeugung
- Enzymunterstützte Bleiche von Zellstoffen (Biobleaching)
- Verbesserung der Altpapiereigenschaften (Deinken, Entwässerung)
- Einsparung von Prozessenergie bei der Holzstoffherstellung (Biopulping)
- Enzymatische Grobstoffbehandlung bei TMP und Holzschliff
- Verbesserung der Entwässerbarkeit von Holzstoffen
- Enzymatische Abwasserbehandlung

Zur Verbesserung der Eigenschaften von Dämmplatten wurde bisher der Einsatz von phenoloxydierenden Enzymen (Laccase) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Einsatz dieser Enzyme positive Wirkungen auf die Platteneigenschaften hat. Allerdings waren hier die Inkubationsdauer noch zu lang, die Enzymkosten zu hoch und die Prozessstabilität der Enzyme zu gering (Wagenführ et al. 2003, Wagenführ et al. 2005).

Der wissenschaftlich-technische Stand insbesondere des Enzymeinsatzes bei Holzstoffen wird im Folgenden anhand einiger Beispiele beschrieben werden.

### **2.1 Enzymatische Entfernung von Störstoffen mit Lipasen**

Fett- und Harzanteile in Faserstoffen aus nichtalkalischen Holzaufschlussverfahren können durch Agglomeration zum so genannten Pitch erhebliche Probleme auf der Papiermaschine

bereiten. Lipasen spalten die in den Hackschnitzeln vorhandenen Fette in Fettsäuren und ihre Hydroxyalkomponenten, meist mehrwertige Alkohole.

Triglyceride sind der wesentliche Bestandteil der Harze. Mit Hilfe von Lipase (Tryglycerid-Hydrolase) können diese gezielt abgebaut werden. Eine entsprechende Behandlung ist sowohl mit Lipase produzierenden Pilzkulturen, als auch mit dem Enzym selbst möglich.

Weltweit Anwendung findet dabei zum Beispiel ein isolierter farbloser Stamm des Harz abbauenden Blaufäulepilzes (*Ophiostoma piliferum*). Der als Pulverform angebotene Pilz wird in Wasser suspendiert und auf die Hackschnitzel gesprüht. Nach etwa zwei Wochen kann der Harzgehalt um 40 bis 70 % reduziert werden. Die Behandlung mit genanntem Pilz trägt auch zur Weißgradstabilisierung bei, sodass bis zu 25 % Bleichchemikalien eingespart werden können. Auch im Rahmen von Untersuchungen zum Biopulping eingesetzte Pilzstämme haben gezeigt, dass sie zum Harzabbau aktiv beitragen. (Chang et al.1993, Gliese, T. et al. 1994, Bajpal et al. 1999, Swaney et al. 2000)

Für die direkte Behandlung von Faserstoffen werden Lipasepräparate eingesetzt. Die Inkubationsbedingungen sind wesentlich prozessfreundlicher (40 bis 75 °C, pH 4,5 bis 9). Die Inkubationszeit beträgt dabei nur wenige Stunden. Der Harzanteil kann so um bis zu 90 % reduziert werden. Es ist jedoch notwendig, die freien Fettsäuren zu verseifen und auszuwaschen, da auch sie als Störstoffe agieren können (Chang et al.1993, Bajpal et al. 1999b)

Die Juju-Paper Company in Japan produziert Zeitungsdruck- und Telefonbuchpapier und verwendet hierfür 30 % Kiefern-Holzschliff. Durch Einführung einer Lipase-Behandlung des Holzstoffes konnten die schweren Defekte auf der Papiermaschine weitgehend reduziert werden (Fujita et al. 1992).

Kommerzialisiert und großtechnisch eingesetzt wird ein Verfahren der Nippon Paper Industries in Japan, bei dem mit einer Lipase, die aus dem Pilz *Candida rugosa* isoliert wurde, eine bis zu 90%ige Hydrolyse von Triglyceriden erzielt werden kann (Jaeger et al 1998).

## **2.2 Enzymatische Hackschnitzelbehandlung**

Ursprünglich bezeichnete der Begriff *Biopulping* die Behandlung von Hackschnitzeln mit Lignin abbauenden Pilzsystemen vor der mechanischen Zerfaserung. Heute umfasst der Begriff alle biotechnologischen Verfahren in der chemischen und mechanischen Faserstoffherstellung. Eine entsprechende Vorbehandlung von Hackschnitzeln verfolgt als Ziel immer eine Einsparung von Energie und Chemikalien bei der Holzstoff- und Zellstofferzeugung. Darüber hinaus sollen Festigkeitseigenschaften, sowie optische Eigenschaften von Faserstoffen verbessert werden. Im Fall der Zellstofferzeugung wird mit einer enzymatischen Vorbehandlung der Hackschnitzel auch eine verbesserte Ligninherauslösung angestrebt. (Gliese, T et al. 1994, Swaney et al. 2000)

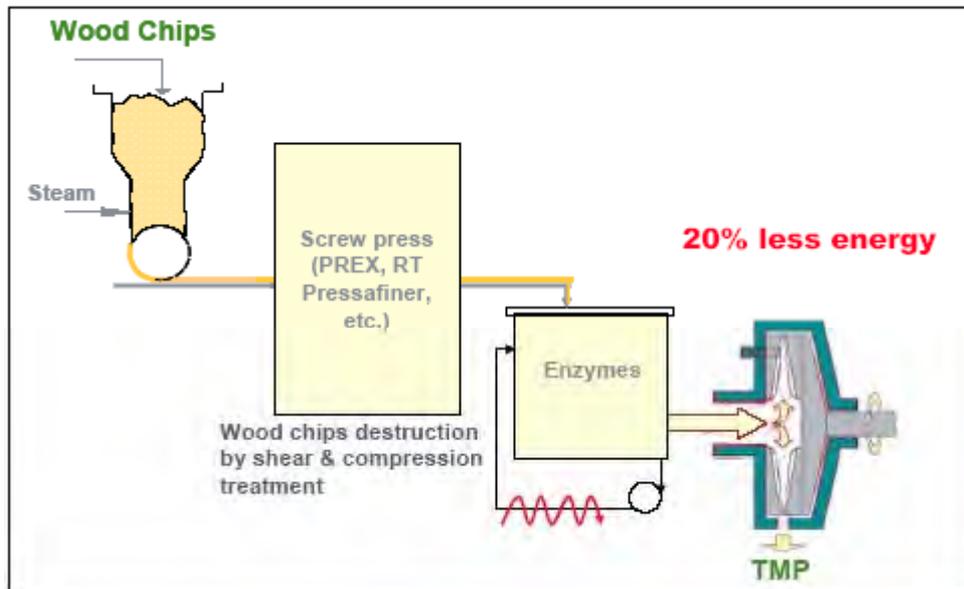
Die Problematik der vergleichsweise schlechten Substratzugänglichkeit von Lignin abbauenden Oxidoreduktasen wird durch eine Pilzbehandlung der Hackschnitzel umgangen. Die Pilze dringen mit ihren Mycelfäden in die Markstrahlen des Holzes ein und scheiden so ihre Enzyme

im Innern der Hackschnitzel aus (Gliese, T et al. 1994). Neben den Lignin abbauenden Enzymen produzieren die Pilze auch Kohlenhydrate abbauende Enzyme, die die Holzsubstanz abbauen. Durch Zugabe einer Nährlösung kann dieser Eingriff jedoch eingedämmt werden. (Scott et al. 1998). Konkurrierende Pilzkulturen und Bakterien können durch eine der Inkubation vorausgehenden Dämpfung der Hackschnitzel abgetötet werden. Der größte Nachteil einer enzymatischen Hackschnitzelbehandlung sind jedoch die sehr langen Inkubationszeiten von zwei bis vier Wochen. Aufgrund dieser Tatsache und der komplizierten Prozesssteuerung (Temperatur- und Feuchteregeung im Hackschnitzel-Pile) findet diese Technologie noch keine Anwendung in der Holzstoff erzeugenden Industrie. Praxisversuche haben jedoch bereits gezeigt, dass Energieeinsparungen bis 30 % und verbesserte Festigkeitseigenschaften des Faserstoffes mit einer enzymatischen Hackschnitzelbehandlung möglich sind. Ein weiterer großer Nachteil ist der deutliche Weißgradabfall um 15–20 %-Punkte durch die Behandlung. Da dieser durch eine entsprechend intensivere Bleiche kompensiert werden muss, kommt eine enzymatische Hackschnitzelbehandlung in der Zellstoffherzeugung, welche nach einem besonders hohen Weißgrad strebt, nicht in Frage. (Scott et al. 1998, Swaney et al. 2000, Eriksson 1982, Call et al. 1990).

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen zur enzymatischen Behandlung von Hackschnitzeln durchgeführt. So wurden zum Beispiel Kiefern hackschnitzeln mit Laccase behandelt. Bei gegebenem Entwässerungswiderstand konnte so eine Reduzierung der spezifischen Mahlarbeit, sowie eine Verbesserung der Festigkeitseigenschaften erzielt werden (Gliese, T et al. 1994, Wong et al. 1999, Eriksson 1998).

Generell ist jedoch die Zugänglichkeit der Hackschnitzel für Enzyme sehr eingeschränkt. Die Porengröße von Holzzellen beträgt ca. 1 bis 3 nm während die Enzyme eine Molekülgröße von 3 bis 7 nm besitzen (Grethlein 1985, Srebotnik 1990, Viforr 2008). Zur Verbesserung der Enzympenetration wurden der Einsatz von Tensiden untersucht (Wang et al. 2007, Viforr 2008). Eine Hackschnitzelbehandlung mit einem Enzymcocktail aus Laccase und verschiedenen Hydrolasen über einen Zeitraum von 10 bis 72 h führte hier zu einer Verringerung des Energieverbrauches um ca. 12 % ohne Weißgrad und Festigkeitsverluste.

Speziell mit dem Ziel der Energieeinsparung unter Beibehaltung der Faserstoffeigenschaften befasst sich aktuell das europäische Verbundprojekt „ECOTARGET“, das im Herbst 2008 abgeschlossen wurde. Ein Teilprojekt befasste sich mit der enzymatischen Behandlung von Hackschnitzeln in Kombination mit einer mechanischen Vorbehandlung. Dabei wurde die Holzstruktur durch eine kombinierte Scher-Druckbehandlung aufgelockert und ein Enzymcocktail aus Endoglucanase (EG) und Cellobiohydrolase I (CBH I) eingebracht.



**Abb. 2.2-1: Hackschnitzelvorbehandlung (Viforr 2008)**

Danach wurden die Hackschnitzel bei 45 °C über 22 h inkubiert und anschließend in einem Zylinderrefiner in Laborversuchen batchweise zerkleinert. Durch die Behandlung konnte der Energieverbrauch um 20 % reduziert werden mit verbesserten mechanischen Eigenschaften des Faserstoffes (Pere et al 2007).

### 2.3 Enzymatische Holzstoffbehandlung

Die Effekte von Cellulasen und Xylanasen auf ligninreiche Faserstoffe, wie Holzschliff und TMP, sind bisher nicht vollständig untersucht. Aufgrund ihres hohen Ligningehaltes an der Faseroberfläche ist die Zugänglichkeit für die genannten Enzyme wesentlich geringer als bei Altpapierstoff. Wegen der hohen Energiekosten wird der Enzymeinsatz bei mechanisch erzeugten Holzstoffen in jüngster Zeit jedoch verstärkt untersucht.

Bei Moulin (2001) wird von einer Verbesserung der Zugsteifigkeit und einer Verringerung des Energieverbrauchs bei Cellulasebehandlung von Softwood Pulp und Nachmahlung im Refiner im Industriemaßstab berichtet. Bei gleichem Energieverbrauch konnte die Zugsteifigkeit um 10 - 15 % verbessert werden. In einem 1994 patentierten Verfahren von Pere et al. wird durch eine Fermentation von Fichtenholz-TMP mit Cellobiohydrolase eine Verbesserung der Festigkeitswerte bei verringertem spezifischen Energieverbrauch erreicht.

In Forschungsarbeiten von Pere et al. (2000) wurde die enzymatische Behandlung von TMP-Reject mit einer Cellulase-/Hemicellulase bei 45 °C über 2 h untersucht. Die Behandlung mit CBH I führte bei gegebenem Entwässerungswiderstand zu einer Reduzierung der spezifischen Mahlarbeit um bis zu 20 %. Ähnliche Effekte wurden bei der Behandlung von TMP mit einem Gemisch aus CBH und Mannanase gewonnenen aus der Fermentation mit *Trichoderma reesei* erzielt Pere et al. 1994, 1999. Negative Einflüsse auf die Faserstoffqualität und die Festigkeitseigenschaften wurden nicht beobachtet.

## **2.4 Enzymatische Aktivierung von TMP zur Herstellung von Holzfaserwerkstoffen im Trocken- und Nassverfahren**

### **2.4.1 Einsatz phenoloxidierender Enzyme**

Auch bei der Entwicklung von Holzwerkstoffen wurde der Einsatz von Enzymen zur Aktivierung stoffeigener Bindkräfte von TMP untersucht. Das Ziel bestand hier in der Reduzierung des Einsatzes formaldehydhaltiger Kunstharzbindemittel bei der Herstellung von MDF und HDF im Trockenverfahren (pneumatische Vliesstreuung). Hier wurden zunächst ligninoxidierende Enzyme eingesetzt (Kharazipour 1993, Yde 1993). In den Arbeiten wurde nachgewiesen, dass durch enzymatische Aktivierung des holzeigenen Lignins eine Erhöhung der Bindekräfte zwischen den Fasern erreicht werden kann und bindemittelfreie Faserplatten herstellbar sind. Wesentliche Nachteile beim Einsatz dieser Enzymsysteme besteht sind die langen Inkubationszeiten und die hohen Dosierungen.

In einem vom BMBF geförderten Verbundprojekt wurde vom Institut für Holz- und Papiertechnik der Einsatz von lignolytischen Enzymen bei der Faserdämmplattenherstellung im Nassverfahren durchgeführt. Dieses Nassverfahren ist der Papierherstellung sehr ähnlich. Der Einfluss chemischer und physikalischer Parameter konnte hier nicht endgültig geklärt werden. Es sollte der Einsatz preisgünstiger hydrolytischer Enzymsysteme untersucht werden.

In einem BMBF-Projekt wurden an der Technischen Universität bereits Untersuchungen zum Einsatz von phenoloxydierenden Enzymen (Laccase) bei der Herstellung von Dämmplatten im Nassverfahren durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der Einsatz dieser Enzyme positive Wirkungen auf die Platteneigenschaften hat. Allerdings waren hier die Inkubationsdauer noch zu lang, die Enzymkosten zu hoch und die Prozessstabilität der Enzyme zu gering.

Ziel dieses Teilprojektes war es, durch den Einsatz von hydrolytischen Enzymen die Eigenschaften, vor allem die Festigkeits- und Quelleigenschaften von Dämmplatten, die im Nassverfahren hergestellt werden, zu verbessern.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Faserstoffe mit verschiedenen Enzymsystemen unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert und daraus dann Dämmstoffe sowohl im Labormaßstab als auch unter produktionsähnlichen Bedingungen hergestellt und getestet. Dabei wurde sowohl Frisch- als auch Prozesswasser eingesetzt. Die Einflüsse von Art und Konzentration der Enzyme sowie von Additiven auf die Eigenschaften der Laborblätter und der Werkstoffeigenschaften war auch Gegenstand der Untersuchungen (Wagenführ et al. 2003, Wagenführ et al. 2005).

### **2.4.2 Einsatz hydrolytischer Enzymsysteme**

Auf der Suche nach effektiven Enzymsystemen wurde an der TU Dresden in Zusammenarbeit mit dem SIAB Leipzig damit begonnen, hydrolytische Enzymsysteme (Cellulasen und Xylana-

sen) zur Modifizierung holzeigener Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulose) einzusetzen. In den Forschungsarbeiten wurde nachgewiesen, dass beim Einsatz von Xylanasen und Endoglucanasen bereits mit kurzen Inkubationszeiten von wenigen Minuten enorme Festigkeitsverbesserungen bei Holzfaserwerkstoffen, hergestellt im Trockenverfahren, erreicht werden können (Unbehaun et al. 2001, 2002). Jüngste Ergebnisse zeigen, dass diese Resultate auch bei relativ schwacher Dosierung von 3–5 % Enzymlösung, bezogen auf die Faserstoffmenge, erzielt werden. Im Gegensatz zu den ligninmodifizierenden Enzymen gehören Cellulasen und Xylanasen zur Kategorie der sog. „Billigenzyme“, so dass die Anwendung des Verfahrens in industriellen Prozessen zur Holzwerkstoffherstellung möglich wird.

Bei Screeninguntersuchungen zeigte sich, dass Cellulasen und Xylanasen positiv auf die Festigkeitseigenschaften von Laborblättern aus TMP wirken. Bei diesen Untersuchungen kamen meist Industrieenzyme zum Einsatz, die für einen Einsatz in der Textil- und Futtermittelindustrie prädestiniert waren. Eine Optimierung der Enzyme im Hinblick auf die Anwendung bei Holz- und Altpapierstoff birgt hier noch erhebliche Entwicklungspotenziale.

## 2.5 Enzymgewinnung und -applikation

Ein weiteres Ziel des Projektes bestand in der Optimierung und Charakterisierung der Enzymsysteme sowie deren wirtschaftlicher Gewinnung und Nutzung. Die wesentlichsten Kriterien für die wirtschaftliche Umsetzung der enzymatischen Modifikation von Lignocellulose-Faserstoffen bilden die Enzymkosten und die notwendige Enzymdosierung. Die Enzymkosten werden von der Realisierung der stammspezifischen Leistungsparameter im Fermentationsprozess und den Kosten des Nährmediums sowie den Kosten für die Aufarbeitung/Abtrennung der Enzyme bestimmt.

Die Enzymdosierung wird von der Stabilität und den Eigenschaften der Enzymkomponenten abhängen. Dies sind in erster Linie die spezifischen – auf Enzymprotein bezogenen – Aktivitäten sowie das pH- und Temperaturoptimum der Enzyme in Anpassung an den Applikationsprozess. Ein wesentliches Kriterium für die optimale Enzymdosierung zur Modifikation von Lignocellulose-Faserstoffen stellt die optimale Zusammensetzung der Enzymkomplexe dar. Die komplexe Zusammensetzung von Lignocellulose-Substraten erfordert zu deren Modifikation bzw. zum enzymatischen Abbau Enzymkomplexe, die unterschiedliche Enzymkomponenten enthalten. Am Beispiel von *Trichoderma reesei*-Cellulase-Enzymkomplexen, den derzeit für die Lignocellulose-Modifikation geeignetsten Enzymen, soll dies in Tabelle 2.5-1 veranschaulicht werden.

Die in der Tabelle 2.5-1 aufgeführten Enzymkomponenten unterscheiden sich in ihren enzymologischen Charakteristika und weisen in der Regel selbst innerhalb einer Gruppe unterschiedliche Eigenschaften auf, beispielsweise im Fall der Endoglucanase-Komponenten, die dann auch verschiedenen sog. „families“ zugeordnet werden. Ein Problem stellt die analytische Bestimmung der Einzelkomponenten dar, da für diese in der Regel kein spezifisches Substrat existiert und man deshalb sog. „artificial Substrate“ (z.B. p-Nitrophenyl- oder Methyl-

umbelliferryl-Derivate) mit Einschränkungen zur Aktivitätsbestimmung verwendet. In Tabelle 2.5-1 sind die Enzymkomponenten markiert, welche mit den jeweils bekannten Aktivitätsmessungen summarisch erfasst werden.

Im Falle des enzymatischen Abbaus von reiner Cellulose ist der Mechanismus aufgeklärt. Die Endoglucanasen (I bis III), Cellobiohydrolasen und die  $\beta$ -Glycosidasen (Cellobiase) wirken synergistisch; die Filterpapieraktivität ist nahezu ein hinreichendes Kriterium zur Charakterisierung der Abbauleistung von Cellulase-Komplexen. Demgegenüber ist der enzymatische Abbau von komplexen Lignocellulose-Substraten erst in Teilprozessen aufgeklärt. Dies betrifft insbesondere die enzymatische Modifikation von Lignocellulose-Faserstoffen zur Herstellung von Holzfaserwerkstoffen, wo der endgültige Nachweis noch aussteht, welche Enzymkomponenten wirken und welche Enzymkomponenten nicht benötigt werden oder gar von Nachteil sind. Sind dies Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen, Xylanasen, Mannanase, einzeln oder synergistisch?

**Tabelle 2.5-1: hydrolytische Enzyme von *Trichoderma reesei* (Ouyang et al. 2006)**

| Enzym-komponente     | Name nach neuer Nomenklatur | Ursprünglich verwendete Bezeichnung | Molekulare Masse in kDa | pI (isoelektrischer Punkt) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Cellobiohydrolase I  | Cel7A                       | CBHI                                | 54.11                   | 4.60                       |
| Cellobiohydrolase II | Cel6A                       | CBHII                               | 49.65                   | 5.11                       |
| Endoglucanase I      | Cel7B                       | EGI                                 | 48.20                   | 4.73                       |
| Endoglucanase II     | Cel5A                       | EGII                                | 44.15                   | 4.96                       |
| Endoglucanase III    | Cel12A                      | Cel12A                              | 25.16                   | 6.90                       |
| Endoglucanase IV     |                             | EGIV                                | 35.51                   | 5.30                       |
| Endoglucanase V      |                             | EGV                                 | 24.41                   | 4.20                       |
| Endoglucanase VI     | Cel74A                      | EGVI                                |                         | 5.34                       |
| Endoglucanase VII    | Cel61B                      | EGVII                               | 26.80                   | 7.76                       |
| Endoglucanase VIII   | Cel5B                       | EGVIII                              | 46.85                   | 4.32                       |
| Xylanase I           | XynIIA                      | Xyn1                                | 24.07                   | 8.05                       |
| Xylanase II          |                             | Xyn2                                | 24.58                   | 5.00                       |
| Xylanase III         |                             | Xyn3                                | 38.07                   | 7.13                       |
| Xylanase IV          | Xyn11C                      | Xyn-1                               | 20.19                   | 5.84                       |
| Mannanase I          | ManI                        | Man1                                | 46.95                   | 5.26                       |
| Glycosidase I        | Bgl3A                       | Bgl1                                | 78.43                   | 6.40                       |
| Glycosidase IV       | BglIB                       | Bgl5                                | 55.08                   | 5.48                       |
| Glycosidase VI       | Bgl3D                       | Cel3d                               | 77.08                   | 6.02                       |
| Glycosidase VII      | Bgl3E                       | Cel3e                               | 8300                    | 6.04                       |
| Glycosidase XII      | Bgl3K                       |                                     | 58.38                   | 5.19                       |
| Xylosidase II        | Xyl3B                       |                                     | 78.39                   | 4.85                       |

Aus diesen Gründen werden die Applikationsuntersuchungen mit Cellulase-/Hemicellulase-Komplexen weitgehend empirisch durchgeführt, indem unterschiedlich zusammengesetzte Enzymkomplexe hinsichtlich ihrer Eignung getestet werden, um dann Rückschlüsse auf die jeweils erforderliche Zusammensetzung der Enzymkomplexe zu ermöglichen.

Gute Ergebnisse wurden bisher vom SIAB Leipzig insbesondere mit *Trichoderma reesei*-Endoglucanase-/Xylanase-Komplexen erzielt, die mit einer regulationsveränderten Mutante (*T. reesei*-M18.2) auf Basis von Dünnschlempe/Cellulose fermentiert wurden. Gegenüber dem sog. Standardmedium mit Cellulose/Weizenkleie als Substrat und Induktor enthalten die auf Basis von Roh- und Dünnschlempe fermentierten Enzymkomplexe einen höheren Anteil an Hemicellulasen, insbesondere Xylanase (Kerns et al. 2001; König et al. 2002; König et al. 2007; DE 102006022729 B4). Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die *T. reesei*-Endoglucanase-/Xylanase-Komplexe des SIAB im Vergleich mit kommerziellen Enzympräparaten in die Arbeiten einbezogen (Abschnitt 4.1).

### **3 Forschungsziele und Lösungsweg**

#### **3.1 Forschungsziel**

Das Ziel des Projektes bestand in der die Verbesserung der Qualität von Papieren aus Holzstoff sowie von Dämmplatten aus TMP im Nassverfahren. Durch eine enzymatisch katalysierte selektive Teilhydrolyse der Polysaccharide sollte eine Verringerung des Mahl- und Prozessenergieverbrauches bei gleichen oder verbesserten Produkteigenschaften erreicht werden.

Dazu wurden prozesstechnische und verfahrenstechnische Parameter zur kontrollierten Teilhydrolyse der Polysaccharide, insbesondere der Hemicellulosen untersucht. Zur Modifizierung der an der Faseroberfläche ebenfalls vorhandenen Ligninkomponente wurden aber auch phenoxidierende Enzyme eingesetzt.

Im Projektzeitraum wurde außerdem eine applikationsorientierte Enzymentwicklung realisiert. Es wurden Ergebnisse zu Art und Einsatzmöglichkeiten geeigneter Enzymsysteme erzielt. Bezüglich der Faserstoffbehandlung sollten optimalen Fermentations- bzw. Inkubationsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Trockengehalt, Behandlungszeit usw., erreicht werden.

#### **3.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels**

Die Projektidee besteht darin, durch Behandlung lignozelluloser Partikel mit spezifischen Enzymen eine Teilhydrolyse bzw. Modifizierung von Hemizellulose-Lignin-Agglomeraten an der Faser- bzw. Partikeloberfläche zu erreichen und bei verringertem Mahlarbeitsbedarf einen höheren Aufschlussgrad zu erreichen.

Das Arbeitsvorhaben umfasst folgende Schwerpunkte:

AP 1: Entwicklung und Herstellung geeigneter Enzymsysteme

AP 2: Entwicklung von speziellen Verfahren zur Faserstoffinkubation und -verarbeitung

AP 3: Faserstoffinkubation und Papierherstellung im Technikumsmaßstab, Produktprüfung

AP 4: Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung im Technikumsmaßstab

AP 5: Upscalingversuche zur Produktherstellung in kmU, Verfahrenskonzeption

Die Arbeitspakete werden in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

## **4 Entwicklung und Herstellung geeigneter Enzymsysteme**

### **4.1 Enzymgewinnung**

Die Untersuchungen zur Enzymgewinnung im Rahmen des Arbeitspaketes 1 zum Projekt wurden vorwiegend mit dem regulationsveränderten Stamm *T. reesei*-M18.2 durchgeführt.

Dieser Stamm ist gekennzeichnet durch

- hohe Exkretionsleistung des extrazellulären Cellulase-/Hemicellulasekomplexes auf Basis löslicher Kohlenstoffquellen,
- Nutzung von Lactose und Dünnschlempe als Fermentationssubstrat,
- Fermentation eines Enzymkomplexes mit einem hohen Anteil an Xylanase auf Basis kostengünstiger Substrate.

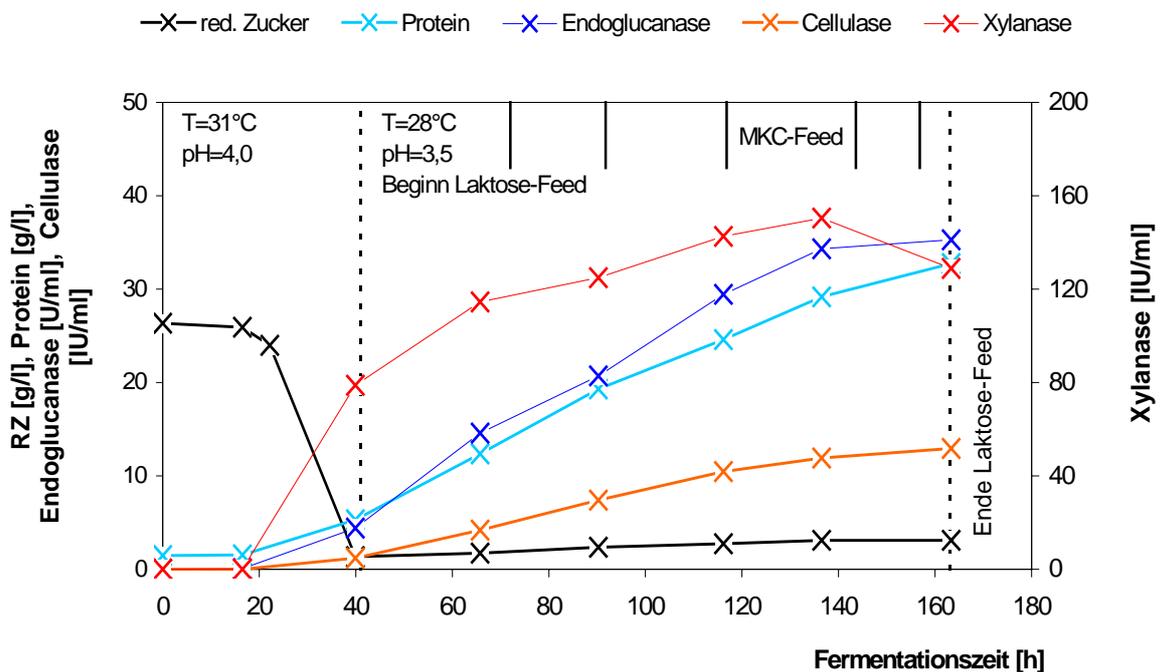
Die Enzymgewinnung erfolgt durch aerobe Submersfermentation des Produktionsstammes und anschließende Aufarbeitung der Enzymlösung zum Flüssigkonzentrat. Die für diesen Stamm entwickelte Technologie zur Cellulasegewinnung auf löslichen Substraten erfordert ein exakt einzuhaltendes Prozessführungsregime. Insbesondere ist die Substratzugabe in der fed-batch-Technik ausschlaggebend für die Realisierung der durch die Leistungsgrenze des Stammes festgelegten Enzymproduktivität. Mittels Variation der Prozessbedingungen im Fermentationsprozess, insbesondere des Fermentationsmediums, des pH-Wertes und – mit Einschränkungen – auch der Temperatur, kann die Zusammensetzung des Enzymkomplexes variiert werden.

Die Mutante wurde ausschließlich mittels klassischer genetischer Methoden hergestellt, weshalb das Gentechnikgesetz bei der Kultivierung dieser Mutante keine Anwendung findet. Der Regulation zur Bildung und Exkretion der Enzymkomponenten ist durch den Mechanismus der Induktion und der C-Katabolitrepression gekennzeichnet, wobei letztere bei dem verwendeten Produktionsstamm *de facto* ausgeschaltet ist. Das Ausmaß der C-Katabolitrepression ist von der Art und Konzentration des Substrates sowie vom Alter des Mycels abhängig, so dass mittels einer feedback-kontrollierten fed-batch-Technik die Enzymgewinnung auf Basis löslicher

Substrate möglich ist. Die Induktion der Enzymbildung mittels Substanzen im Nährmedium ist erforderlich und bietet die Möglichkeit, durch Variation der induzierenden Bestandteile die Zusammensetzung des ins Medium ausgeschiedenen Enzymkomplexes zu verändern.

Die Untersuchungen zur Enzymgewinnung einschließlich der Bereitstellung von Enzympräparaten für die projektbezogenen Applikationsuntersuchungen erfolgten in Bioreaktoren vom 5 l-Labormaßstab über 42 l bis hin zu 150 und 600 l im Technikumsmaßstab. Die Erarbeitung verfahrenstechnischer Parameter zur Entwicklung der Prozessstrategie erfolgte im 42 l-Bioreaktor (Fa. Infors AG); die Arbeiten zur Maßstabsübertragung des Verfahrens auf Grundlage der gewonnenen Kenngrößen erfolgten im 150 bzw. 600 l Bioreaktor (Fa. Infors AG; Biotechnikum des Helmholtzzentrum für Umweltforschung UFZ).

In der Abbildung 4.1-1 ist eine Fermentation auf Basis des sog. Standardmediums mit Lactose/Weizenkleie/Cellulose als Substrat und Induktor dargestellt, in der Abbildung 4.1-2 eine Fermentation auf Basis von Dünnschlempe/Cellulose. An Hand der Abbildungen ist erkennbar, dass mit Dünnschlempe eine ca. 9-fach höhere Xylanaseaktivität nach kürzerer Fermentationszeit gegenüber dem Standardmedium erzielt werden kann, wobei die Cellulaseaktivität (als FPA) ein Drittel niedriger liegt.



**Abb. 4.1-1: Fed-batch Fermentation auf Basis eines WK-Cellulose-Lactose Mediums,  $V_F = 23L$**

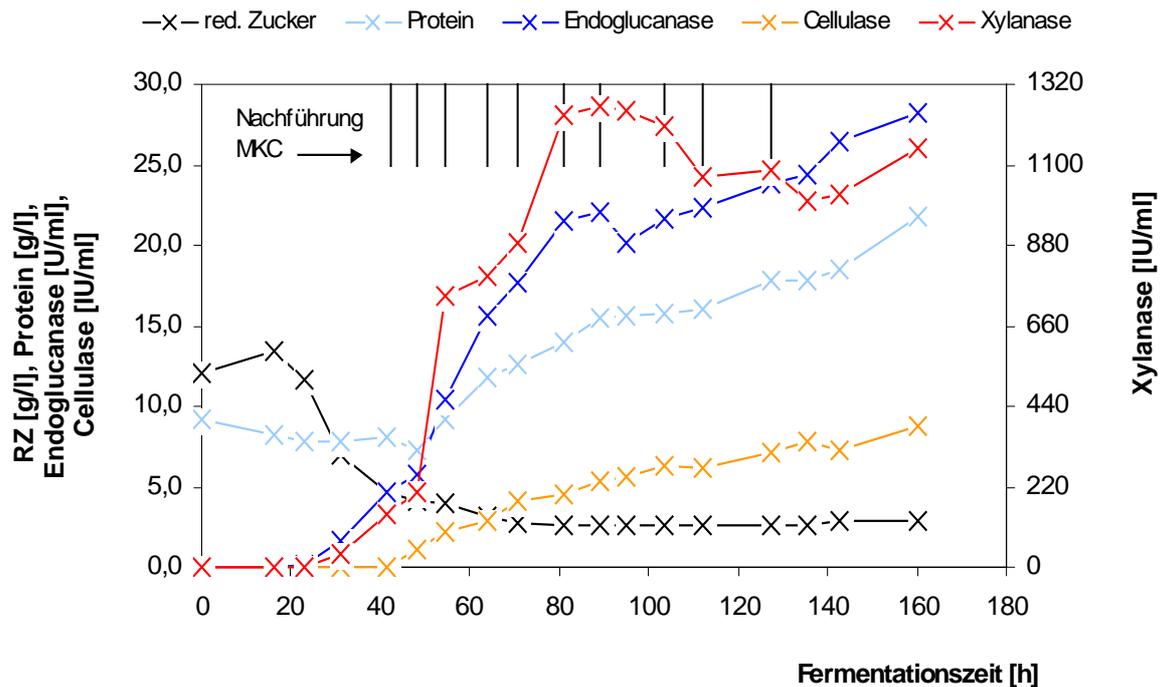


Abb. 4.1-2: Fed-batch Fermentation auf einem Dünnschlempemedium,  $V_F = 80L$

Tab. 4.1-1: Parameter zur Fermentation auf Basis des Standardmediums

| Fermentation kleintechnisch | Reaktor        | Arbeitsvolumen | Prozessführung    | Grundmedium              | Nachführung                   | pH-Wert, Temp.     | Endaktivitäten   |
|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------|--|
| Vorkultur                   | Schüttelkolben | 1200 ml        | batch (28 h)      | Glucosestandard (20 g/L) | -                             | 5,0<br>30°C        | -  |
| Fermentation                | 42 L Infors    | 23,5 L         | fed-batch (163 h) | WK, Cellulose, Glucose   | Laktose (1 g/L, $CO_2=80\%$ ) | 3,5<br>31°C / 28°C | <b>Xyl.:</b> 129 IU/ml<br><b>EG:</b> 35 U/ml<br><b>FPA:</b> 13 IU/ml |

Xyl. = Xylanase, EG = Endoglucanase / Azo-CMC, FPA = Cellulaseaktivität

In der fed-batch-Phase der Fermentation wurde gesättigte Lactoselösung intermittierend zudosiert, wobei die Zugabe von jeweils 1 g Lactose je Liter Fermentationsmedium mittels eines dafür entwickelten Steuerprogrammes über die  $CO_2$ -Konzentration des Fermentationsabgases geregelt wurde.

**Tab. 4.1-2: Parameter zur Fermentation auf Basis des Dünnschlempemediums**

| Fermentation halbtechnisch | Reaktor        | Arbeitsvolumen | Prozessführung    | Grundmedium              | Nachführung     | pH-Wert, Temp. | Endaktivitäten  |
|----------------------------|----------------|----------------|-------------------|--------------------------|-----------------|----------------|---|
| Vorkulturstufe 1           | Schüttelkolben | 900 ml         | batch (26,5h)     | Glucosestandard (20 g/L) | -               | 5,0<br>30°C    | -   |
| Vorkulturstufe 2           | 42 L Infors    | 15 L           | batch (27h)       | Glucosestandard (20 g/L) | -               | 4,5<br>30°C    | -   |
| Hauptfermentation          | 150 L Infors   | 80 L           | fed-batch (160 h) | Dünnschlempe (100%)      | MKC (0,3%, 8 h) | 5,0<br>30°C    | <b>Xyl.: 1.150 IU/ml</b><br><b>EG: 28 U/ml</b><br><b>FPA: 8,5 IU/ml</b> |

Xyl. = Xylanase, EG = Endoglucanase / Azo-CMC, FPA = Cellulaseaktivität

Die Dünnschlempe wurde nach Separation der Feststoffe aus Rohschlempe der Fa. ECKES, (Nordhausen) gewonnen. Unter gezielter manueller Nachführung mikrokristalliner Cellulose (ca. 0,3 % im Abstand von 8 h) wurde eine Endoglucanaseaktivität von ~28 U/ml bei etwa 8 IU/ml Cellulaseaktivität erreicht. Die in der Dünnschlempe enthaltenen Oligosaccharide bewirken die bessere Induktion der Hemicellulasen, insbesondere Xylanase, verglichen mit dem Standardmedium.

Die Abtrennung und Aufkonzentrierung der Enzyme zum Flüssigkonzentrat erfolgte mittels Separation, cross-flow-Mikro- und anschließender cross-flow-Ultrafiltration. Die Ausschlussgrenze bei der Ultrafiltration betrug in allen Fällen 10.000 kDa.

Bei der Untersuchung organischer Zusätze mit Induktorfunktion erwies sich Cellulose (0,4 - 1,0 %) in mikrokristalliner oder faserartiger Struktur (Linters) neben anderen Polysacchariden oder monomeren bzw. oligomeren Zuckern im Grundnährmedium als geeignet, um die Ausscheidung der Enzymkomplexe zu forcieren. Für das klassische Medium wie auch das Schlempemedium ist eine bedarfsgerechte Supplementierung von anorganischen Komponenten wie beispielsweise der Nährsalze  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder verschiedener Spurensalzen notwendig, um einer Limitation der essentiellen Elemente Stickstoff, Phosphor und Spurenelemente vorzubeugen, die zur Inhibierung des Mycelwachstums oder zu einem Leistungsverlust im Zuge der Kultivierung führen würde.

Mittels Veränderung der Prozessführung kann ein sehr wesentlicher Beitrag zur Steigerung der Produktivität des Stammes geleistet werden. Als wesentliche Einflussparameter sind dabei die Veränderung der Temperatur, des pH-Wertes, der Fermentationsdauer und der Betriebsweise als batch Ansatz oder in verschiedenen fed-batch Modi zu nennen. Für die auf Schlempe basierenden Versuche eignet sich ein pH-Wert von 5,0 - 5,5 zur Erzielung einer hohen Exkretion von Xylanase- und Endoglucanasekomplexen, wo hingegen auf klassischem Medium in der Cellulasebildungsphase ein pH-Wert um 3,5 – 4,0 geeignet ist. Während im letztge-

nannten Verfahren gelöste Laktose als nachgeführter Induktor dient, hat sich beim Schlempegrundmedium fester Cellulosestoff (mikrokristallin oder faserartig) als Nachführsubstrat bewährt. Pumpfähige Substrate im fed-batch Prozess, wie beispielsweise Laktose oder Dünnschlempe selbst, führten zu weniger stark ausgeprägten Ausbeuten.

In technischen Prozessen der Papier- und Faserplattenherstellung ist aufgrund erhöhter Temperaturen der Stoffsuspension ein Einsatz temperaturstabilerer Enzymsysteme sinnvoll. Bei Voruntersuchungen am SIAB wurden im Labormaßstab thermostabilere Enzyme mit einem *Aspergillus terreus*-Stamm untersucht, welcher Xylanase- sowie Endoglucanaseaktivität bei stark verringerter Aktivität der mitunter negativ wirkenden Cellobiohydrolase aufweist. Der *Aspergillus terreus*-Stamm wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit hinsichtlich des Enzymbildungsvermögens im SIAB untersucht (Matthias Schulze, Hochschule Anhalt-Köthen, 2007). Die mit diesen Arbeiten erzielten Enzymexkretionsraten waren jedoch sehr niedrig, so dass dieser Stamm im Rahmen des Projektes für die Bereitstellung von Enzymmustern für Applikationsuntersuchungen nicht in Betracht kam.

## 4.2 Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und Gesamtprotein

### 4.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Durchführung nach Lowry et al. 1951: Vorverdünnung der Probe in destilliertem Wasser (etwa 0,1–1,0 mg/ml Protein im Ansatz); 0,5 ml Probe mit 5 ml Reagenz C mischen; 10 min reagieren lassen; Zugabe von 0,5 ml 1N Phenolreagenz und gut durchmischen (vortexen); 30 min abgedunkelt stehen lassen, Extinktion der Probe gegen den Nullwert bei 750 nm vermessen;

Nullwert: 0,5 ml dest. Wasser + 5,0 ml Reagenz C

Verwendete Lösungen:

Reagens A: 20,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 4,0 g NaOH in 1000 ml dest. Wasser lösen (gekühlt lagern!)

Reagens B1: 1,0 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O in 100 ml dest. Wasser lösen (gekühlt lagern!)

Reagens B2: 2,0 g Na-K-Tartrat in 100 ml dest. Wasser lösen (gekühlt lagern!)

Reagens C: 1,0 ml Reagens B2 zu 1,0 ml Reagens B1 geben, mit 100 ml Reagens A mischen (nur ein Tag haltbar!)

Phenollsg.: 2N Folin-Ciocalteu-Reagens zu gleichem Teil mit dest. Wasser mischen

Die Eichkurve wird mit Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich zwischen 0,1–1 mg/ml Protein angefertigt.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgt durch Berechnung mittels folgender Gleichung:

$$\text{Protein} = \frac{\text{Extinktion} - \text{"y-Achsenabschnitt" der Eichkurve}}{\text{Anstieg der Eichkurve}} \times \text{Verdünnung} \cdot \text{mg/l}$$

## 4.2.2 Bestimmung der Xylanaseaktivität nach Ghose

Durchführung nach Ghose et al. 1984: Vorverdünnung der Probe mit 0,05M Citratpuffer (pH=4,8); Erstellung zwei weiterer Verdünnungen aus dieser Probe (1:2 und 1:4); Vermischung von 0,1 ml Citratpuffer mit 0,8 ml Xylanlösung und 0,1 ml Probe aus der jeweiligen Verdünnungsstufe, 20 min im 50 °C temperierten Wasserbad inkubieren, Reaktionsabbruch mit 3 ml DNS, 5 min kochen; Abkühlung; Zugabe von 10 ml dest. Wasser; Mischen; photometrische Vermessung bei 540 nm; in der Auswertung sind Substrat- und Blindwert vom Messwert zu subtrahieren.

Nullwert: 1,0 ml Citratpuffer + 3,0 ml DNS

Substratwert: 0,2 ml Citratpuffer + 0,8 ml Xylanlösung + 0,3 ml DNS (Eigenfärbung Xylan)

Blindwert: 0,9 ml Citratpuffer + 0,1 ml Probe + 3,0 ml DNS (Eigenfärbung Enzymprobe)

Der Standardwert wird über 1,0 mg Xylose im Inkubationsansatz bestimmt und stellt die Extinktion dar die eine Enzymmenge mit einer Xylanaseaktivität von 3,33 IU erreicht.

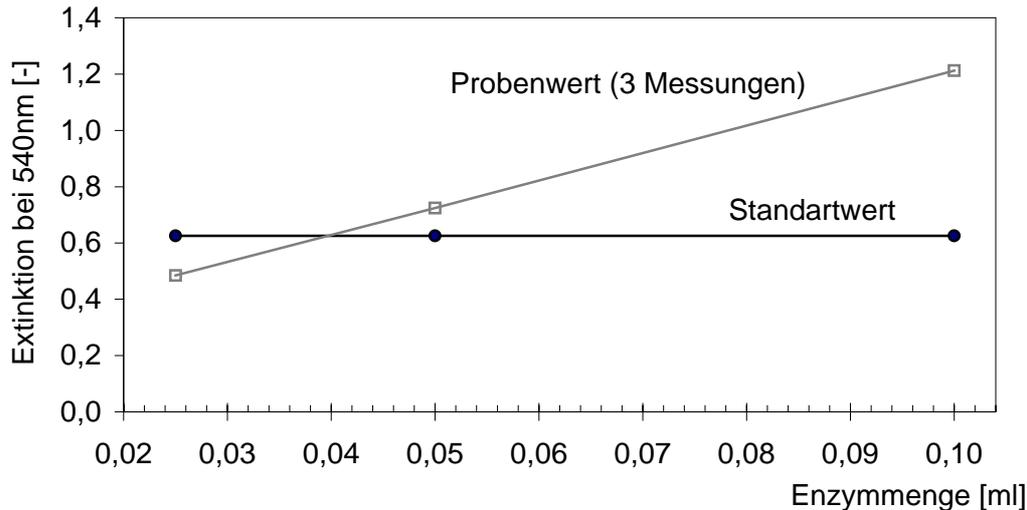
Mittels grafischer Darstellung werden die 3 Probenwerte gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Die Extinktion eines Wertes soll größer, die Extinktion eines zweiten Wertes kleiner als die Extinktion des Standardwertes sein (siehe Abbildung). Andernfalls ist die Enzymbestimmung mit einer geeigneten Vorverdünnung zu wiederholen.

Durch Interpolierung der Probenwerte wird der Schnittpunkt mit der Extinktion des Standardwertes und damit die notwendige Enzymmenge (die gerade 1,0 mg Xylose als red. Zucker freisetzt) ermittelt.

Die Berechnung der Xylanaseaktivität erfolgt mittels folgender Gleichung:

Xylanaseaktivität [IU/ml] =

$$\frac{3,33 [IU \text{ ml}^{-1}]}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}} \times \text{Enzymmenge [ml]} \times \text{Vorverdünnung} =$$
$$\frac{3,33 [IU \text{ ml}^{-1}] \times 0,1 [ml] \times \text{Vorverdünnung}}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}} = \frac{0,33 [IU] \times \text{Vorverdünnung}}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}}$$



**Abb. 4.2.2.-1: Extinktion zur Bestimmung der Xylanaseaktivität**

#### 4.2.3 Bestimmung der Cellulaseaktivität mittels Filterpapier (FPA - *filter paper assay*)

Durchführung nach Ghose et al. 1987: Vorverdünnung der Probe mit 0,05M Citratpuffer (pH=4,8); Erstellung zwei weiterer Verdünnungen aus dieser Probe (1:2,5 und 1:5); Vermischung von 0,5 ml Probe aus der jeweiligen Verdünnungsstufe mit 1,0 ml Citratpuffer; Zugabe von einem Filterpapierstreifen (1 cm x 6 cm), 60 min im 50 °C temperierten Wasserbad inkubieren, Reaktionsabbruch mit 3 ml DNS, 5 min kochen; Abkühlung; Zugabe von 10 ml dest. Wasser; Mischen; 10min Sedimentationsdauer der Cellulosefasern einhalten, photometrische Vermessung bei 540nm; in der Auswertung ist der Blindwert vom Messwert zu subtrahieren.

Nullwert: 1,5 ml Citratpuffer + 3,0 ml DNS

Blindwert: 0,5 ml Probe + 1,0 ml Citratpuffer + 3,0 ml DNS (ohne Filterpapierzugabe!)

Der Standardwert wird über 2,0 mg Glucose im Inkubationsansatz bestimmt und stellt die Extinktion dar die eine Enzymmenge mit einer Cellulaseaktivität von 0,37 IU/ml erreicht.

Mittels grafischer Darstellung werden die 3 Probenwerte gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Die Extinktion eines Wertes soll größer, die Extinktion eines zweiten Wertes kleiner als die Extinktion des Standardwertes sein (siehe Abbildung). Andernfalls ist die Enzymbestimmung mit einer geeigneten Vorverdünnung zu wiederholen.

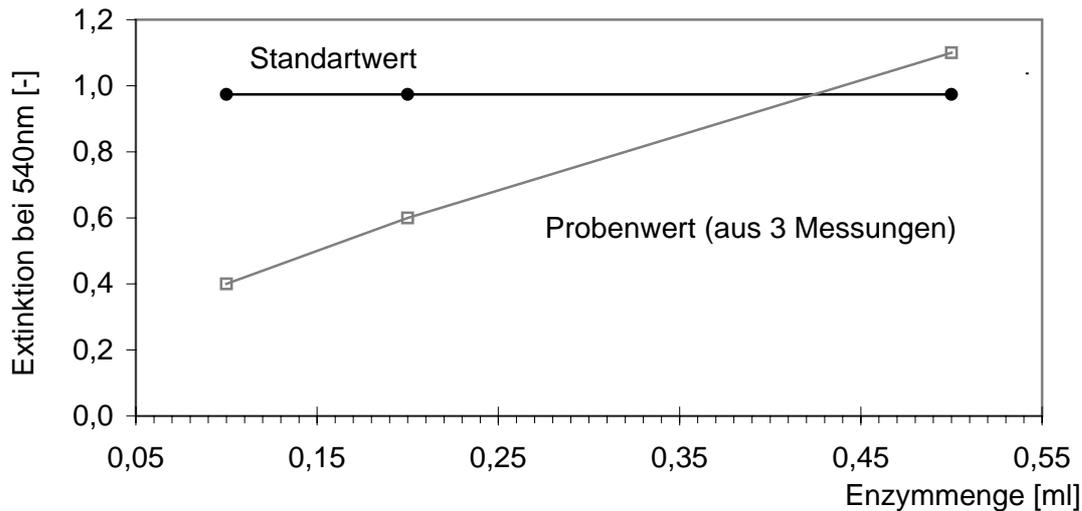
Durch Interpolierung der Probenwerte wird der Schnittpunkt mit der Extinktion des Standardwertes und damit die notwendige Enzymmenge (die gerade 2,0 mg Glucose als red. Zucker freisetzt) ermittelt.

Die Berechnung der Cellulaseaktivität erfolgt mittels folgender Gleichung:

Cellulaseaktivität [IU/ml] =

$$\frac{0,37 [IU \text{ ml}^{-1}]}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}} \times \text{Enzymmenge [ml]} \times \text{Vorverdünnung} =$$

$$\frac{0,37 [IU \text{ ml}^{-1}] \times 0,5 [ml] \times \text{Vorverdünnung}}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}} = \frac{0,185 [IU] \times \text{Vorverdünnung}}{\text{Abszissenwert des Schnittpunktes [ml]}}$$



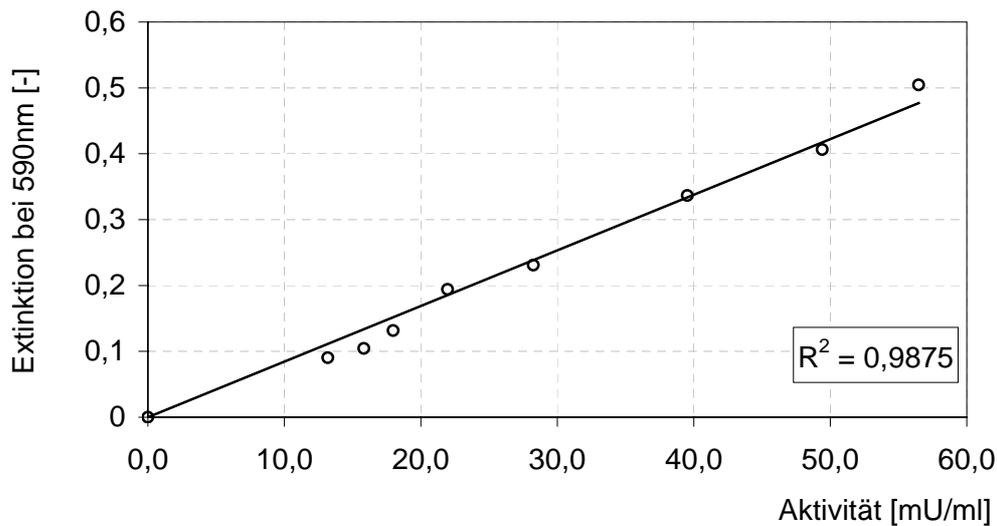
**Abb. 4.2.3-1: Extinktion zur Bestimmung von Cellulaseaktivität und FPA**

#### 4.2.4 Bestimmung der Aktivität der endo- $\beta$ -1,4-Glucanase mittels Azo-CMC

Durchführung nach Megazyme, S-ACMC 04/07: Vorverdünnung der Probe mit 0,1M Acetatpuffer; Vermischung von 0,3 ml Probe mit 0,3 ml der 4M AZO-CMC-Substratlösung (pH=4,5); für 10 min bei 40 °C im Wasserbad inkubieren; Reaktionsabbruch durch Zugabe von 1,5 ml Fällungsreagens; Gut durchmischen (vortexen); Überführung der Probe in Reaktionsgefäß unter Einhaltung von 10min Reaktionszeit bei Raumtemperatur; Zentrifugation bei 1000 g für 10 min; Vermessung des Überstandes bei 590 nm

Nullwert: zwei mal 0,3 ml Acetatpuffer + 0,3 ml Substratlösung + 1,5 ml Fällungsreagens

Für die Erstellung der Eichgerade muss ein bekannter CMC-Wert eines Enzyms zu Grunde gelegt werden. Dieser wurde nach der herkömmlichen Methode der CMC für endo- $\beta$ -1,4-Glucanase bestimmt. In diesem Fall war es das Enzym SIAB 03 – Tr. r. 18.2 mit einer Aktivität von 790,6 IU/ml.



**Abb. 4.2.4-1: Extinktion zur Bestimmung von Aktivität der endo- $\beta$ -1,4-Glucanase**

Die Berechnung der Aktivität der endo- $\beta$ -1,4-Glucanase erfolgt mittels folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität der endo-}\beta\text{-1,4-Glucanase [U/ml]} = \frac{\text{Extinktion}}{\text{Anstieg der Eichkurve}} \times \text{Verdünnung}$$

### 4.3 Enzymaktivitäten und Gesamtprotein der verwendeten Enzymsysteme

Für die Inkubation von Holzstoffen für die Papier und Dämmplattenherstellung wurden sowohl Enzymsysteme des SIAB als auch Industrieenzyme verschiedener Hersteller eingesetzt. Die Enzymaktivitäten und Proteingehalte der Enzymsysteme sind in folgender Tabelle aufgeführt.

**Tab. 4.3-1: eingesetzte Enzymkonzentrate (die kommerziell erhältlichen Enzyme sind grau unterlegt)**

|   | <b>Enzym</b> | <b>Proteingehalt<br/>in g/l</b> | <b>AZO CMC-<br/>Aktivität in<br/>U/ml ①</b> | <b>FPA in IU/ml<br/>①</b> | <b>Xylanase-<br/>aktivität in<br/>IU/ml ①</b> | <b>Laccase-<br/>aktivität in<br/>U/ml ①</b> |
|---|--------------|---------------------------------|---|---------------------------|---|---|
| 1 | SIAB I       | 277                             | 320   | 111                       | 20 813  | n.d.  |
| 2 | SIAB II      | 334                             | 356   | 121                       | 13 404  | n.d.  |
| 3 | SIAB III     | 263                             | 314   | 110                       | 917   | n.d.  |
| 4 | N 400        | 32                              | 45,5  | n.n.                      | 554   | n.d.  |
| 5 | C1           | 133                             | 38  | n.n.                      | 1026  | n.d.  |
| 6 | TX 200       | 19,9                            | 4,3   | 0,69.                     | 4757  | n.d.  |
| 7 | ECO-En       | 62                              | 6,3   | n.n.                      | 669   | n.d.  |
| 8 | AL 70        | 159                             | 128   | 50                        | 624   | n.d.  |
| 9 | LAC          | 31,27                           | n.d.  | n.d.                      | n.d.  | 3200  |

① Messungen unter Standardbedingungen (siehe Enzymbestimmungsmethoden)  
n.n. – Aktivität nicht messbar  
n.d. – Messung nicht durchgeführt

1. Enzymkonzentrat SIAB I, fermentiert auf Basis von Schlempe
2. Enzymkonzentrat SIAB II, fermentiert auf Basis von Schlempe
3. Enzymkonzentrat SIAB III, fermentiert auf Basis von Weizenkleie/Lactose
4. Cellulase ECOSTONE N 400; AB Enzymes, Finnland
5. Cellulase ECOSTONE C1; AB Enzymes, Finnland
6. Hemicellulase ECOPULP TX 200; AB Enzymes, Finnland
7. Cellulase ECOPULP ENERGY; AB Enzymes, Finnland
8. Cellulase Cellupract AL 70; Biopract, Berlin
9. Laccase NL 51003; Novo Nordisk A/S, Dänemark

Die Enzyme SIAB I – III, Ecostone C1, Ecopulp Energy und Cellupract AL 70 sind Konzentrate die vor allem aus sauren Cellulasen/Hemicellulasen bestehen. Das Präparat N 400 stellt eine neutrale Cellulase dar, TX 200 beinhaltet eine thermostabile Xylanase und LAC ist ein Laccasepräparat:

### 4.3.1 Untersuchungen zur Temperaturstabilität und der pH-Toleranz ausgewählter Enzyme

Die in technischen Prozessen der Papier- und Dämmplattenherstellung auftretenden erhöhten Temperaturen sowie pH-Werte im Neutralbereich machen es erforderlich, die eingesetzten Enzyme bezüglich ihrer Temperaturstabilität und pH-Toleranz zu untersuchen.

Die Enzymaktivitäten des Stammes *Trichoderma reesei* M18.2 sind erwartungsgemäß bei dem pH-Wert 7 niedriger als unter Standardbedingungen (Tab. 4.3.1-1). Auffällig ist zum einen das starke Absinken der Endoglucanaseaktivität auf ~1 % der ursprünglichen Aktivität, was sich aber auf die gesamtcellulolytische Aktivität (FPA) nicht in dem Maße auswirkt, da diese bei 16 % Restaktivität verbleibt. Zum anderen scheint die Xylanaseaktivität, insbesondere der Präparate SIAB I und SIAB II, relativ unempfindlich gegenüber dem neutralen pH-Wert zu sein. Im Gegensatz zu SIAB III, einem Konzentrat welches durch Fermentation bei einem pH-Wert von 3,5 gewonnen wurde, sind die entsprechenden Fermentationen der beiden erstgenannten Enzympräparate bei pH 5 durchgeführt worden. Die bei dieser Art Fermentation induzierten Xylanasen sind somit für Arbeiten bei pH-Werten im Neutralbereich besser geeignet.

**Tabelle 4.3.1-1** Vergleich der Aktivitäten der *T. reesei*-Enzymkomplexe bei den pH-Werten 4,8 und 7,0

| Enzym    | AZO CMC-Aktivität in U/ml <sup>①</sup><br>pH 4,8 | AZO CMC-Aktivität in U/ml <sup>②</sup><br>pH 7 | FPA in IU/ml <sup>①</sup><br>pH 4,8 | FPA in IU/ml <sup>②</sup><br>pH 7 | Xylanaseaktivität in IU/ml <sup>①</sup><br>pH 4,8 | Xylanaseaktivität in IU/ml <sup>②</sup><br>pH 7 |
|----------|--|--|-------------------------------------|-----------------------------------|---|---|
| SIAB I   | 320  | 4,5 (1,4%)                                     | 111                                 | 17,7 (16%)                        | 20 813  | 12 890 (62%)                                    |
| SIAB II  | 356  | 4,8 (1,3%)                                     | 121                                 | 23,1 (19%)                        | 13 404  | 10 406 (78%)                                    |
| SIAB III | 314  | 2,9 (1%)                                       | 110                                 | 17,5 (16%)                        | 917   | 290 (32%)                                       |

① - Messung bei Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.2)

② - Messung bei Standardbedingungen unter Verwendung eines Phosphatpuffers mit dem pH-Wert 7; in Klammern ist die „Restaktivität“ (im Vergleich zu den Aktivitäten im sauren pH-Wert-Bereich angegeben)

Von den kommerziellen Enzymen wurden die beiden in den Upscalingversuchen zur Dämmplatten- und Papierherstellung (Kap. 6.1.2.6 & Kap. 6.2.6) eingesetzten Enzyme Ecopulp TX 200 und Ecopulp Energy genauer untersucht. Das Präparat Ecopulp TX 200 enthält geringe Mengen cellulolytischer Enzyme, die vor allem im sauren Milieu aktiv sind (Tab. 4.3.1-2). Die

nachgewiesene Xylanaseaktivität ist bei pH 7 etwas höher als bei pH 4,8. Auf fast das 3-fache erhöht sich diese Aktivität bei 70 °C. Ecopulp Energy, ein Enzympräparat mit relativ niedrigen cellulolytischen sowie xylanolytischen Aktivitäten, ist bevorzugt zum Einsatz unter sauren Bedingungen geeignet.

**Tabelle 4.3.1-2** Vergleich der Aktivitäten der Enzymkomplexe *Ecopulp Energy* und *Ecopulp TX 200* bei den pH-Werten 4,8 und 7,0 sowie bei 50°C und 70°C

| Enzym                     | AZO CMC-<br>Aktivität in<br>U/ml <sup>⊙</sup><br>pH 4,8 | AZO CMC-<br>Aktivität in<br>U/ml <sup>⊙</sup><br>pH 7 | AZO CMC-<br>Aktivität in<br>U/ml <sup>⊚</sup><br>pH 4,8 & 70°C | FPA in<br>IU/ml <sup>⊙</sup><br>pH 4,8 | FPA in<br>IU/ml <sup>⊚</sup><br>pH 7 | Xylanase-<br>aktivität in<br>IU/ml <sup>⊙</sup><br>pH 4,8 | Xylanase-<br>aktivität in<br>IU/ml <sup>⊚</sup><br>pH 7 | Xylanase-<br>aktivität in<br>IU/ml <sup>⊚</sup><br>pH 4,8 & 70°C | Xylanase-<br>aktivität in<br>IU/ml <sup>⊙</sup><br>pH 7 & 70°C |
|---------------------------|---|---|--|--|--------------------------------------|---|---|--|--|
| <i>Ecopulp<br/>TX 200</i> | 2,6   | 0,03<br>(1%)  | n.d.   | 0,76                                   | n.n.                                 | 4 275   | 5 211<br>(122%)   | n.d.   | 11 700<br>(274%)   |
| <i>Ecopulp<br/>Energy</i> | 6,3   | 0,03<br>(0,05%)                                       | 3,8<br>(60%)   | n.n.                                   | n.n.                                 | 670   | 280<br>(42%)  | 254<br>(38%)   | n.d.   |

n.n. – Aktivität nicht messbar, n.d. – Messung nicht durchgeführt

⊙ - Messung bei Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.2)

⊚ - Messung bei Standardbedingungen unter Verwendung eines Phosphatpuffers mit dem pH-Wert 7; in Klammern ist die Aktivität im Vergleich zu der jeweiligen Aktivität im sauren pH-Wert-Bereich angegeben

⊚ - Messung nach Standardmethode jedoch bei 70°C statt 40°C bzw. 50°C; in Klammern ist die Aktivität im Vergleich zu der jeweiligen Aktivität im sauren pH-Wert-Bereich angegeben

⊚ - Messung nach Standardmethode unter Verwendung eines Phosphatpuffers mit dem pH-Wert 7 sowie bei 70°C; in Klammern ist die Aktivität im Vergleich zu der jeweiligen Aktivität im sauren pH-Wert-Bereich angegeben.

### 4.3.2 Untersuchungen zur Adsorption der Enzyme am Substrat

Ein wesentliches Charakteristikum eines Enzyms für dessen Abbauleistung ist seine Fähigkeit, an das Substrat (bei unlöslichen Substraten) zu binden. Die Adsorption der Enzyme am (unlöslichen) Lignocellulose-Substrat ist für den Beginn der enzymatischen Reaktion eine unabdingbare Voraussetzung. An Hand orientierender Adsorptionsuntersuchungen sollten Erkenntnisse zu den Adsorptionseigenschaften der fermentierten *T. reesei*-Enzyme am Lignocellulose-Substrat gewonnen werden.

Es wurde ein auf Basis von Dünnschlempe fermentierter Enzymkomplex mit einem erhöhten Anteil an Xylanase untersucht. Die Adsorption wurde bei 25°C und 50°C im Bereich von 5 Minuten und 30 Minuten bestimmt. Bei einem Überschuss an Substrat (30 g TS/L) wurde nach der Inkubation die verbliebene Aktivität im Überstand gemessen, um aus der Differenz zwischen der Enzymaktivität vor und nach der Inkubation auf den sorbierten Anteil schließen zu können. Als Substrat diente Steico-Faserstoff im Vergleich mit mikrokristalliner Cellulose.

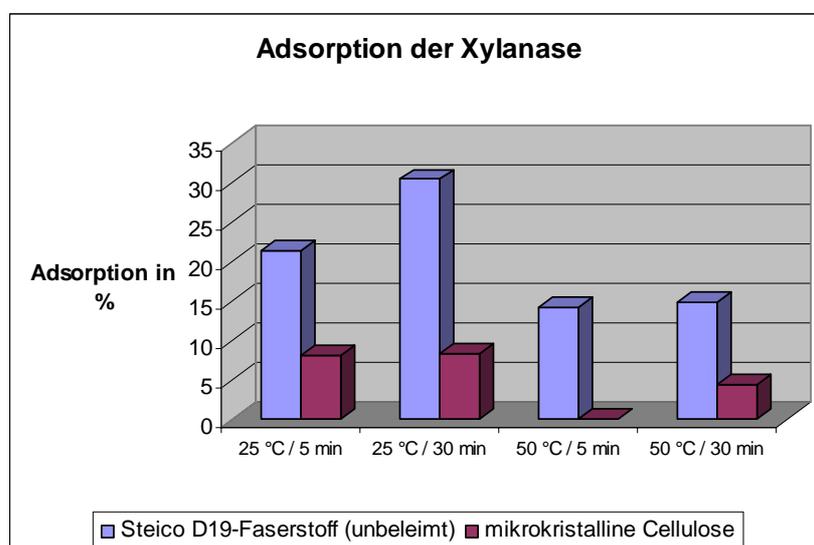
Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.2-1 dargestellt. Die Xylanase bindet sehr schlecht an die mikrokristalline Cellulose, wobei eine maximale Adsorption von rund 8% bei einer Inkubationstemperatur von 25°C erreicht wird. Bei höheren Temperaturen kommt es erst nach längerer Inkubationszeit zur Bindung an die Cellulose. Dies ist zu erwarten, da die Xylanase kein cellulosespaltendes Enzym ist und somit auch fast keine Bindung mit MKC eingeht. Die Adsorption

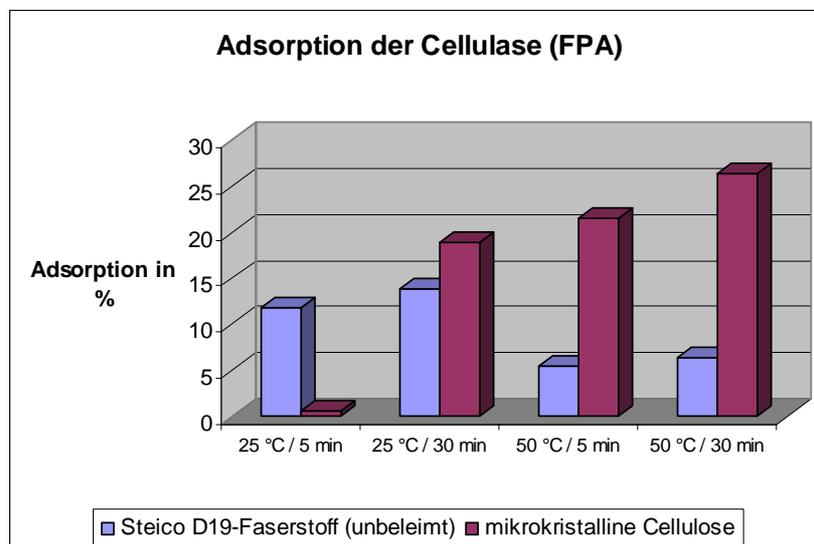
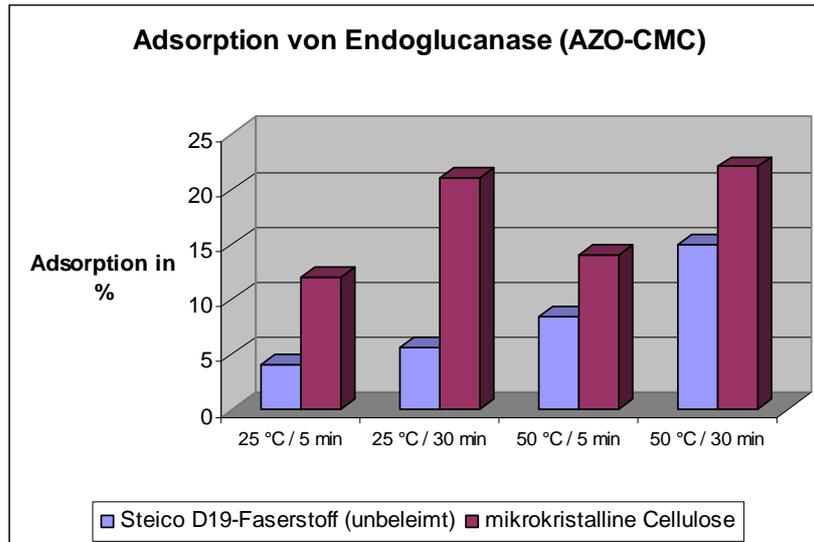
an den Faserstoff hingegen ist wesentlich höher, insbesondere bei niedrigeren Temperaturen, wo bis zu 31% des Enzyms an das Substrat gebunden werden. Höhere Temperaturen, wie in diesem Fall 50°C, führen allerdings auch hier zu einem verschlechtertem Adsorptionsvermögen.

Beim Adsorptionsverhalten der Endoglucanase ist zu erkennen, dass diese wesentlich besser an die Cellulose bindet als an den Faserstoff. Dies lässt sich damit erklären, dass die Endoglucanase ein cellulosespaltendes Enzym ist und daher eine große Affinität zu Cellulose besitzt. Auffällig ist weiterhin, dass das Adsorptionsvermögen vor allem bei längerer Inkubation höher ausfällt. Die Inkubationstemperatur scheint allerdings nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da fast die gleichen Werte bei unterschiedlichen Temperaturen aber gleichen Zeiten gemessen wurden. Des Weiteren ist erkennbar, dass die Endoglucanase besonders bei höheren Temperaturen an den Faserstoff bindet.

Die Inkubation der Cellulase (als FPA) führt zur stärksten Adsorption des Enzyms an MKC. Auch ist erkennbar, dass die Adsorption mit längerer Inkubation und höheren Temperaturen zunimmt. Ebenso ist eine rund 14%-ige Bindung der Cellulase an den Faserstoff bei einer Inkubationstemperatur von 25°C zu verzeichnen. Dies sind offenbar die Cellulose-Bindungsstellen des Faserstoffes.

Die hier gewonnenen Ergebnisse decken sich in der Grundtendenz mit früheren Untersuchungen zur Adsorption der Enzyme an verschiedenen Cellulose- und Lignocellulose-Substraten (Koenig, et al., 2003). Dort wurde gefunden, dass insbesondere Cellulasen mit höherer spezifischer Aktivität auch stark an Lignocellulose-Substrate binden und möglicherweise die Oberfläche für die Sorption von Hemicellulasen „blockieren“. Generell kommt dem Sorptionsverhalten der verschiedenen Enzymkomponenten an die Lignocellulose-Substratoberfläche für deren Wirkung große Bedeutung zu, so dass die gemessenen Enzymaktivitäten noch kein hinreichendes Kriterium für die Abbauleistung darstellen.





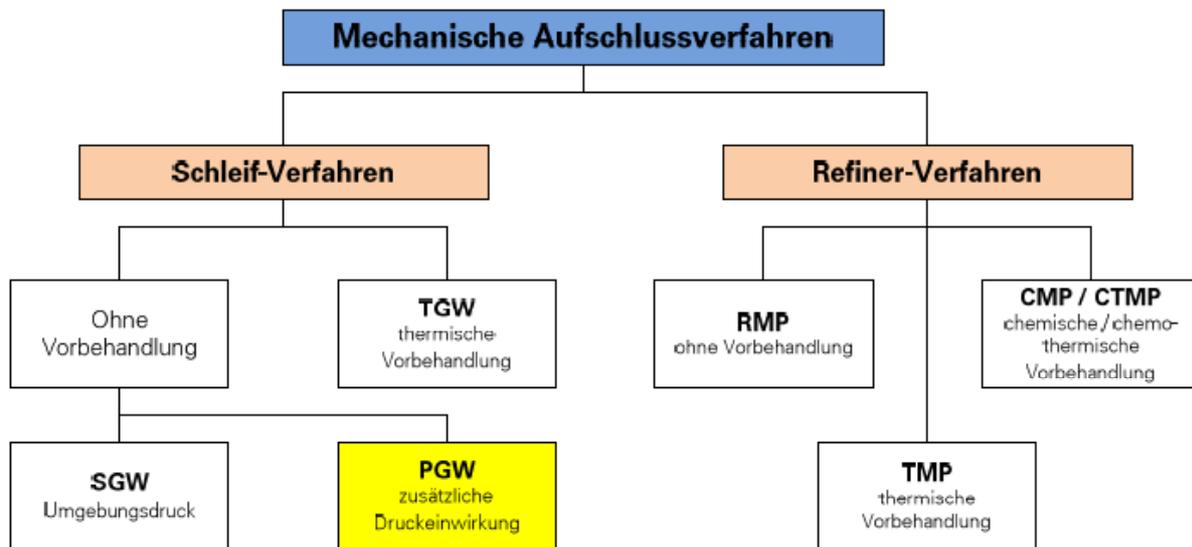
**Abb. 4.3.2-1:** Adsorption von Enzymkomponenten an TMP und MKC

## 5 Holzstofferzeugung für die Papierherstellung unter Einsatz von Enzymen

### 5.1 Holzstoffaufschlussverfahren im Überblick

Mit Holzstoff werden alle Faserstoffe bezeichnet, deren Einzelfasern mechanisch aus dem verholzten Faserverbund gelöst werden. Sie werden auch „Hochausbeutestoffe“ genannt, da bei der Zerkleinerung mit einer Ausbeute von 95–98 % mehr Substanz erhalten bleibt als bei chemischen Aufbereitungsprozessen. Nach dem Herstellungsverfahren werden mechanisch zerkleinerte Holzstoffe in Schleiferstoffe (Steinschliff oder Stone groundwood; Druckschliff oder Pressure groundwood) und Refinerstoffe (Refinerstoff oder Refiner mechanical Pulp; Refinerstoff mit thermischer Vorbehandlung oder Thermo mechanical Pulp) unterschieden. Durch

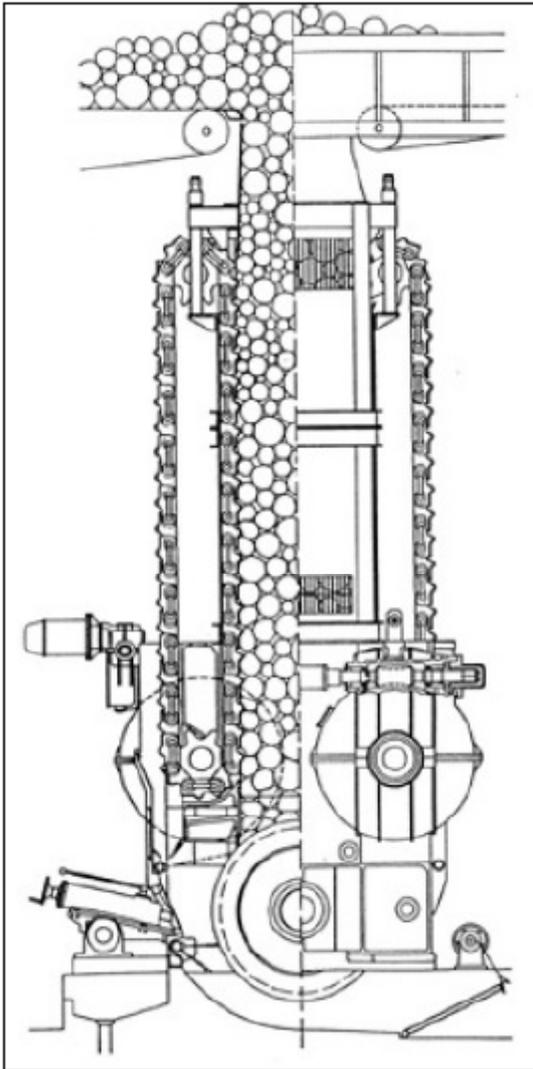
höhere Temperaturen und chemische Vorbehandlung können Holzstoffe mit verbesserten Eigenschaften erzeugt werden.



**Abb. 5.1-1: Mechanische Holzaufschlussverfahren (Blechschildt, J. et al. 2006)**

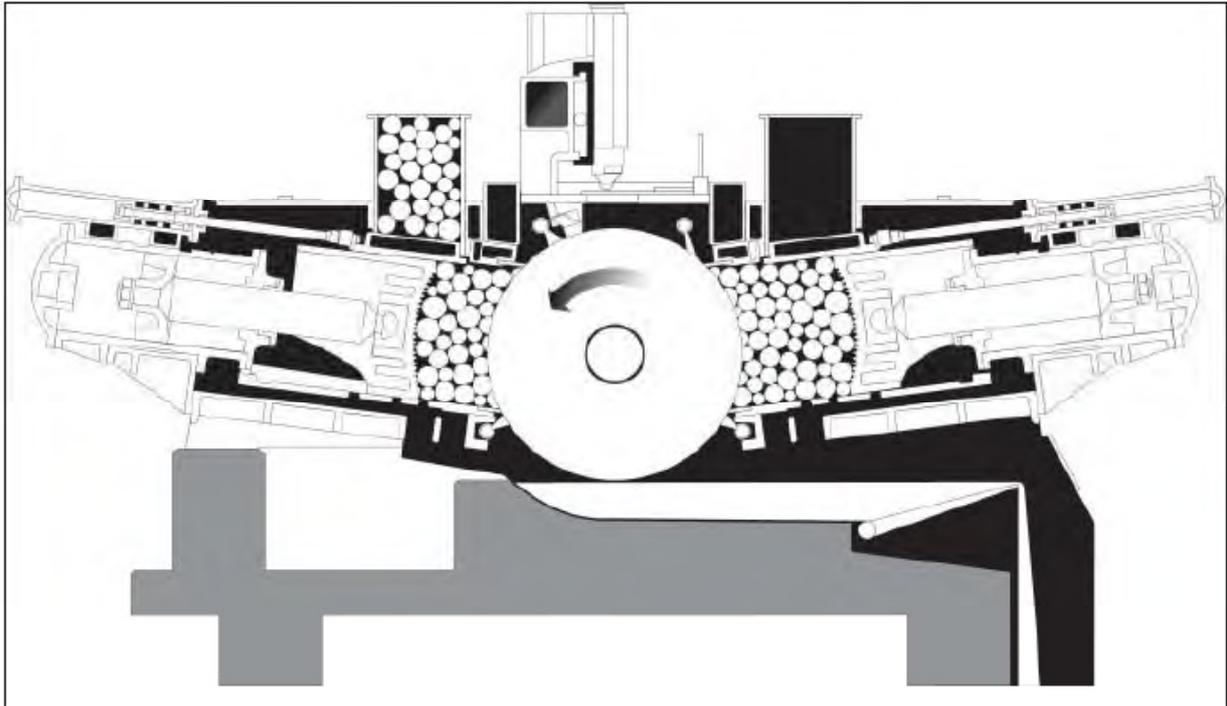
Beim Schleifverfahren werden 1–2 m lange entrindete Rundholzstämmchen mit einem bestimmten Druck gegen den rotierenden Schleifstein gepresst. Unter Wasserzusatz entstehen in der unmittelbaren Schleifzone Temperaturen von 110–130 °C, die zu einer Erweichung der Holzsubstanz Lignin führen. Druckwechselbeanspruchungen von 4.000–12.000 Hz führen zu einer Verformung des Faserverbandes und zum Herauslösen von Einzelfasern, Faserbündeln und Faserbruchstücke aus dem Faserverband. Beim Passieren der Schleifzone erfolgt eine weitere Zerkleinerung und Fibrillierung. Die dabei eintretenden Wirkungen werden im starken Maße von der Gestalt der Steinoberfläche geprägt. Entscheidend für die Holzschliffqualität sind Körnung und Schärfe des Schleifsteines. Die Steinoberfläche des Schleifsteines aus Zement oder Keramik wird mit Hilfe einer traversierenden Schärfeinrichtung in Intervallen von 3–6 Tagen bearbeitet. Dabei kann die Laufzeit eines Schleifsteins bis zu 8 Jahren betragen. Für feineren Holzschliff benötigt man feinkörnige Steine mit eher stumpfer Schärfe bei einem Energieaufwand von 1.400 kWh/t. Für röscheren Schliff hält man die Steinoberfläche rauer und belastet nicht über 1.100 kWh/t.

Die am weitesten verbreiteten Schleifertypen sind der Kettenschleifer und der Magazinschleifer. Kettenschleifer zeichnen sich durch eine hohe Zuverlässigkeit und Wartungsfreundlichkeit aus. Aufgrund drohender Instabilität sind sie bezüglich der eingesetzten Antriebsleistung jedoch begrenzt (maximal 4.000 kW). Seit den 1980er Jahren wurden keine Kettenschleifer mehr an die Industrie ausgeliefert.



**Abb. 5.1-2: Kettenschleifer der Firma Voith (Limatainen, H. et al. 1999)**

Gegenüber dem Magazinschleifer, der etwa 40 % der Außenbereiche der Schleifsteinoberfläche effektiv für die Holzbehandlung nutzt, sind es beim Kettenschleifer nur 20 %. Auch das Optimierungspotenzial ist gegenüber Magazinschleifern geringer. Ein weiterer Nachteil ist die maximale Länge der Holzprügel von 1,3 m. Im Vergleich zum Kettenschleifer oder Stetigschleifer werden Magazinschleifer chargenweise betrieben.



**Abb. 5.1-3: Magazinschleifer der Firma Valmet (Limatainen, H. et al. 1999)**

In den 1970er und 1980er Jahren wurde die Holzschlifferzeugung im Magazinschleifer dahingehend verändert, dass durch Einbringen von Druckluft in das Holzmagazin zusätzlicher Druck aufgebaut wurde. Durch erhöhten Druck und hohe Temperaturen sollte ein Holzschliff mit besseren Festigkeitseigenschaften und einem größeren Langfaseranteil erzeugt werden. Der herkömmliche Magazinschleifer wurde entsprechend modifiziert. So verfügt der Druckschleifer unter anderem über eine Druckausgleichskammer im Holzbeschickungsschacht. Durch eine Druckerhöhung mithilfe von Druckluft wird der Siedepunkt des eingesetzten Spritzwassers am Stein angehoben. Der hohe Druck und die damit einsetzbaren höheren Temperaturen des Spritzwassers und am Stein ermöglichen eine effizientere und schonendere Defibrillierung der Holzfasern, da das Lignin bei höheren Temperaturen besser plastifiziert. Das Resultat ist ein Holzschliff mit verbesserten Festigkeitseigenschaften und größerer Langfaserfraktion. Von Nachteil sind jedoch Einbußen beim Weißgrad um 2 bis 3 %-Punkte. Beim Druckschleifverfahren unterscheidet man zwischen PGW (pressure groundwood – 250 kPa Druck, Spritzwassertemperatur unter 100 °C) und PGW-S (super pressure groundwood – 450 kPa Druck, Spritzwassertemperatur bis 140 °C).

Der Zusammenhang zwischen Wassersiedepunkt, Spritzwassertemperatur und appliziertem Druck wird in der folgenden Abbildung deutlich. Mit zunehmendem Druck verschiebt sich der Wassersiedepunkt. Die Zahl hinter der üblichen Abkürzung für das Schleifverfahren steht für die Temperatur des eingesetzten Spritzwassers.

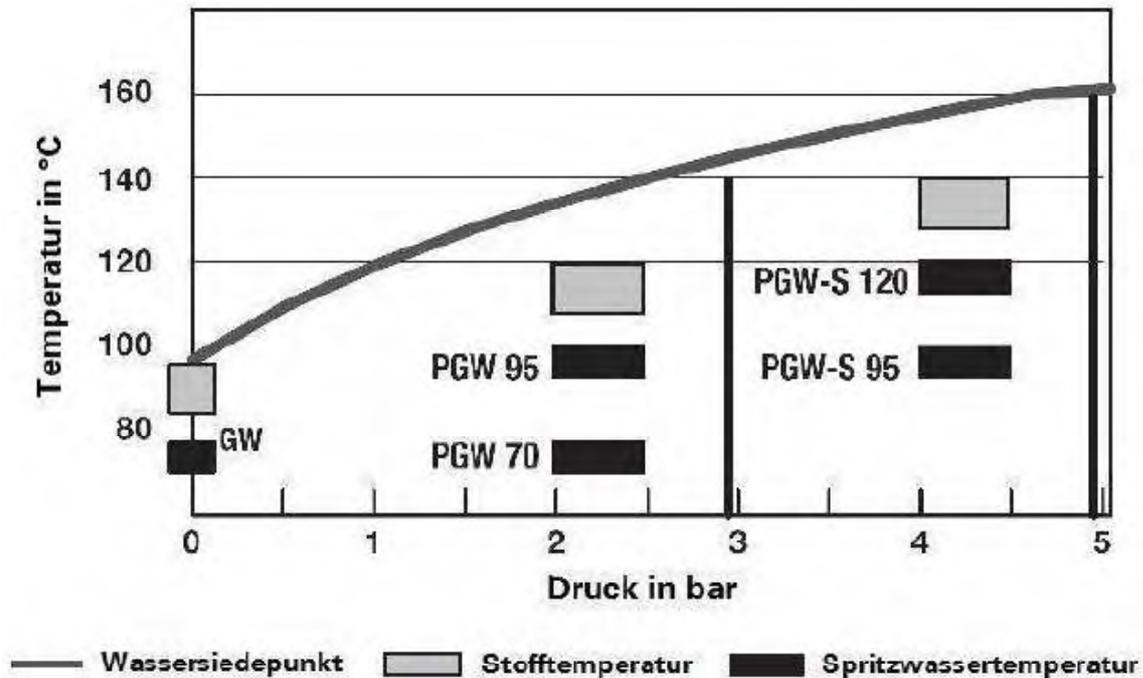


Abb. 5.1-4: Prozessbedingungen der verschiedenen Schleifverfahren (Limatainen, H. et al. 1999)

Der Druckschleifprozess läuft über Druckschleifer, Hammermühle, Ausblaszyklon, Drucksortierer und Eindicker ab. Der in der Hammermühle zerkleinerte Grobstoff wird noch einer Nachmahlung unterzogen.

Das Refinerverfahren geht auf das von Asplund für die Faserplattenherstellung entwickelte Defibratorverfahren zurück. Dabei kommen Hackschnitzel zum Einsatz. Neben Industrieholz können so auch Sägewerksabfälle verarbeitet werden.

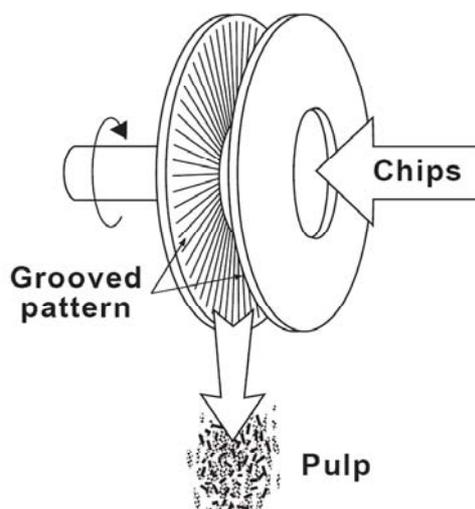


Abb. 5.1-5: Prinzip des Refinerverfahrens (Tienvier, T. et al. 1999)

Die Hackschnitzel werden in das Zentrum des Refiners zwischen die Mahlscheiben befördert, in der Aufbrechzone zerkleinert und durch Zentrifugalkräfte von innen nach außen durch die Mahlzone gefördert. Auf den Mahlscheiben sind verschieden profilierte Mahlsegmente aus hochfesten Stahl aufgeschraubt. Die Mahlscheiben haben Standzeiten von 20–50 Tagen. Das Anpressen der Scheiben erfolgt hydraulisch. Dabei beeinflussen der Durchsatz und die Leistungsaufnahme die Qualität des Refiner-Holzstoffes. Der Energieaufwand beim Refinerverfahren ist um 50–70 % höher als beim Schleifprozess. Die optimale Stoffdichte liegt bei 25 %. In der Papierindustrie wird die Zerfaserung in mind. 2 Stufen durchgeführt, wobei die Refiner der 1. Stufe ca. 60 % der Last aufnehmen. Eine thermische Vorbehandlung bei höheren Temperaturen (1–3 min bei 110–140 °C und 1–3 bar) ermöglicht eine schonendere Zerfaserung und führt zu verbesserten Festigkeitseigenschaften. Der Weißgrad liegt dagegen um 3–4 Punkte niedriger.

Die folgende Abbildung verdeutlicht noch einmal das Festigkeitspotenzial der verschiedenen Holzstoffaufschlussverfahren. Bei einem vergleichbaren spezifischen Energieeinsatz (SEC – specific energy consumption) zeigt PGW die höchsten Festigkeiten. Die Festigkeiten des TGW liegen zwischen SGW und PGW. Interessant ist hier der Vergleich mit TMP (thermo mechanical pulp). Das TMP-Verfahren als Refinerverfahren benötigt zwar deutlich mehr Energie, der resultierende Faserstoff verfügt jedoch über ein deutlich höheres Festigkeitspotenzial. Dagegen besitzen die nach dem Schleifverfahren hergestellten Holzstoffe wegen des erhöhten Feinstoffanteils bessere Oberflächeneigenschaften als die Refinerholzstoffe.

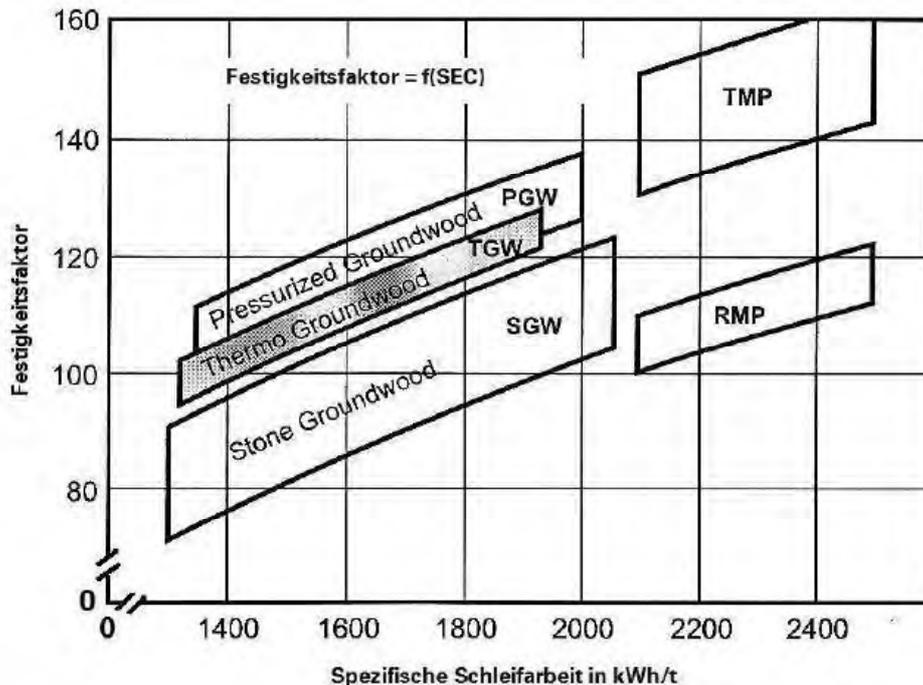


Abb. 5.1-6: Festigkeitseigenschaften in Abhängigkeit vom spezifischen Energieaufwand (Limatainen, H. et al. 1999)

## 5.2 Material und Methoden für die Papierherstellung

### 5.2.1 Auswahl der Holzstoffe

Bei den Untersuchungen für dieses Forschungsprojekt kamen industrielle Holzstoffe und im halbertechnischen Maßstab hergestellter TMP zum Einsatz:

**UPM-TMP:** Industriell hergestellter TMP nach der 2. Refiner-Stufe im UPM-Werk Schongau entnommen und für die Laboruntersuchungen zwischentrocknet;

**TUD-TMP:** TMP hergestellt aus Fichtenholz-Hackschnitzeln (Werk Schongau) in der Labor-CTMP-Anlage Typ (Sprout-Bauer) im Technikum des IHP ohne Zwischentrocknung für Laboruntersuchungen am Lehrstuhl für Papiertechnik

**UPM-SGW:** feuchter Holzschliff SGW aus dem UPM-Werk Augsburg nach der Doppelsieb- presse entnommen für Laborversuchen am IHP (nicht zwischentrocknet);

**MW-PGW:** feuchter Druckschliff PGW aus der Papierfabrik Mochenwangen vom Band- druckfilter vor der Bleiche entnommen für Laborversuchen am IHP (nicht zwischentrocknet);

**PGW-Grob:** PGW-Grobstoff (ca. 20 % TG) aus der Papierfabrik Mochenwangen vor der Nachmahlung entnommen und (ohne Zwischentrocknung) mit Laborscheibenre- finer (Typ D der Fa. DEFIBRATOR, Schweden) an der Professur für Papier- technik nachgemahlen.

## 5.2.2 Auswahl der Enzyme

Für die Inkubationsversuche an Holzstoffen wurden sowohl vom Projektpartner SIAB entwickelte Enzymkomplexe als auch handelsübliche Industrieenzyme ausgewählt. Art bzw. Gewinnung und Eigenschaften der Enzyme sind in Abschnitt 4.3 erläutert.

## 5.2.3 Laboruntersuchungen zur Bestimmung optimaler Enzymzugabemengen und Variation der Inkubationszeiten

Bei den ersten Untersuchungen wurde eine Verfahrensweise zur Enzymbehandlung von Holzstoffen im Labormaßstab entwickelt. Dabei kamen UPM-TMP, der zur Lagerung zwischengetrocknet wurde (TG 92 %) und feuchter Steinschliff (UPM-SGW) zum Einsatz. Zur Ermittlung der optimalen Einsatzbedingungen (Enzymzugabemengen, Inkubationszeiten, pH-Wert, Temperatur, Stoffdichte) wurden die Industrieenzyme Cellulase ECOSTONE N 400 von AB Enzymes (Finnland) und Laccase NL 51003 von Novo Nordisk A/S (Dänemark) verwendet.

In der folgenden Abbildung ist der Versuchsablauf der Untersuchungen dargestellt.

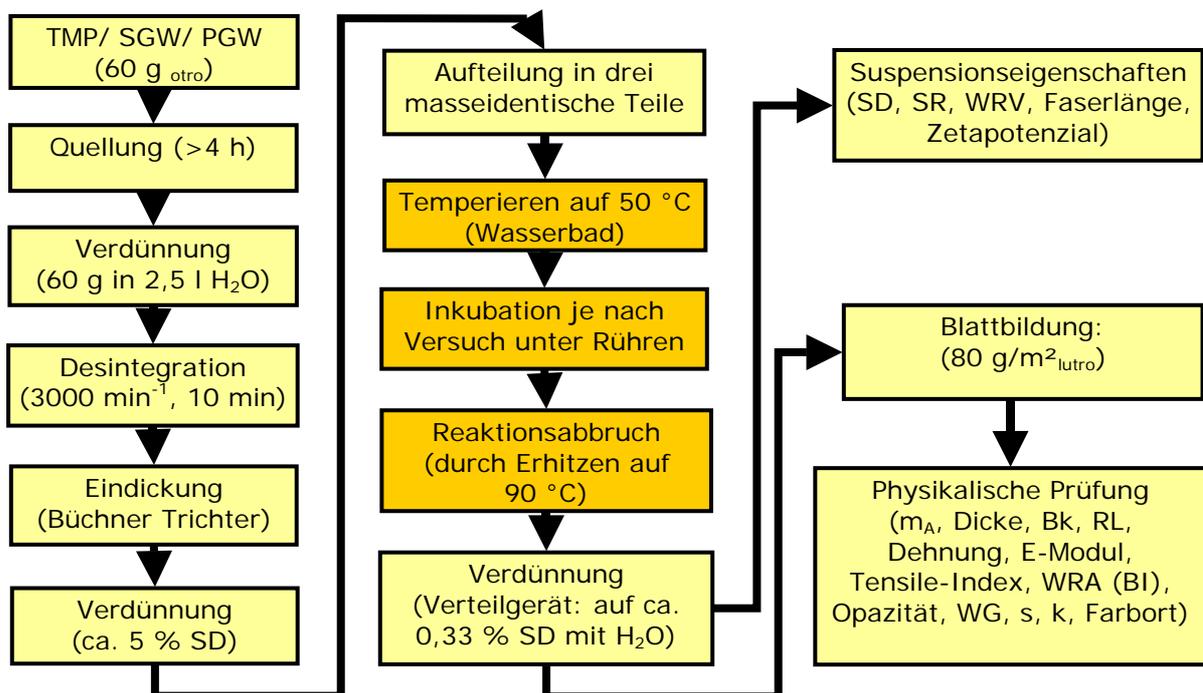


Abb. 5.2.3-1: Versuchsablauf zur Ermittlung optimaler Einsatzbedingungen

Die Quellung des TMPs erfolgte in der Regel über Nacht, bevor mittels eines Standard-Aufschlaggerätes nach Norm DIN EN ISO 5263-2 aufgeschlagen wurde (50 g otro in 2,5 Liter Leitungswasser). Anschließend wurde die Suspension zur Einstellung der für die Inkubation vorgegebenen Stoffdichte von 5 % über einen Büchner-Trichter entwässert. Um alle erforderli-

chen Suspensions- und Faserstoffprüfungen durchführen zu können, wurde eine Probengröße von 20 g otro gewählt. Daher ist die aufgeschlagene Stoffmenge von 60 g otro in drei masseidentische Teile geteilt und in 800 ml Bechergläser überführt worden, wo die pH-Wert-Einstellung erfolgte.

Um während der Inkubation eine optimale Durchmischung sicherzustellen, war der Einsatz von Rührern unumgänglich. Vorhandene Laborrührer wie Propeller-, Turbinen- und Blattrührer ergaben aufgrund der hohen Suspensionsstoffdichte von 5 % jedoch unzureichende Ergebnisse. Letztendlich wurde ein Rührer der Firma Inotec für viskose Medien eingesetzt, der bei niedriger Drehzahl (je nach Motor 100 bis 150 U/min) und geringem Lufteinzug eine ausreichende Durchmischung erzielte. Die vorhandenen Hohlräume des Rührers wurden mit Hartgummistopfen ausgefüllt, da der Faserstoff zum Verstopfen der Löcher neigte. Die Bechergläser mit den Proben wurden in einem Wasserbad unter ständigem Rühren auf 50 °C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur erfolgte die Enzymdosierung.

Nach Ende der Inkubationszeit erwies sich eine Inaktivierung des Enzyms als notwendig, da die behandelten Proben oftmals nicht sofort weiterverarbeitet werden konnten. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 10 wie für die Inaktivierung der Cellulase vom Hersteller empfohlen, hatte jedoch auf den Weißgrad der später gebildeten Prüfblätter einen negativen Einfluss (2 % geringerer Weißgrad, Vergilbung). Deshalb erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhöhung der Temperatur der behandelten Suspension auf 90 °C für 10 Minuten. Die Weißgradminderung lag dabei bei maximal 1 %-Punkt. Zunächst erfolgte dabei eine Wäsche über einen Büchner-Trichter (Filtermedium: engmaschiges Sieb) mit einem Liter Wasser inklusive erneuter Filterung des ersten Filtrats (Abkürzung: „mS“ = mit Spülen). Der gebildete Filterkuchen wurde anschließend in nahezu kochendes Wasser (etwa ein Liter) überführt und für 10 Minuten bei einer Temperatur von 90 °C gehalten (Abkürzung „mE“ = mit Erhitzen). Im Anschluss an die Inaktivierung des Enzyms wurde der behandelte TMP zur weiteren Verarbeitung in ein Verteilgerät überführt bzw. für eine anschließende Mahlung in der Jokro-Mühle vorbereitet.

Bei UPM-TMP erfolgte nach der Faserinkubation eine Nachmahlung in der Jokro-Mühle (DIN 54360). In wenigen Fällen wurde der Faserstoff auch vor der Inkubation gemahlen. Abweichend von der Norm wurden 20 g otro pro Mahlbüchse eingesetzt. Die Mahldauer betrug 10 Minuten bei 150 U/min. Im Anschluss an die Mahlung wurde der TMP im Standard-Aufschlaggerät aufgeschlagen, bevor er weiterverarbeitet wurde.

Die Ermittlung der Referenzeigenschaften des TMPs geschah analog zum „Verfahren zur Enzymbehandlung“, jedoch ohne Enzymeinsatz. Es wurden Referenzpunkte ohne Erhitzen („oE“), mit Erhitzen auf 90 °C („mE“) sowie mit und ohne Mahlung („mM“; „oM“) bestimmt. Auf eine Verweildauer entsprechend der Inkubationszeit im Wasserbad bei 50 °C wurde verzichtet.

Die folgenden Tabellen zeigen im Überblick die durchgeführten Versuche mit UPM-TMP und den Enzymen Ecostone N 400 sowie Laccase NL 51003.

**Tab. 5.2.3-1: Übersicht zu den durchgeführten Enzymbehandlungen mit Ecostone N 400**

| Cellulase | keine Mahlung    |                   |
|-----------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|           | Mahlung vor Ink. | Mahlung nach Ink. |
|           | 5'               |                   | 10'              |                   | 20'              |                   | 30'              |                   | 60'              |                   | 120'             |                   | 150'             |                   | 180'             |                   | 210'             |                   |
| 0,1%      |                  |                   |                  | X                 |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |
| 0,5%      |                  |                   | X                |                   |                  | X                 |                  |                   | X                | X                 |                  |                   | X                |                   |                  |                   | X                |                   |
| 1%        |                  | X                 | X                | X                 |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 2%        |                  | X                 | X                | X                 |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 5%        |                  |                   | X                | X                 |                  |                   |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 10%       |                  |                   | X                | X                 |                  |                   |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 20%       |                  |                   | X                | X                 |                  |                   |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |

Stoffdichte: 5% (Abweichung bei Zeichen "O": auch mit 3%)  
 pH-Wert: 7  
 Temperatur: 50°C  
 = mit diesen Einstellungen Abtötungsversuche durchgeführt

**Tab. 5.2.3-2: Übersicht zu den durchgeführten Enzymbehandlungen mit Laccase**

| Laccase | keine Mahlung    |                   |
|---------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|         | Mahlung vor Ink. | Mahlung nach Ink. |
|         | 5'               |                   | 10'              |                   | 20'              |                   | 30'              |                   | 60'              |                   | 120'             |                   | 150'             |                   | 180'             |                   | 210'             |                   |
| 0,5%    |                  | X                 |                  | X                 |                  | X                 |                  | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 1%      |                  |                   | S                | X                 |                  |                   | S                | X                 | SG               | X                 | X                | G                 | X                |                   | G                |                   |                  |                   |
| 2%      |                  |                   | X                | X                 |                  |                   | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 5%      |                  |                   | X                | X                 |                  |                   | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 | X                | X                 |
| 10%     |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |
| 20%     |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |                  |                   |

Stoffdichte: 5% (Abweichung bei : auch mit 3% Stoffdichte)  
 pH-Wert: 4,5 (Abweichung bei Zeichen "S": auch pH 5,5)  
 (Abweichung bei Zeichen "G": auch pH 6,5)  
 Temperatur: 50°C  
 = mit diesen Einstellungen Abtötungsversuche durchgeführt

Nach dem oben angezeigten Versuchsablauf folgten weitere Untersuchungen mit den vom Projektpartner entwickelten Enzymkomplexen SIAB I und II. Als Holzstoffe kamen dabei TMP aus Schongau und Druckschliff aus Mochenwangem zum Einsatz.

An der jeweiligen Probe wurden folgende Suspensionseigenschaften geprüft:

- Entwässerungswiderstand nach DIN EN ISO 5267-1,
- Wasserrückhaltevermögen nach ZM IV/33/57,
- Zetapotenzial mit Müttek SZP-06,
- Faserlänge mit kajaaniFiberLab™

Es wurde an jeder Probe eine Einfachbestimmung mit Korrektur der Filterkuchenmasse durchgeführt. Das Wasserrückhaltevermögen wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

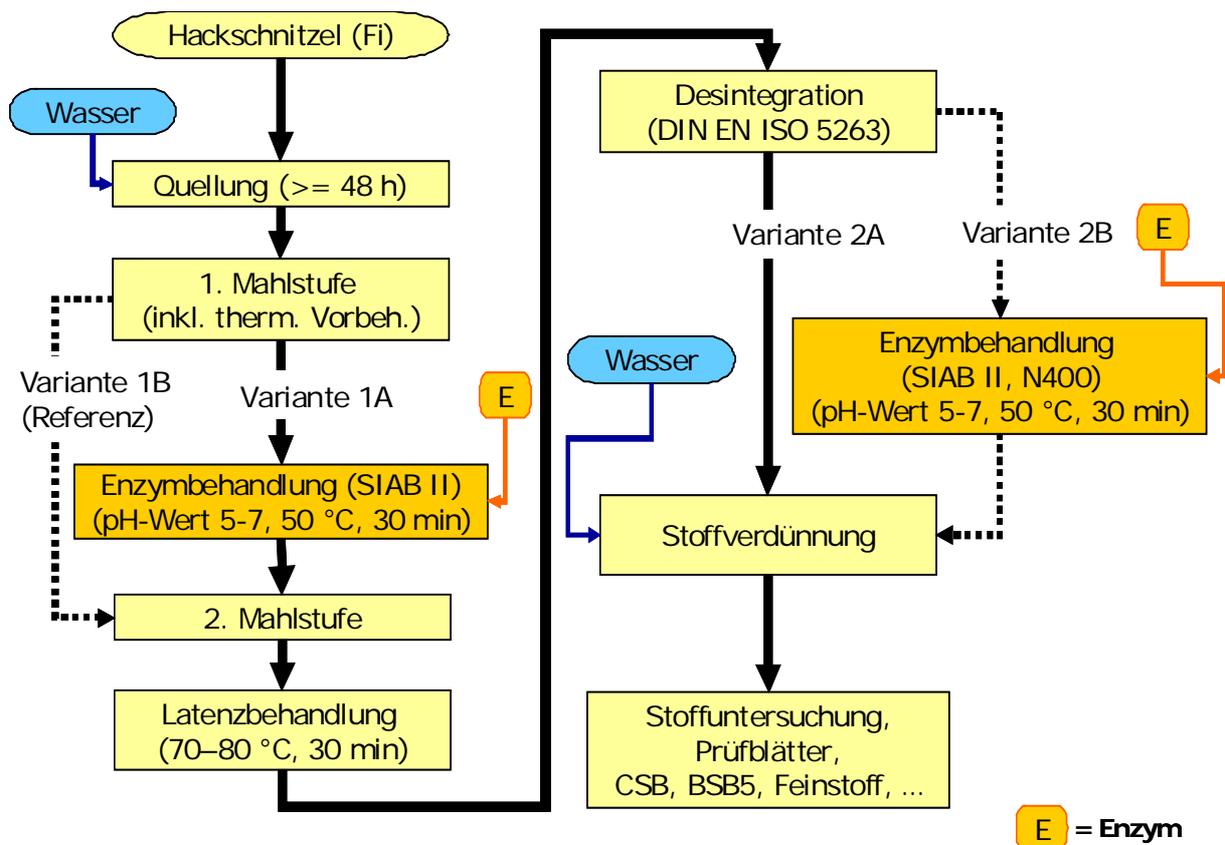
Von jeder Probe wurden nach dem Rapid-Köthen-Verfahren DIN EN ISO 5269-2 Prüfblätter gebildet. Nach der Blattbildung wurden die Prüfblätter im Trockner bei 94°C sieben Minuten getrocknet, ausgewogen und zur Klimatisierung im Klimaraum gelagert. Im Klimaraum wurden folgende Prüfungen durchgeführt:

- Bestimmung der flächenbezogenen Masse nach DIN EN ISO 536 und der Dicke nach DIN EN ISO 534,
- Ermittlung von Festigkeitseigenschaften nach DIN EN ISO 1924-2 (Bruchkraft, Bruchdehnung, Reißlänge, E-Modul, Tensile Index),
- Bestimmung der Weiterreißarbeit nach Brecht-Imset nach DIN 53115,
- Ermittlung von optischen Eigenschaften nach DIN 53140, DIN 53145-1, DIN 53146 und DIN 54500 (Weißgrad, Opazität, Streu- und Absorptionskoeffizient, Farbort).

Für den Tensile Tester standen pro Prüfblatt fünf Probestreifen zur Messung zur Verfügung, deren jeweilige Festigkeitseigenschaften zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Die Bestimmung der Weiterreißarbeit erfolgte aus zwei Einzelmessungen pro Prüfblatt. Bei der Bestimmung des Weißgrads wurde wegen äußerst geringfügiger Differenzen zwischen Ober- und Siebseite auf die Weißgradbestimmung der Oberseite verzichtet.

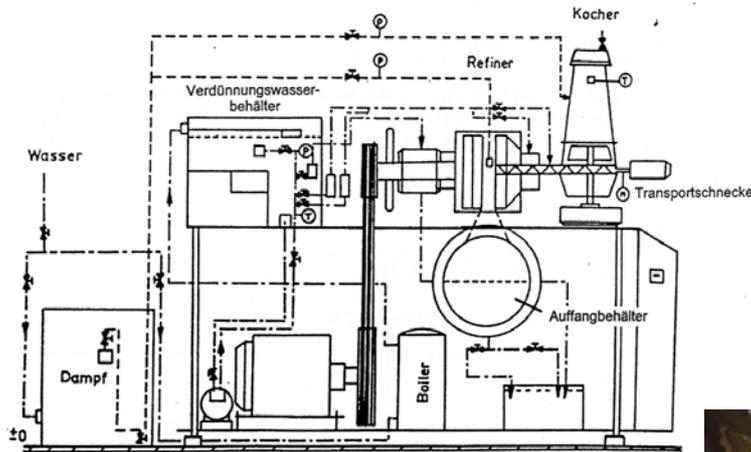
#### **5.2.4 Enzymbehandlung von TUD-TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe in einer Labor- CTMP Anlage**

Bei diesen Versuchen wurden im halbtechnischen Maßstab Fichtenholzhackschnitzel in einer Labor-CTMP-Anlage chargenweise gemahlen und zwischen der 1. und 2. Mahlstufe enzymatisch behandelt. Bei diesen Versuchen kam das Enzym SIAB II zum Einsatz. Dabei wurde auch das Stoffwasser aufgefangen und die CSB Und BSB Werte bestimmt. Außerdem wurde eine Nachbehandlung von Faserstoff aus der 2. Refinerstufe mit den Enzymen (SIAB II und N 400) untersucht. In der folgenden Abbildung ist die Versuchsdurchführung dargestellt.



**Abb. 5.2.4-1: Enzymbehandlung von TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe in der TMP-Laborrefineranlage**

Die Labor-CTMP-Anlage der Fa. Sprout Bauer vereint Imprägnierung, Vorwärmung und Zerkleinerung in einer technologischen Einheit. Vor TMP-Herstellung wurden die Hackschnitzel 2 Tage lang gewässert. Anschließend wurden sie in den Vorwärmbehälter (Kocher) gegeben und durch Dampfzuführung auf 140 °C erhitzt. Aus dem Dampfbehälter gelangten die Hackschnitzel über eine Zuführschnecke, die mit Wasser gekühlt wurde, in den bei Überdruck (2 bar) und erhöhten Temperaturen arbeitenden Scheibenrefiner. Hierbei handelt es sich um einen Einscheibenrefiner mit einer feststehenden und einer rotierenden Scheibe. Der Stoff passierte die Mahlscheiben von innen nach außen und gelangt in einen Auffangbehälter.



### Kocher

Volumen: 95 l  
 max. Druck: 0,7 MPa  
 max. Temp.: 163 °C  
 Durchsatz: 0,5 kg/min

### CTMP Anlage: Sprout Bauer

$d_{\text{Mahlgarnitur}}$ : 305 mm  
 Schnittwinkel: 0°  
 max. Drehzahl: 1500 min<sup>-1</sup>  
 max. Stoffdichte: 40 %  
 max. Antriebsleistung: 45 kW  
 Drehzahl Zuführschnecke: 0–95 min<sup>-1</sup>

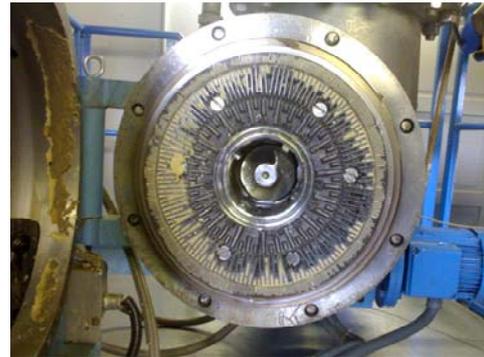


Abb. 5.2.4-2: Schema und Parameter der TMP-Laborrefineranlage

Folgende Parameter wurden bei den Versuchen an der TMP-Laborrefineranlage eingestellt.

Tab. 5.2.4-1: Parametereinstellung für die 1. und 2. Mahlstufe (Versuchsvariante 1 u. 2)

| Parameter         | Einheit | thermische Vorbehandlung | 1. Mahlstufe | 2. Mahlstufe |
|-------------------|---------|--------------------------|--------------|--------------|
| Druck             | bar     |                          | 2            | 2            |
| Temperatur        | °C      | 140                      | 135          | 130          |
| Mahlspalt         | mm      |                          | 0,2          | 0,1          |
| Schneckendrehzahl | 1/min   |                          | 15           | 25           |
| Verdünnungswasser | l/h     |                          | 40           | 10           |
| Dauer             | min     | 5                        |              |              |

Nach der 1. Mahlstufe schloss sich die Inkubation mit Enzymen an. Der TMP-Stoff wurde jeweils in 2 masseidentische Teile geteilt. Ein Teil wurde in einem Reaktor 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde der TMP-Stoff entwässert und im Refiner in einer 2. Mahlstufe nachgemahlen.

Bei einer ersten Variante wurde ein SIAB-Enzym eingesetzt und die Enzymdosierung variiert (SIAB II-Dosierung: 0,5 %; 1 %; 2 %). Die chargenweise Aufbereitung (3 Stoffansätze) er-

brachte unterschiedliche Durchgangszeiten, welche den Spezifischen Mahlaufwand in einem starken Maße beeinflusste.

Bei einer 2. Variante wurde ein Stoffansatz (Hackschnitzel) nach der 1. Mahlstufe geteilt und ein Teile davon zwischen den beiden Mahlstufen mit 1 % SIAB II behandelt. Untersucht wurden dann im Labor die Stoffproben der 1. und 2. Mahlstufe mit und ohne Enzyminkubation.

In einer dritten Versuchsvariante wurde der Energieeinsatz durch Vergrößerung des Mahlspaltes von 0,1 mm auf 0,2 mm in der 2. Mahlstufe noch weiter reduziert. Zusätzlich erfolgte nach einer Latenzbehandlung im Labor eine Nachinkubation mit 1 % SIAB II bzw. 1 % ECOSTONE N 400.

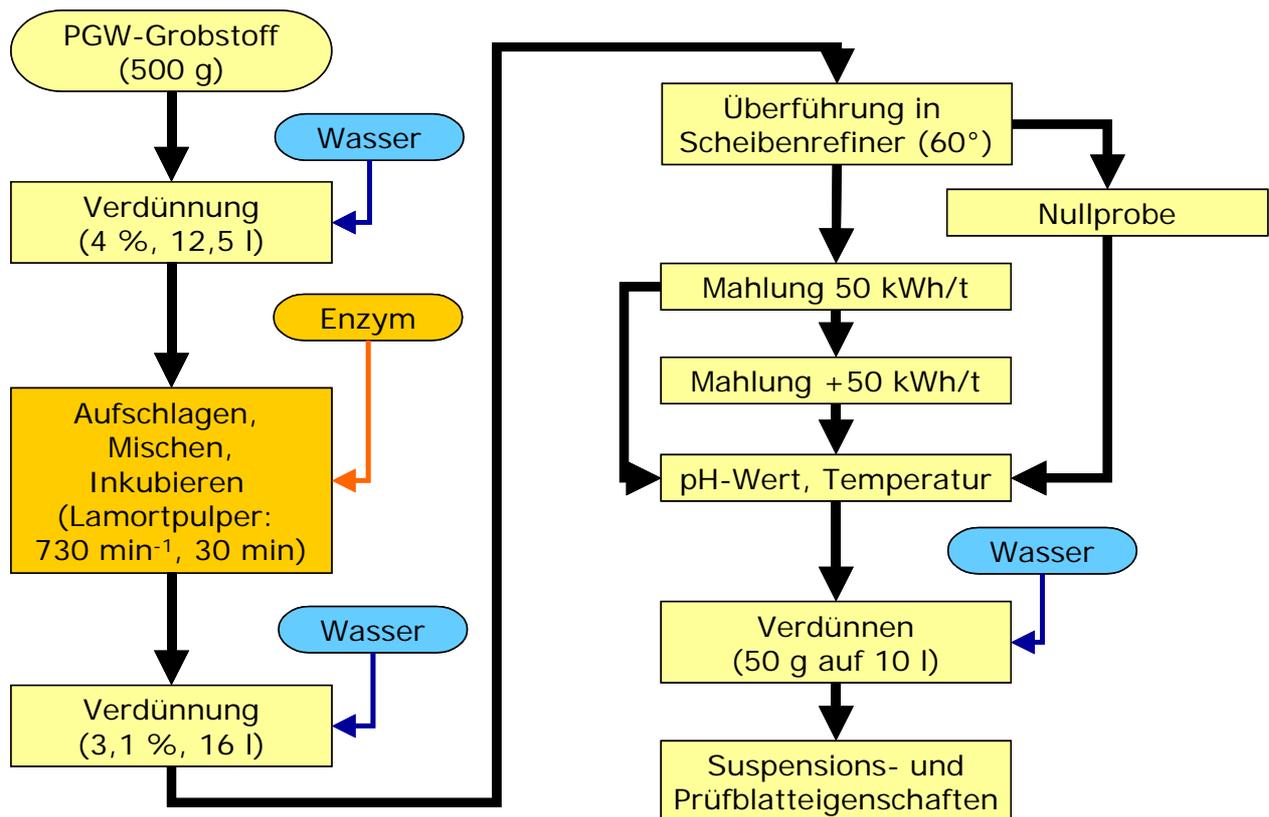
### **5.2.5 Enzymatische Behandlung von PGW-Grobstoff vor einer Nachmahlung im Laborscheibenrefiner**

In einer Versuchsreihe wurde feuchter PGW-Grobstoff aus Mochenwangen enzymatisch behandelt und im Laborscheibenrefiner nachgemahlen.

In den Laboruntersuchungen wurden die Enzympräparate SIAB II und III, CELLUPRACT AL-70, ECOSTONE N 400, ECOPULP TX 200A und ECOPULP ENERGY verwendet (Enzymaktivitäten unter Abschn. 4.3).

Die Enzymdosierung zum Faserstoff erfolgte bei einer Stoffdichte von 4 % in den Laborpulper. Bei 730 U/min und einer Temperatur von 50 °C wurden 500 g<sub>otro</sub> PGW-Grobstoff 30 min lang aufgeschlagen. Die entsprechende Enzymmenge wurde zu Beginn des Aufschlagens dosiert, sodass man bis zur anschließenden Mahlung im Laborrefiner von einer Inkubationszeit von 35 bis 40 min ausgehen kann. Der pH-Wert lag bei 7,8±0,1.

Die folgende Abbildung zeigt den Versuchsablauf der enzymatischen Behandlung von PGW-Grobstoff und anschließender Nachmahlung im Laborscheibenrefiner.



**Abb. 5.2.5-1: Enzymbehandlung von PGW-Grobstoff mit Nachmahlung im Laborrefiner**

Die Faserstoffmahlung wurde im Laborrefiner bei einer Stoffdichte von 3,1 % durchgeführt. Die massespezifische Mahlarbeit bzw. die Mahlintensität wurde über die entsprechende Stromstärke und Mahlungsdauer eingestellt. Die folgende Tabelle zeigt die entsprechenden Kennwerte für ein Anfangssuspensionsvolumen von 16 Litern. Vor der Mahlung wurde im Leerlauf die Nullprobe entnommen. Bei jeder Probennahme wurden 1,5 Liter Faserstoff im Leerlauf entnommen. Für alle Versuchsreihen wurden neben dem Nullpunkt (0 kWh/t) drei Kennwerte für Mahlpunkte bei 50 kWh/t und 100 kWh/t ermittelt. Nach der Mahlung wurden Laborblätter gebildet und ausgeprüft

Es wurden insgesamt mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Bei den ersten Versuchen erfolgte die Enzyminkubation mit SIAB II (0,5 %; 1 %). Bei der 2. Versuchsreihe wurden die Industrieenzyme TX 200 und N 400 (0,5 %) getestet. In Vorbereitung eines Großversuches bei Mochenwangen Papier erfolgten weitere Versuche mit den Enzymen SIAB III, CELLUPRACT AL-70 und ECOPULP ENERGY. Bei letzterem wurde noch einmal untersucht, ob die Enzymbehandlung vor oder nach der Mahlung effektiver ist.

Tab. 5.2.5-1: Mahlkennwerte des Laborrefiners

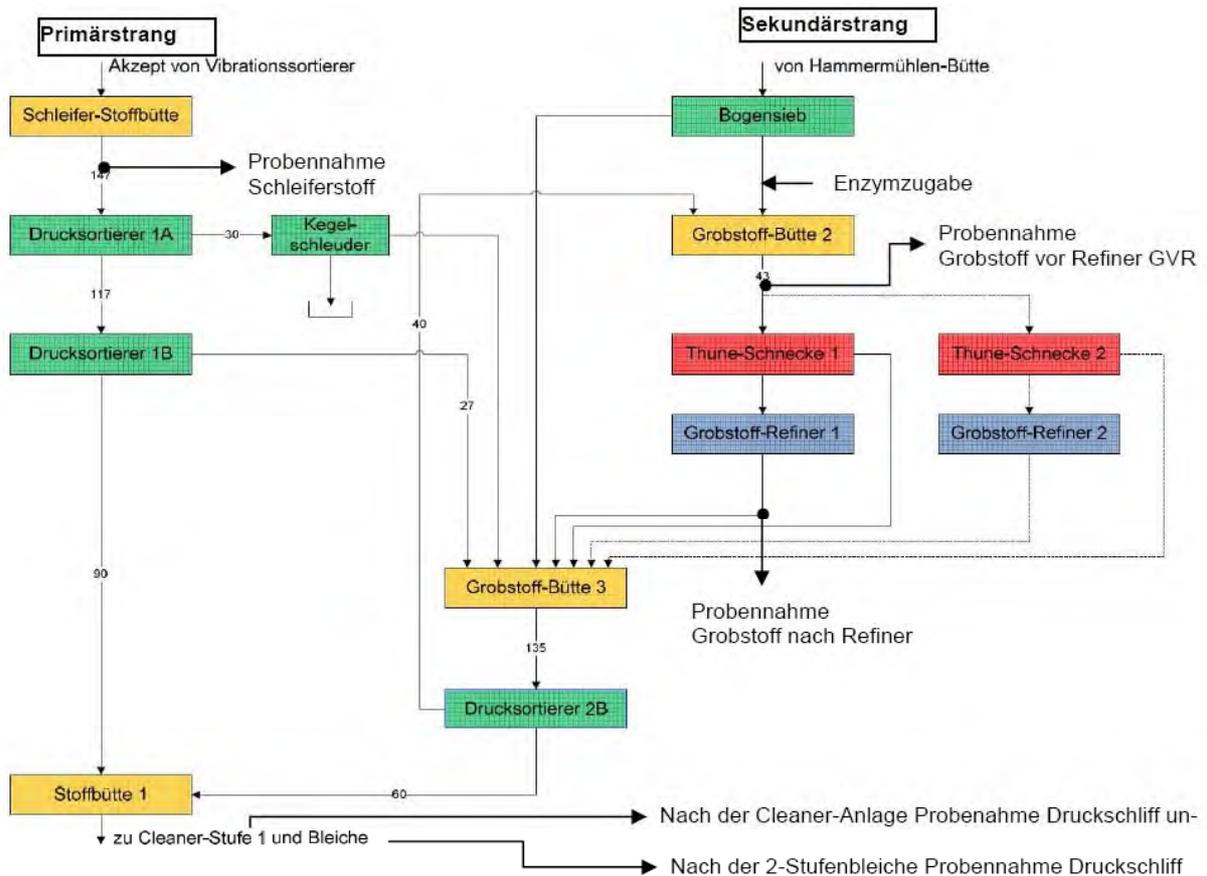
| $B_s$<br>J/m | V<br>dm <sup>3</sup> | c<br>%     | $m_{otro}$<br>kg | $P_{eff}$<br>kW | I<br>A     | $\Delta W_{spez}$<br>kWh/t | $\Delta t$<br>s |
|--------------|----------------------|------------|------------------|-----------------|------------|----------------------------|-----------------|
| 1            | 16,0                 | 3,1        | 0,50             | 2,35            | 9,6        | 25                         | 19,1            |
| 1            | 16,0                 | 3,1        | 0,50             | 2,35            | 9,6        | 50                         | 38,3            |
| 1            | 16,0                 | 3,1        | 0,50             | 2,35            | 9,6        | 100                        | 76,6            |
| 1            | 16,0                 | 3,1        | 0,50             | 2,35            | 9,6        | 200                        | 153,2           |
| <b>1</b>     | <b>14,5</b>          | <b>3,1</b> | <b>0,45</b>      | <b>2,37</b>     | <b>8,9</b> | <b>25</b>                  | <b>17,1</b>     |
| 1            | 14,5                 | 3,1        | 0,45             | 2,37            | 8,9        | 50                         | 34,2            |
| 1            | 14,5                 | 3,1        | 0,45             | 2,37            | 8,9        | 100                        | 68,4            |
| 1            | 14,5                 | 3,1        | 0,45             | 2,37            | 8,9        | 200                        | 136,7           |
| <b>1</b>     | <b>13,0</b>          | <b>3,1</b> | <b>0,40</b>      | <b>2,39</b>     | <b>8,4</b> | <b>25</b>                  | <b>15,1</b>     |
| 1            | 13,0                 | 3,1        | 0,40             | 2,39            | 8,4        | 50                         | 30,2            |
| 1            | 13,0                 | 3,1        | 0,40             | 2,39            | 8,4        | 100                        | 60,3            |
| 1            | 13,0                 | 3,1        | 0,40             | 2,39            | 8,4        | 200                        | 120,5           |
| 1            | 11,5                 | 3,1        | 0,36             | 2,43            | 8,0        | 25                         | 13,3            |
| <b>1</b>     | <b>11,5</b>          | <b>3,1</b> | <b>0,36</b>      | <b>2,43</b>     | <b>8,0</b> | <b>50</b>                  | <b>26,7</b>     |
| 1            | 11,5                 | 3,1        | 0,36             | 2,43            | 8,0        | 100                        | 53,3            |
| 1            | 11,5                 | 3,1        | 0,36             | 2,43            | 8,0        | 200                        | 106,7           |
| 1            | 10,0                 | 3,1        | 0,31             | 2,50            | 7,6        | 25                         | 11,3            |
| 1            | 10,0                 | 3,1        | 0,31             | 2,50            | 7,6        | 50                         | 22,3            |
| 1            | 10,0                 | 3,1        | 0,31             | 2,50            | 7,6        | 100                        | 44,6            |
| 1            | 10,0                 | 3,1        | 0,31             | 2,50            | 7,6        | 200                        | 89,3            |

Im Ergebnis dieser Versuche erfolgte die Entscheidung über den Einsatz eines der Enzyme in einem industriellen Großversuch bei der Mochenwangen Papier GmbH.

### 5.2.6 Großversuch bei der Mochenwangen Papier GmbH

Ziel des Großversuches war die Verifizierung der im Labor- und Technikumsmaßstab gewonnenen Ergebnisse zur enzymatischen Holzstoffbehandlung unter großtechnischen Bedingungen. Dabei sollten eine Reduzierung der spezifischen Schleiferarbeit bei gleichzeitiger Optimierung des Energieeinsatzes bei der Grobstoffmahlung und Verbesserung der Entwässerungseigenschaften erreicht werden.

In der folgenden Abbildung ist der technologische Ablauf der Druckschlicfsortierung und der Grobstoffnachmahlung mit der Enzymzugabe- und den Probenahme- Stellen dargestellt.



**Abb. 5.2.6-1: Druckschliffsortierung und Grobstoffbehandlung**

Der Enzymeinsatz erfolgte in Mochenwangen bei der Produktion von Werkdruckpapier in der Holzschleiferei bei der Nachmahlung von Grobstoff. Bei einer Tagesproduktion von max. 150 t/d wurde ca. ein Drittel der Holzschliffmenge als Grobstoff nachbehandelt. Der geplante Enzymeinsatz sollte bei 0,5 % bezogen auf Grobstoff, oder bei 0,17 % der Gesamt-Holzschliffmenge liegen.

Das Enzym wurde mit Wasser verdünnt vor der Grobstoffbütte 2 zudosiert. Die Inkubationszeit vor der Grobstoffmahlung betrug ca. 20 Minuten. Der Großversuch erstreckte sich über 3 Tage (insgesamt 60 Stunden). In dieser Zeit wurde das Enzym zugegeben. Die Stofftemperatur lag bei ca. 50 °C.

**Probennahmestellen:**

- Schleiferstoff (SS) nach der Schleiferstoff-Bütte
- Grobstoff vor Refiner (GVR) nach der Grobstoffbütte 2
- Grobstoff nach Refiner (GNR) am Ausgang des Scheibenrefiners
- Druckschliff ungebleicht (DSU) nach der Cleaneranlage (entspricht „Dünnstoff“)
- Druckschliff gebleicht (DSB) nach der 2-Stufenbleiche

Die Holzstoffproben wurden im Versuchszeitraum über 3 Tage in Intervallen von 4 Stunden entnommen. Des Weiteren erfolgten Probennahmen zur Abwasseruntersuchung am Zu- und Ablauf der Abwasserreinigungsanlage sowie vom Filtrat des Bandfilters an der Rundwasserbütte.

#### **Ausprüfen der Stoffproben und der Papiereigenschaften der Holzstoff-Probeblätter:**

- Bestimmung der Stoffdichten nach DIN EN ISO 4119
- Entwässerungswiderstand (SR) nach DIN ISO 5 267-1
- Holzstoff-Fraktionierung McNett nach ZM V/1.4/86
- Enzymaktivität (Siehe Kap. 4.3)
- Prüfung von Holzstoffen unter anderen Blatteigenschaften nach ZM VI/1/66
- Bestimmung der flächenbezogenen Masse und der Dicke DIN EN ISO 536 und 534
- Berechnung des spezifischen Volumens
- Bestimmung der Eigenschaften bei zugförmiger Belastung (Reißlänge, Tensile-Index, E-Modul) nach EN ISO 1942-2
- Weiterreißarbeit Brecht-Imset nach DIN 53 115
- Chemischer Sauerstoffbedarf CSB und Biologischer Sauerstoffbedarf BSB<sub>5</sub> nach der Methode Dr. Lange Küvettentest (Testnummern?)

Bei der Auswertung wurden auch die Tagesberichte von Mochenwangen mit einbezogen.

### **5.3. Forschungsergebnisse des Enzymeinsatzes bei der Papierherstellung**

#### **5.3.1 Optimaler Enzymdosierungen und Inkubationszeiten**

Bei den ersten Laboruntersuchungen wurden die Inkubationszeiten und Enzymzugabemengen bei TMP und Holzschliff variiert. Stellvertretend für alle anderen Kennwerte ist in den beiden folgenden Abbildungen das Entwässerungsverhalten von TMP ohne zusätzliche Mahlbehandlung in Abhängigkeit vom Cellulaseeinsatz zusammengefasst.

Der Entwässerungswiderstand, angegeben als SR-Wert, sinkt mit zunehmender Inkubationszeit ab. Je höher die Enzymmenge, desto geringer ist der Entwässerungswiderstand bei gleicher Inkubationszeit. Es sind Schwankungen sowohl mit zunehmender Inkubationszeit als auch mit steigender Enzymmenge zu beobachten. Enzymmenge und Inkubationszeit verhalten sich in Bezug auf den Entwässerungswiderstand gegenläufig: einen SR-Wert von etwa 50 erreicht man sowohl mit hoher Enzymdosierung und kurzer Inkubationszeit als auch mit niedriger Enzymdosierung und langer Inkubationszeit.

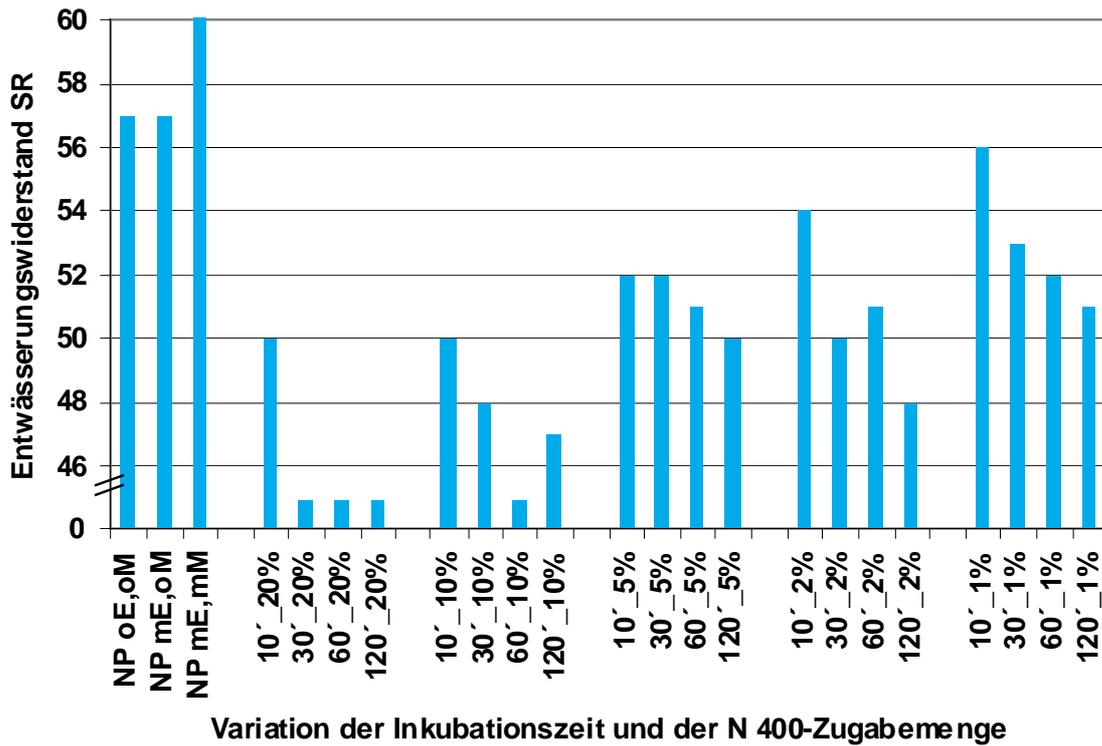


Abb. 5.3.1-1: Entwässerungswiderstand SR in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Cellulase-Zugabemenge bei TMP

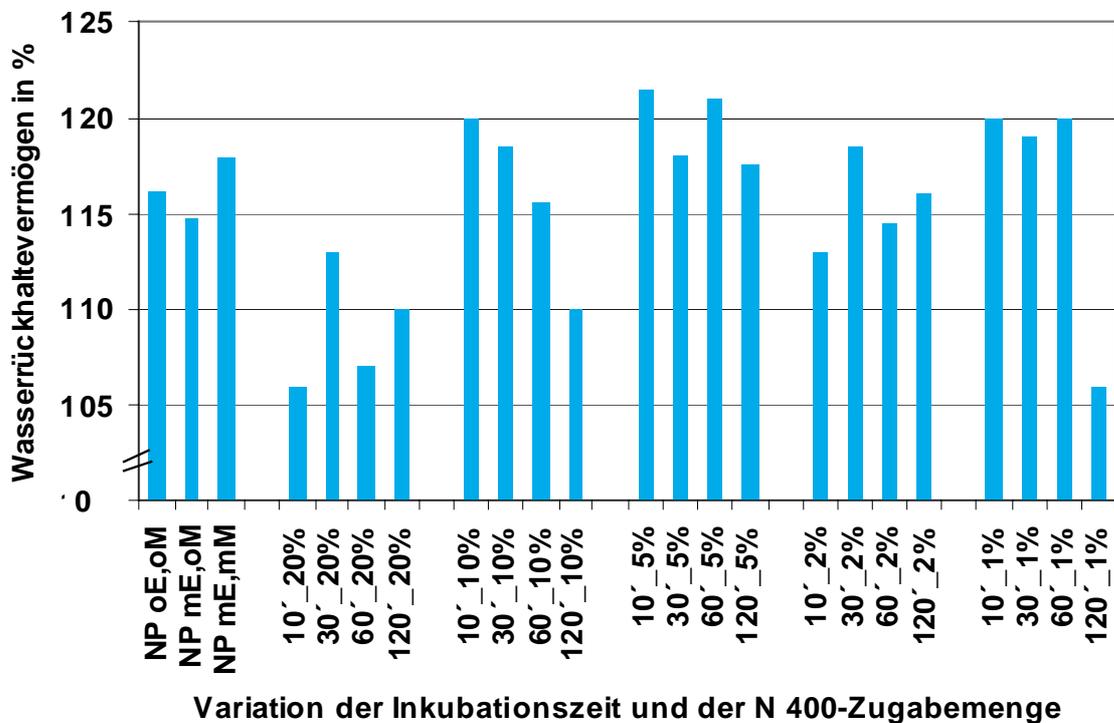
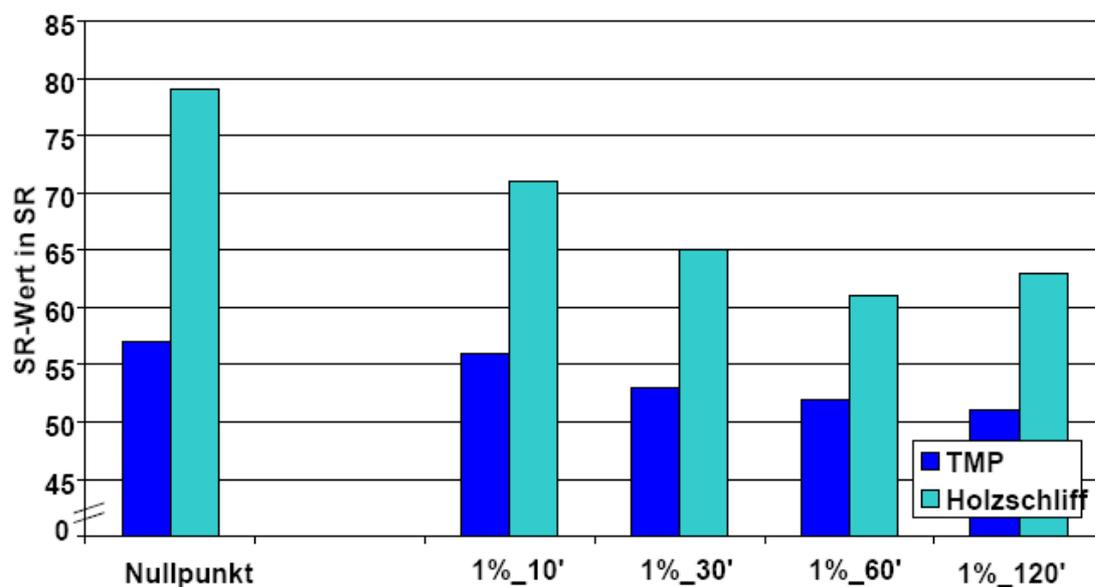


Abb. 5.3.1-2: Wasserrückhaltevermögen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Cellulase-Zugabemenge bei TMP

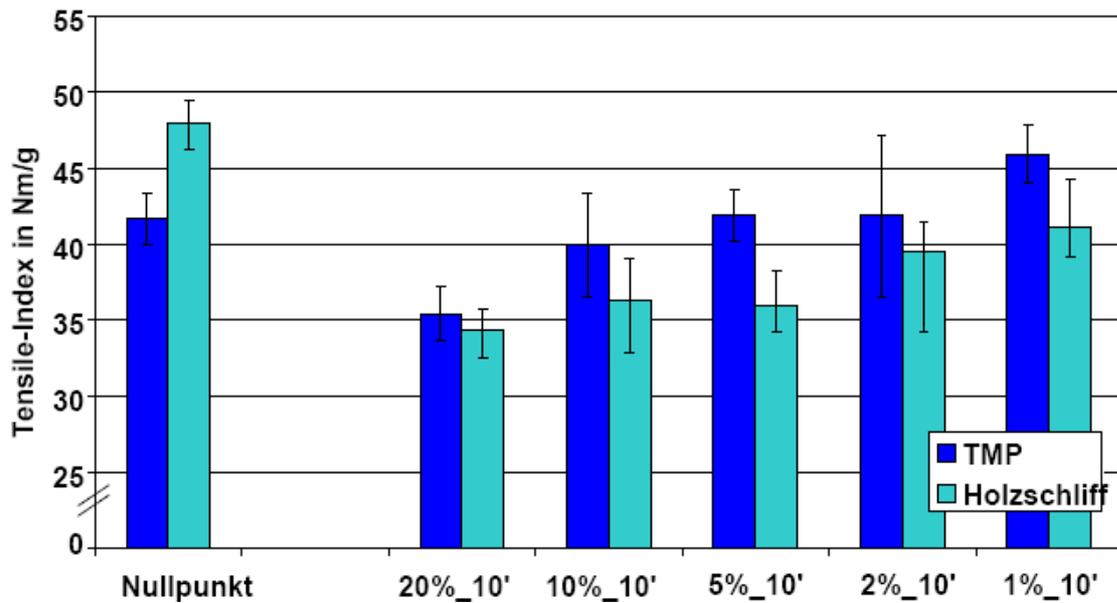
Beim Wasserrückhaltevermögen sind die Tendenzen ähnlich, aber nicht so ausgeprägt wie beim Entwässerungswiderstand. Es wird die Aussage bestätigt, dass für das Entwässerungsverhalten die Zwischenfaserbindungen und Feinstoffanteile, jedoch für das WRV einer Fasersuspension das innere Porenvolumen der Fasern maßgeblich sind. Da die Cellulase zunächst Bestandteile hoher spezifischer Oberfläche (wie Feinstoffe) an der Oberfläche der Faser hydrolysiert, erfährt das WRV kaum Veränderungen, die direkt auf (relativ kurze) Enzymaktivität zurückzuführen sind.

Der Entwässerungswiderstand sinkt durch eine Cellulasebehandlung mit zunehmender Einwirkungszeit bei Holzschliff stärker als bei TMP, wobei anzumerken ist, dass der TMP vor der Enzymbehandlung im Labor zwischengetrocknet und der Holzschliff initial feucht verarbeitet wurde.



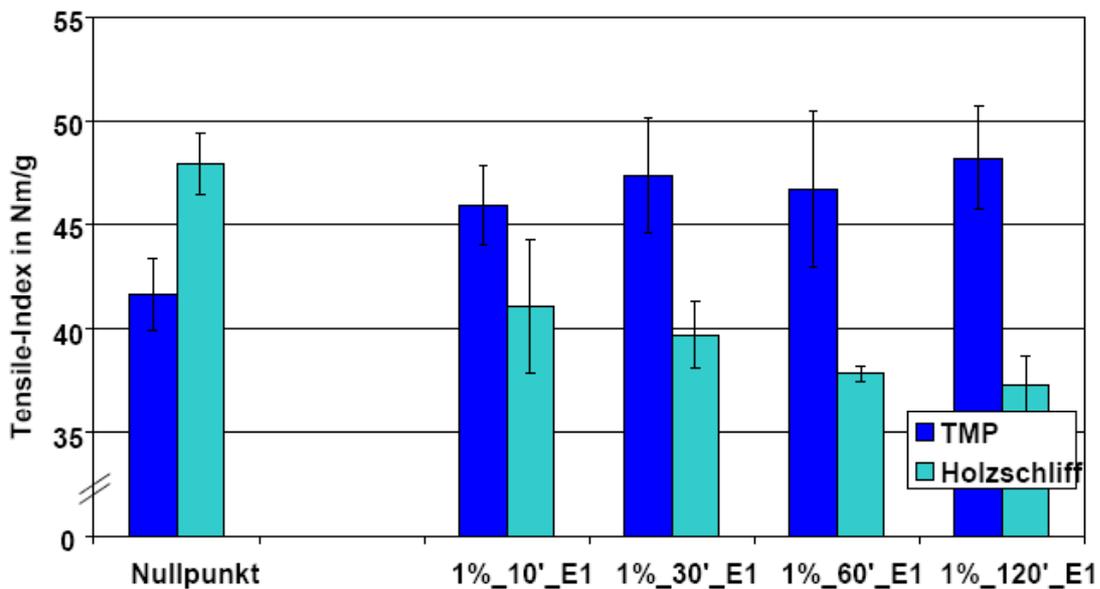
**Abb. 5.3.1-3: Einfluss der Inkubationszeit von Cellulase N 400 auf das Entwässerungsverhalten von TMP und Holzschliff**

Die Festigkeitseigenschaften von TMP und PGW werden durch die Enzyme unterschiedlich beeinflusst. Bei PGW verringert sich mit zunehmender Enzymdosierung die Zugfestigkeit. Dagegen kommt es bei TMP bei geringen Enzymdosierungen von ca. 1 % zu einer Erhöhung der Festigkeiten über das Referenzniveau hinaus. Ab einer Cellulase-Zugabemenge von > 2 % sinken die Festigkeiten. Die optimale Einsatzmenge liegt bei TMP unter 1 % bezogen auf otro Faserstoff.



**Abb. 5.3.1-4: Einfluss der Cellulase-Zugabemenge bei gleicher Inkubationszeit auf den Tensile-Index von TMP- und Holzschliff-Prüfblättern**

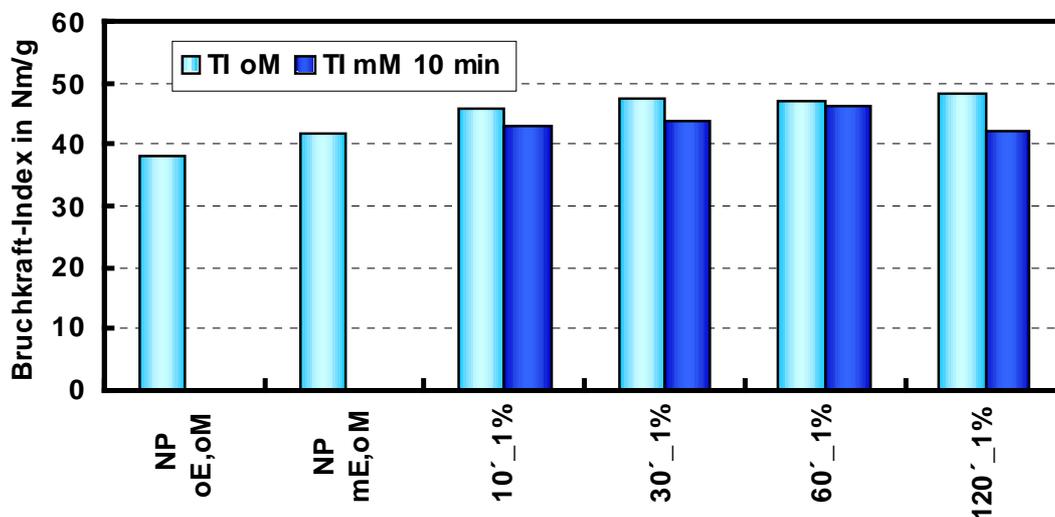
Ähnliche Tendenzen lassen sich bei der Inkubationszeit erkennen. Mit steigender Inkubationszeit steigt auch der Tensile- oder Bruchkraft-Index bei TMP-Laborblättern (bei 1 % Enzymdosierung), dagegen liegen die Festigkeitswerte der Holzschliff-Prüfblätter alle unter dem Referenzwert.



**Abb. 5.3.1-5: Einfluss der Inkubationszeit von Cellulase N 400 auf den Tensile-Index von TMP- und Holzschliff-Prüfblättern**

Bei Versuchen mit einer an die Inkubation anschließenden Mahlbehandlung mittels Jokromühle konnte gezeigt werden, dass ein nahezu gleiches Festigkeitsniveau wie bei unbehandelten gemahlener Proben, aber mit verringertem Entwässerungswiderstand erreicht werden kann.

- Ungemahlener mit ECOSTONE N 400 inkubierter TMP erreicht höhere Festigkeiten als nachgemahlener, nicht inkubierter TMP.
- Vor der Inkubation gemahlener TMP hat ein stark verbessertes Entwässerungsverhalten aber auch verschlechterte Festigkeitseigenschaften.
- Nach der Inkubation gemahlener TMP hat nur bei hoher Enzymdosierung leicht verbesserte Festigkeitseigenschaften im Vergleich zu nicht inkubiertem, gemahlener TMP sowie eine moderate Verbesserungen des Entwässerungsverhaltens.



**Abb. 5.3.1-6 Bruchkraft-Index (TI) von TMP-Prüfblättern in Abhängigkeit der Inkubationszeit von Cellulase (1 % N 400) ohne (oM) und mit 10 min Jokromahlung (mM)**

Beim Einsatz des lignin-modifizierenden Laccase-Präparates NL 51003 konnten bei TMP und Holzschliff keine Verbesserungen der Festigkeitseigenschaften erreicht werden. Lediglich bei höheren Einsatzmengen größer 5 % liegen die Festigkeiten bei TMP-Prüfblättern leicht über dem Referenzwert (ohne Mahlung). Der Referenzwert mit Mahlung wird aber nicht erreicht. Bei Holzschliff wurde generell eine Verringerung der Festigkeiten durch Enzymeinsatz mit Inkubationszeiten im Bereich von 10 bis 60 min festgestellt

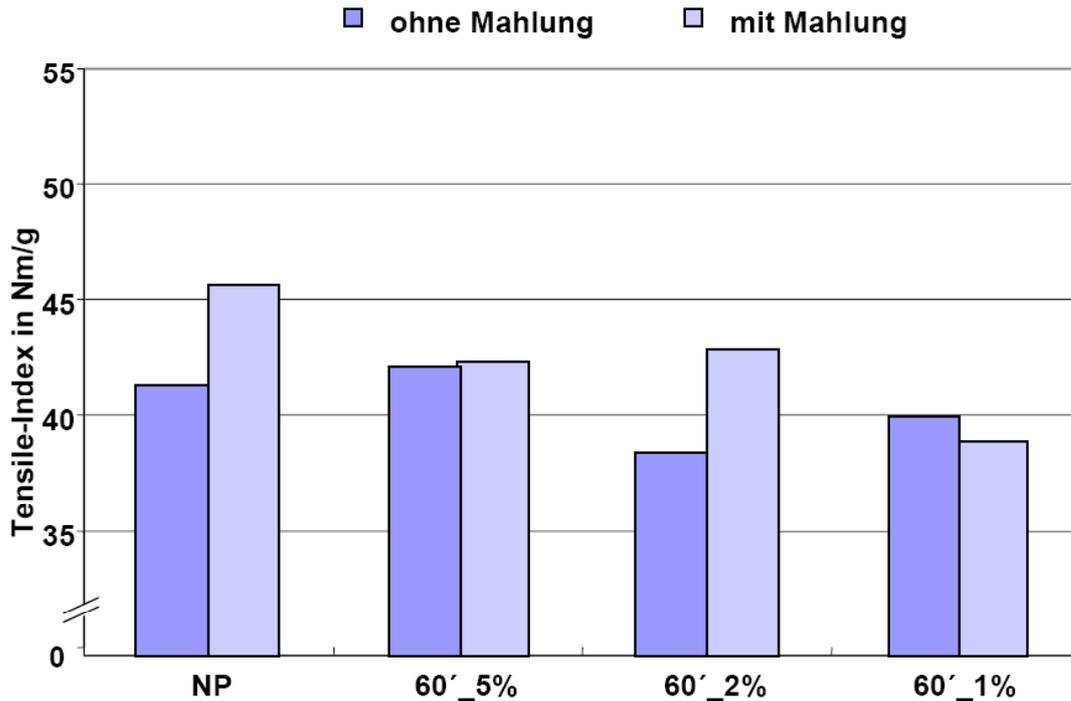


Abb. 5.3.1-7: Vergleich des Tensile-Index von TMP-Prüfblättern bei unterschiedlicher Laccase-Zugabemenge (Inkubationszeit 60 min) ohne und mit 10 min Jokromahlung

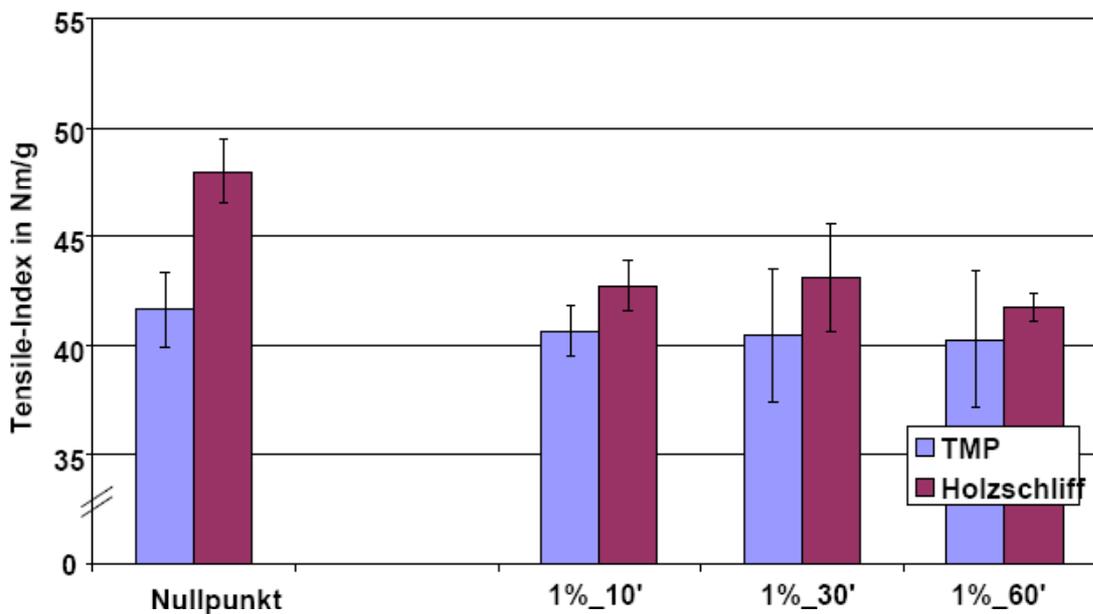
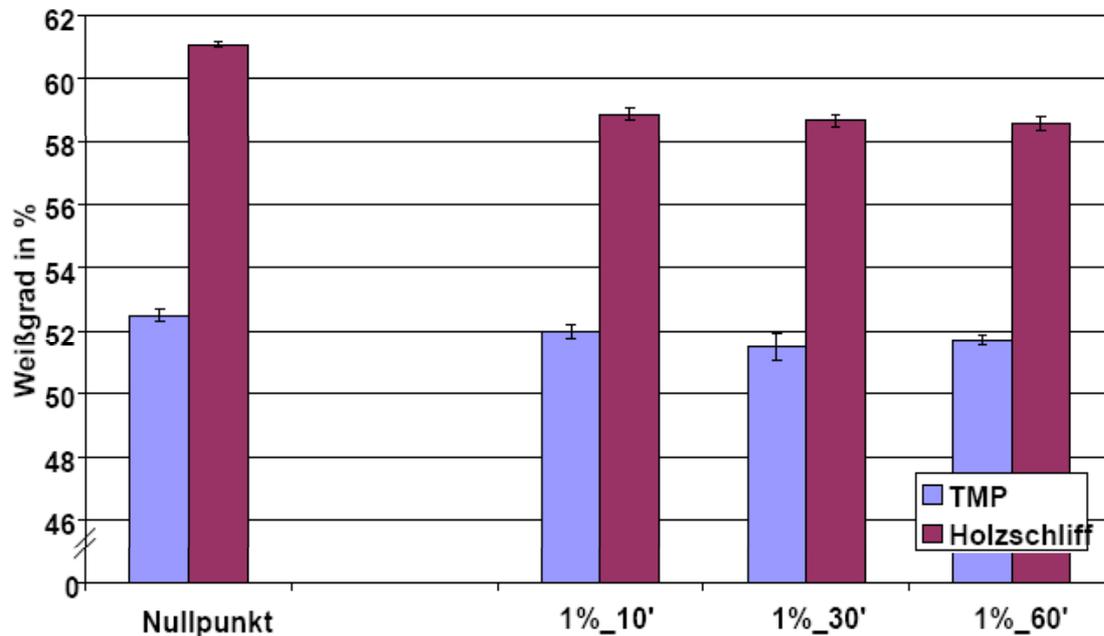


Abb. 5.3.1-8: Einfluss der Inkubationszeit von Laccase (1 % NL 51003) auf den Tensile-Index von TMP und Holzschliff

Wie die Festigkeitseigenschaften verschlechtern sich durch die Inkubation mit Laccase auch die optischen Eigenschaften. Mit zunehmender Inkubationszeit sinkt der Weißgrad der gebildeten Prüfblätter. Ursache dafür ist die Laccase-induzierte Bildung von Phenoxylradikalen sowie aromatischer  $\alpha$ -Carbonylgruppen und deren Polymerisation.



**Abb. 5.3.1-9: Einfluss der Inkubationszeit von Laccase NL 51003 auf den Weißgrad von TMP und Holzschliff**

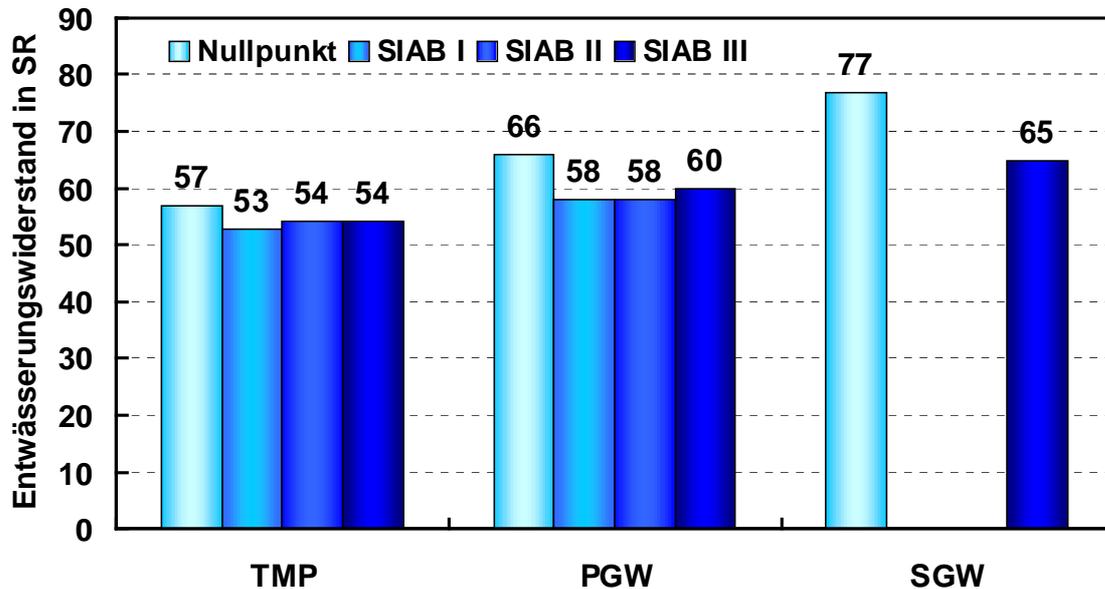
Anhand des farblichen Unterschieds ist zu vermuten, dass Radikalbildung und Polymerisation zu farbigen Strukturen gleich zu Anfang der Reaktion geschehen. Diese Aussage wird in verschiedenen Veröffentlichungen bestätigt.

### 5.3.2 Ergebnisse der Laboruntersuchungen unter Einsatz von SIAB- Enzymen

Bei den folgenden Untersuchungen kamen die vom Projektpartner SIAB entwickelten Enzymkomplexe aus Cellulasen und Hemicellulasen mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten zum Einsatz. Neben den bisher verwendeten Holzstoffen aus Schongau und Augsburg wurden die weiteren Untersuchungen zusätzlich mit Druckschliff aus Mochenwangen (MW-PGW) durchgeführt. Die Untersuchungen fanden im neutralen und sauren Bereich (maximale Enzymaktivität) statt. Es wurde auch der Einfluss einer alkalischen Vorbehandlung vor der Enzyminkubation untersucht.

Bei der Behandlung der Holzstoffe mit den SIAB Enzymen wurden insbesondere bei TMP positive Ergebnisse erreicht. Dabei spielen der Enzymtyp und die entsprechenden Enzymaktivitäten eine entscheidende Rolle. Das Enzym SIAB III unterscheidet sich von SIAB I und SIAB II

durch seine deutlich geringere Xylanaseaktivität und zeigt besonders in den abgésäuerten Proben niedrigere SR und WRV Werte.



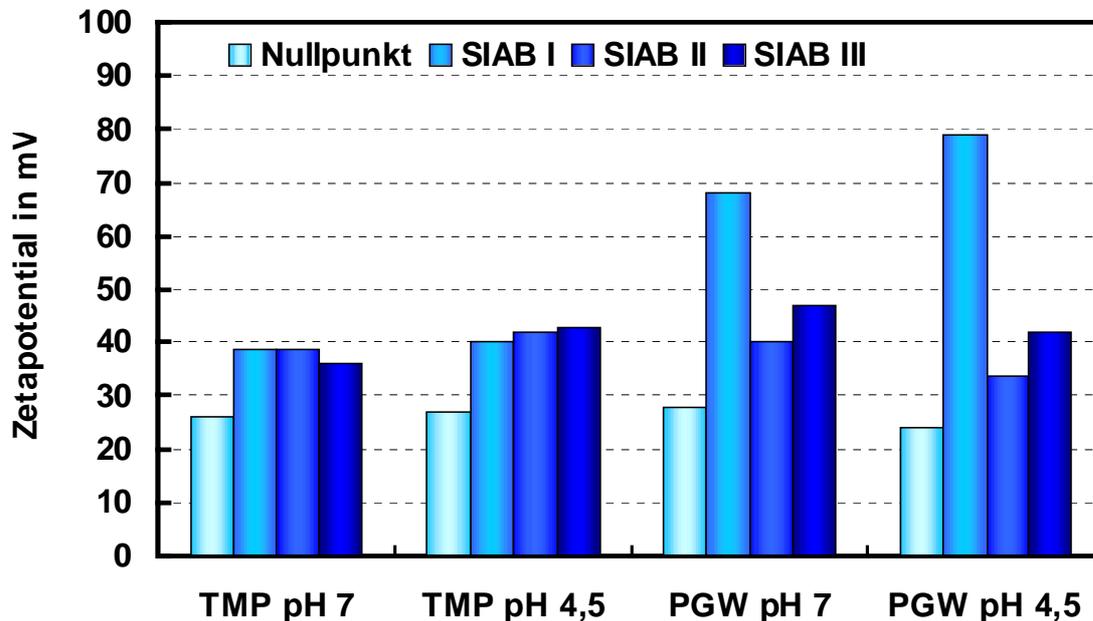
**Abb. 5.3.2-1: Veränderung des Entwässerungswiderstandes durch Behandlung mit SIAB- Enzymkomplexen I bis III (1 %; 10 min; pH 7)**

Die Xylanase katalysiert die Spaltung von Hemicellulose – Lignin - Kopplungen und von Hemicellulosen im Feinstoff. Eine weitere Hypothese ist, dass die Kohlenhydrate durch die Endo-Cellulasen zunächst in Fragmente gespalten werden und die Zersetzung in lösliche Produkte (Zuckermonomere) durch Exo-Cellulasen später verstärkt einsetzt. Diese Fragmente und kleinere Bruchstücke unterliegen einem Flockungseffekt. Die Enzyme wirken wie eine Art Retentionsmittel und binden die Teilchen untereinander und an größere Fasern. Bei einer Zusammenlagerung von Faserstücken entstehen dichtere und weniger dichte Bereiche, was zu einer besseren Entwässerung führen kann.

Die Enzymmenge von 1 % auf otro Masse Faserstoff und die Inkubationsdauer von 10 Minuten im neutralen Bereich hat sich bei den Versuchen als die beste Parametereinstellung erwiesen. Man hatte vermutet, dass eine stärkere Senkung des Entwässerungswiderstands nach der Enzymbehandlung eintritt. Wie aus der folgenden Abbildung zu sehen ist, war aber dieses nur beim Holzschliff (SGW) der Fall. Bei einer relativ kurzen Behandlungszeit von 10 Minuten und niedriger Enzymzugabemenge von 1 % kann man mit den verwendeten Enzym-Präparaten keine stärkere Senkung des Entwässerungswiderstands erwarten.

Das Zetapotenzial ist das elektrische Potenzial an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Suspension (Elektrochemische Doppelschicht). Faserladung wird durch ionisierte funktionelle Gruppen (meist Carboxylgruppen) in der Faserwand verursacht. Die Carboxylgruppen sind hauptsächlich in den Seitenketten der Holzxylane lokalisiert. Vermutlich ent-

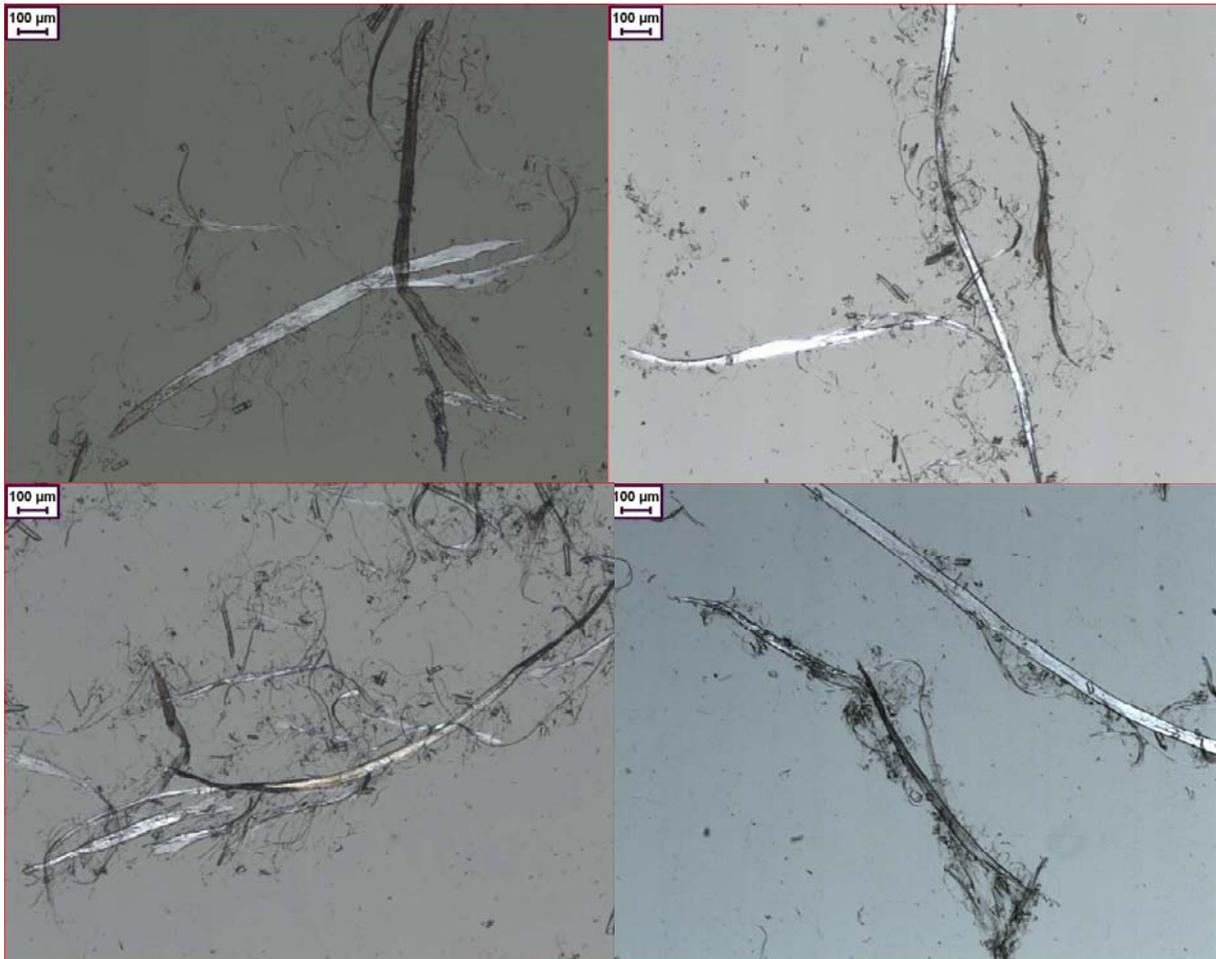
stehen während der komplexen Abbauvorgänge Ladungsverschiebungen und freie funktionelle Gruppen, die für partielle Ladungen an den Teilchenoberflächen sorgen. Die Ladung des Feinstoffes übersteigt dabei die Ladung des Faserstoffes um ein Vielfaches (Erhard 2008).



**Abb. 5.3.2-2: Veränderung des Zeta-Potenzials von TMP und PGW durch Behandlung mit SIAB-Enzymkomplexen pH 4,5 u. 7 ( 1 % Enzym; 10 min.)**

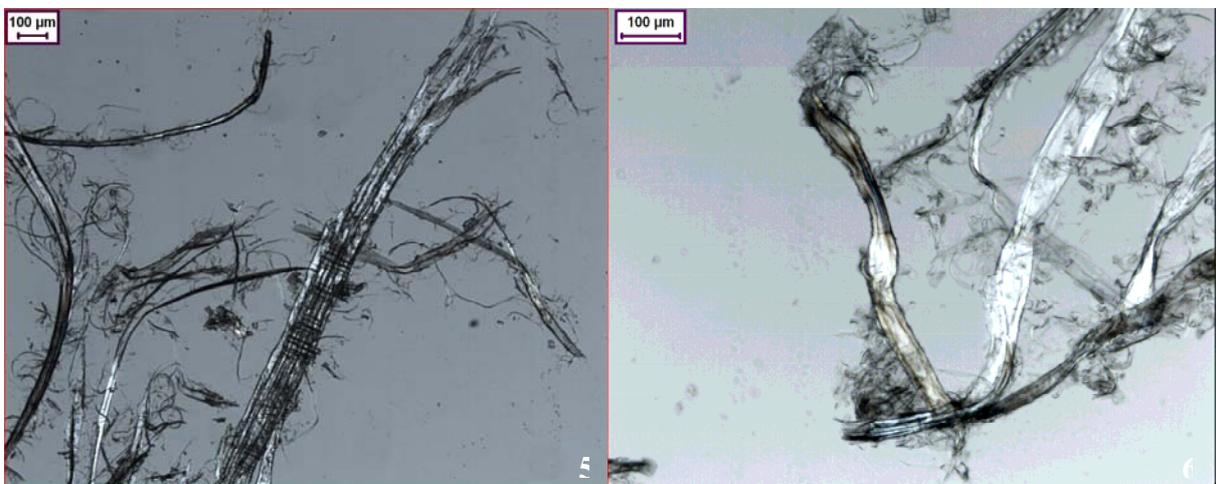
Die Ergebnisse zeigen, dass es bei der Enzymbehandlung zu einer nicht vernachlässigbaren Veränderung des Zetapotenzials in der Suspension kommt. Die Verschiebung des Zetapotenzials lässt sich durch die Aktivität der Enzyme begründen.

Der unbehandelte TMP zeigt ein typisches Bild für diesen Faserstoff mit langen Fasern, Fibrillen und kleinen Bruchstücken. Ansatzweise sind auch Mehl- und Schleimstoff fleckenartige Erscheinungen auf dem Bild zu erkennen. Die Behandlung mit SIAB I zeigt vermehrt kleinere und größere Bruchstücke und Fibrillen, aber keine ausgesprochene Adhäsion an langen Fasern. Die Behandlung mit SIAB II ergibt ein ähnliches Bild, allerdings mit mehr langen, feinen Fibrillen. Die Adhäsion an größere Fasern ist gering. Einen deutlichen Unterschied zur unbehandelten Probe ergibt das Bild mit der SIAB III Behandlung: Die Fibrillen und Bruchstücke haften stark an der Faser und scheinen von dieser regelrecht angezogen.



**Abb. 5.3.2-3: Mikroskopbilder der TMP-Nullprobe (1) und nach Behandlung mit SIAB I (2), SIAB II (3) und SIAB III (4)**

Bei den Mikroskopaufnahmen des unbehandelten und des enzymbehandelten PGW wird dieser Sachverhalt noch einmal verdeutlicht. Die Faserbruchstücke und die Fibrillen ballen sich bei dem enzymbehandelten Druckschliff zusammen und lagern sich an die Faser an.



**Abb. 5.3.2-4: Bilder von unbehandelten (5) und enzymatisch behandelten (6) PGW**

Wie schon bei den vorangegangenen Untersuchungen erbrachte die Behandlung mit SIAB-Enzymen beim TMP eine Steigerung der Festigkeitseigenschaften und beim Druckschliff eine Verschlechterung. Eine Ursache dafür könnten beim Druckschliff die höheren Feinstoffanteile sein.

Die Versuche wurden anfangs im neutralen pH-Bereich durchgeführt. Um den optimalen Betriebspunkt der Enzyme zu nutzen, wurden weitere Versuche im sauren pH-Milieu gemacht. Die Ergebnisse zeigen, dass beim Einsatz von Enzymen eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich hinsichtlich der Festigkeitsentwicklung eindeutig schlechtere Ergebnisse bringt. Dieses ist unter den gegebenen Praxisbedingungen in der Papierindustrie auch nicht zu empfehlen. Eine Inkubation im alkalischen Milieu hatte keine positive Wirkung auf die Festigkeitseigenschaft der Prüfblätter.

Beim TMP wurde mit dem Enzym SIAB III die durchschnittlich höchste Festigkeitssteigerung erreicht (bis zu 10 % höherer Bruchkraft-Index). Eine verringerte Enzymkonzentration führte nicht zu dem erhofften positivem Effekt auf die Festigkeit der Prüfblätter. Eine Enzymkonzentration von 1 % auf otro Masse Faserstoff ergab die höchste Steigerung des Bruchkraft-Index.

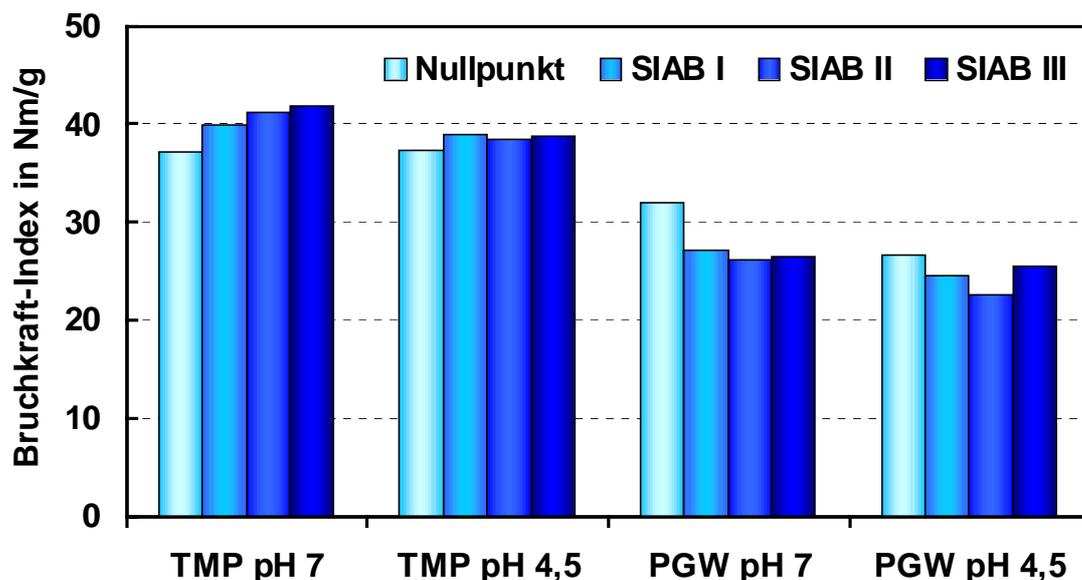
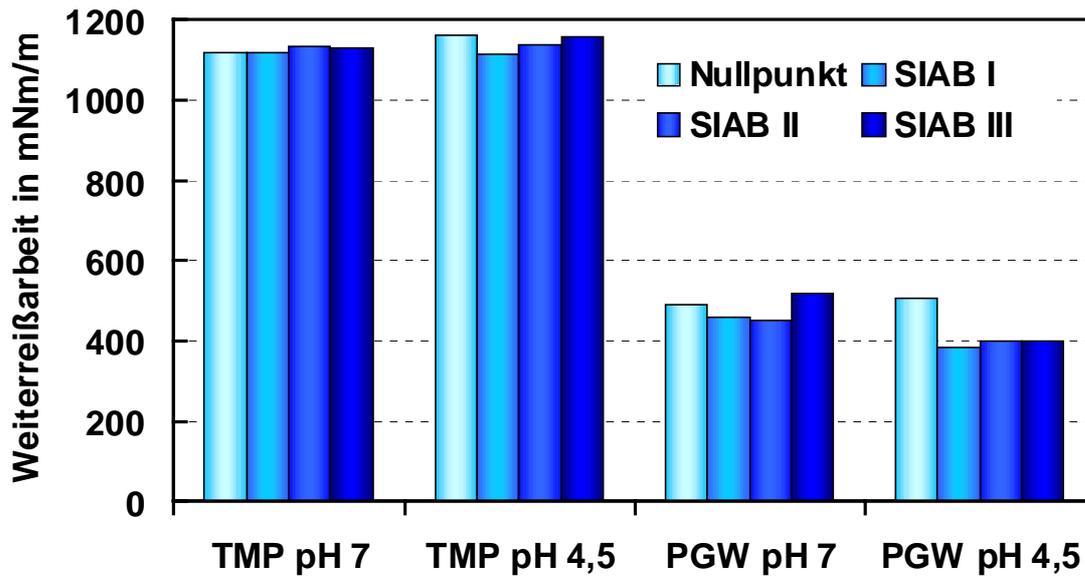
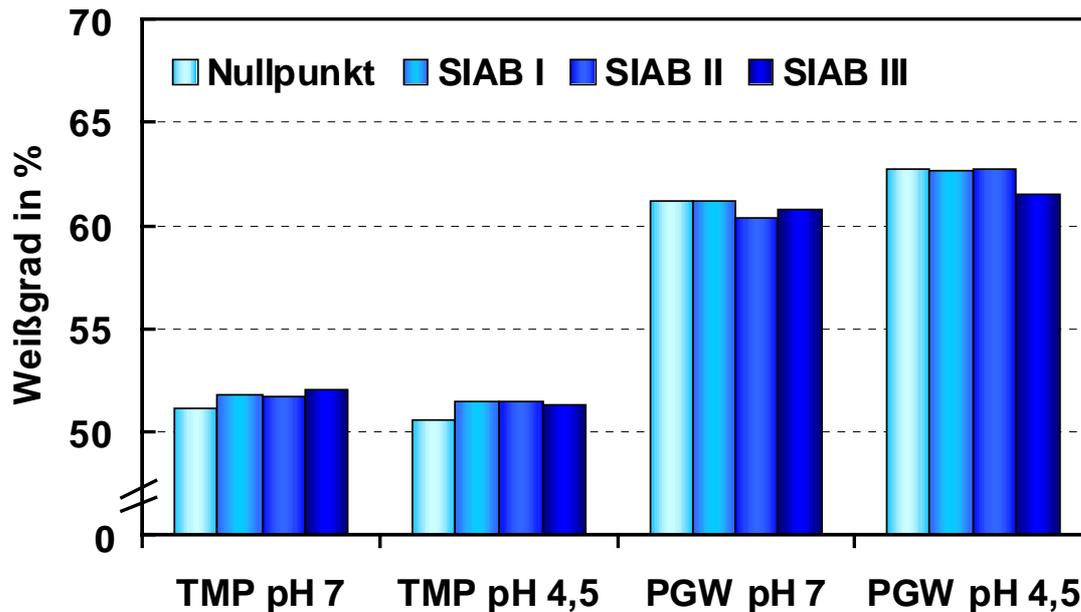


Abb. 5.3.2-5: Veränderung des Bruchkraft-Index von TMP- und PGW-Prüfblättern nach Behandlung des Holzstoffes mit SIAB-Enzymkomplexen pH 4,5 und 7 (1 %; 10 min.)



**Abb. 5.3.2-6: Veränderung der Weiterreißarbeit bei TMP- und PGW-Prüfblättern durch Behandlung des Holzstoffes mit SIAB-Enzymkomplexen pH 4,5 und 7 ( 1 %; 10 min.)**

Der Einfluss der Enzyme auf die optischen Eigenschaften ist durchaus positiv. Es sind leichte Weißgradsteigerungen zu verzeichnen. Die Xylanase katalysiert dabei die Spaltung der Hemicellulosen-Ligninkopplungen hauptsächlich am Feinstoff. Die abgespaltenen Produkte können während des Blattbildungsprozess leichter ausgewaschen werden. Mit dem ausgewaschenen Feinstoff geht auch ein Teil des färbenden Lignins verloren, was sich natürlich positiv auf den Weißgrad auswirkt und den Absorptionskoeffizienten sinken lässt. Ein steigender Streukoeffizient nach der Enzymbehandlung ist durch eine höhere Anzahl an Cellulosefragmenten und kleinsten Bruchstücken begründet.



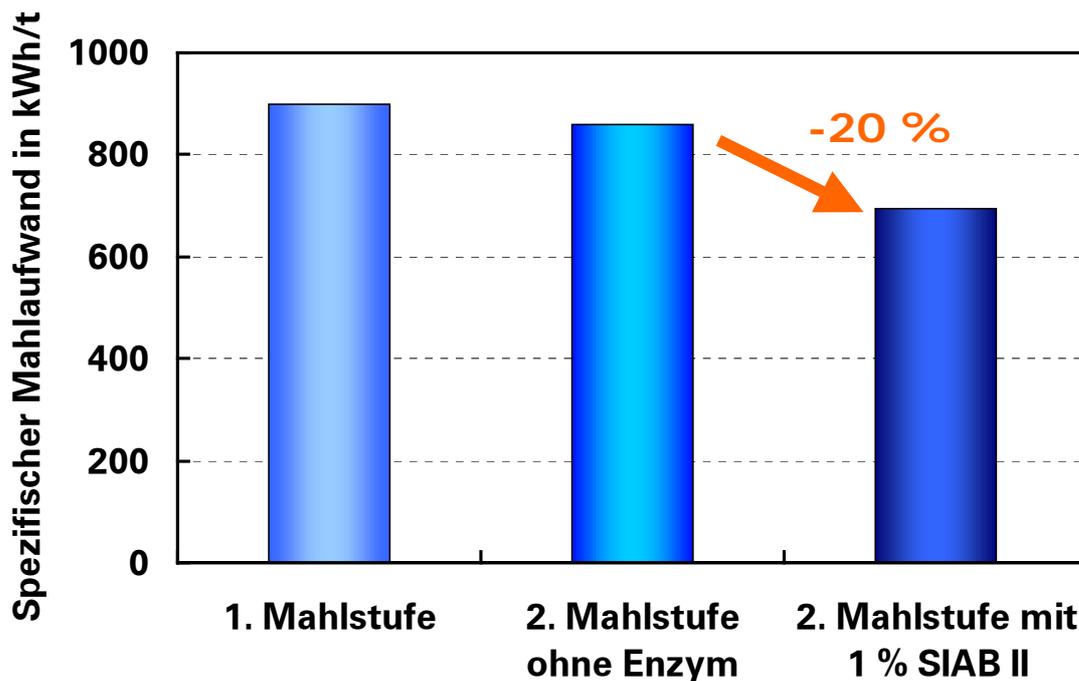
**Abb. 5.3.2-7: Veränderung des Weißgrades von TMP- und PGW-Prüfblättern nach Behandlung des Holzstoffes mit SIAB-Enzymkomplexen pH 4,5 und 7 (1 % Enzym; 10 min)**

### 5.3.3 Enzymbehandlung von TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe

Im Gegensatz zu den üblichen industriellen TMP-Verfahren bestand bei den halbtechnischen Untersuchungen in der Labor TMP-Anlage die Möglichkeit, den zerkleinerten Holzstoff zwischen der 1. und 2. Mahlstufe mit Enzym zu behandeln. Das Ziel dieser Untersuchungen im Technikum war, den Energieeinsatz durch eine Enzymbehandlung deutlich zu reduzieren. Die Zerkleinerung in der Labor-TMP-Anlage erfolgte chargenweise.

Bei einem 1. Versuch wurden mit 3 Stoffansätzen (Hackschnitzel) der 1. Mahlstufe vor der 2. Mahlstufe die Enzymzugabemenge (SIAB II 0,5 %; 1 %; 2 %) variiert. Die chargenweise Aufbereitung erbrachte unterschiedliche Durchgangszeiten, welche den spezifischen Mahlaufwand in einem starken Maße beeinflussen. Eine Vergleichbarkeit ist deshalb nur sehr eingeschränkt möglich. Bei den enzymbehandelten Proben wurden bei der 2. Mahlstufe (Mahlsplatt 0,1 mm) im Vergleich zu den Referenzproben längere Durchgangszeiten registriert, was einen höheren Mahlaufwand zur Folge hatte.

Bei einem 2. Versuch wurde ein Stoffansatz (Hackschnitzel) nach der 1. Mahlstufe geteilt und ein Teil zwischen den beiden Mahlstufen mit 1 % SIAB II wie im ersten Versuch inkubiert. Untersucht wurden dann im Labor die Stoffproben der 1. und 2. Mahlstufe mit und ohne Enzyminkubation. Bei diesem Versuch konnten mit einem 20 % niedrigerem Mahlaufwand gleiche bis bessere Festigkeitseigenschaften mit gering verbesserten Entwässerungswerten erzielt werden.



**Abb. 5.3.3-1: Enzymbehandlung (SIAB II 1 %; 30 min) von TMP zwischen der 1. und 2. Mahlstufe**

Bei einem dritten Versuch sollte der Energieeinsatz durch Vergrößerung des Mahlspaltes auf 0,2 mm in der 2. Mahlstufe (analog der 1. Mahlstufe) noch weiter reduziert werden. Zwischen der 1. und 2. Mahlstufe erfolgte wie bei den vorangegangenen Versuchen die Enzyminkubation. Die 2. Mahlstufe mit der gleichen Mahlspalteinstellung wie in der 1. Mahlstufe (0,2 mm) brachte allerdings keine Verbesserung der Festigkeitseigenschaften. Ebenso konnte durch eine zusätzliche eine Nachinkubation mit 1 % SIAB II bzw. 1 % ECOSTONE N 400 keine Verbesserung der Festigkeitseigenschaften erreicht werden.

Stoffwasseruntersuchungen zeigten höhere CSB- und BSB-Werte bei den enzymbehandelten gegenüber den unbehandelten Proben und beweisen damit den Abbau von organischer Substanz durch die Enzyme.

#### **5.3.4 Enzymbehandlung von PGW-Grobstoff mit Nachmahlung**

Als ein Ergebnis der Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass durch eine geringe Nachmahlung der Holzstoffe die Festigkeitseigenschaften in einem höheren Maße beeinflusst werden als durch eine Enzymbehandlung. Durch eine vorangehende Enzymbehandlung sollte allerdings der Mahlenergieeinsatz reduziert werden. Dieses war bei den folgenden Untersuchungen der Schwerpunkt. Dabei wurde PGW-Grobstoff aus Mochenwangen eingesetzt.

Die eingesetzten Enzymsysteme hatten in Bezug auf Dosierung und Aktivitäten sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Festigkeitseigenschaften.

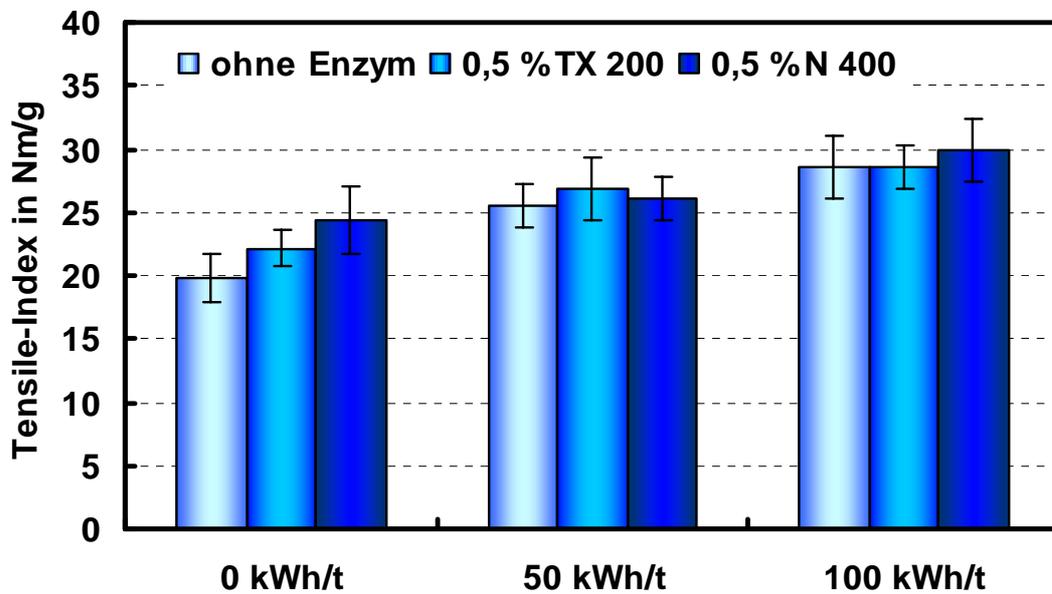


Abb. 5.3.4-1: Einfluss der Enzymbehandlung (0,5 % TX 200; 0,5 % N 400) vor der Nachmahlung im Scheibenrefiner auf den Tensile-Index der PGW-Grobstoff-Prüfblätter

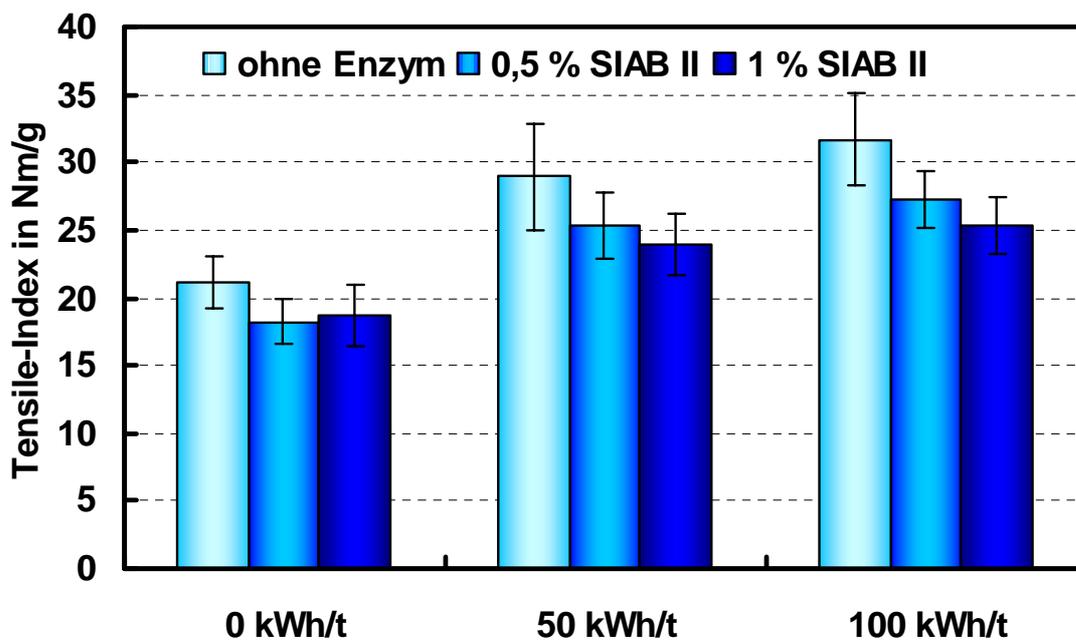


Abb. 5.3.4-2: Einfluss der Enzymbehandlung (0,5 % SIAB II; 1,0 % SIAB II) vor der Nachmahlung im Scheibenrefiner auf den Tensile-Index der PGW-Grobstoff-Prüfblätter

Wie schon in den vorangegangenen Versuchen führte auch eine Inkubation mit SIAB II bei PGW zu einer Verringerung des Tensile-Index. Im Gegensatz dazu zeigen die Industrieenzyme Ecopulp TX 200 und Ecostone N 400 eine leicht positive Wirkung auf die Zugfestigkeit. Interessant ist, dass eine Enzymdosierung von 0,5 % bereits ohne Nachmahlung zu einer Erhöhung der Zugfestigkeit führt.

Bei der Weiterreißarbeit führt eine Inkubation ohne Mahlstufe bei Einsatz aller gewählten Enzyme zunächst zu deren Verringerung. Beim Eintrag höher Energiemengen während einer Mahlung kann durch Inkubation ein weiteres Absinken der Weiterreißarbeit jedoch kompensiert werden. Insbesondere bei Inkubation mit SIAB II wird dieser Effekt deutlich.

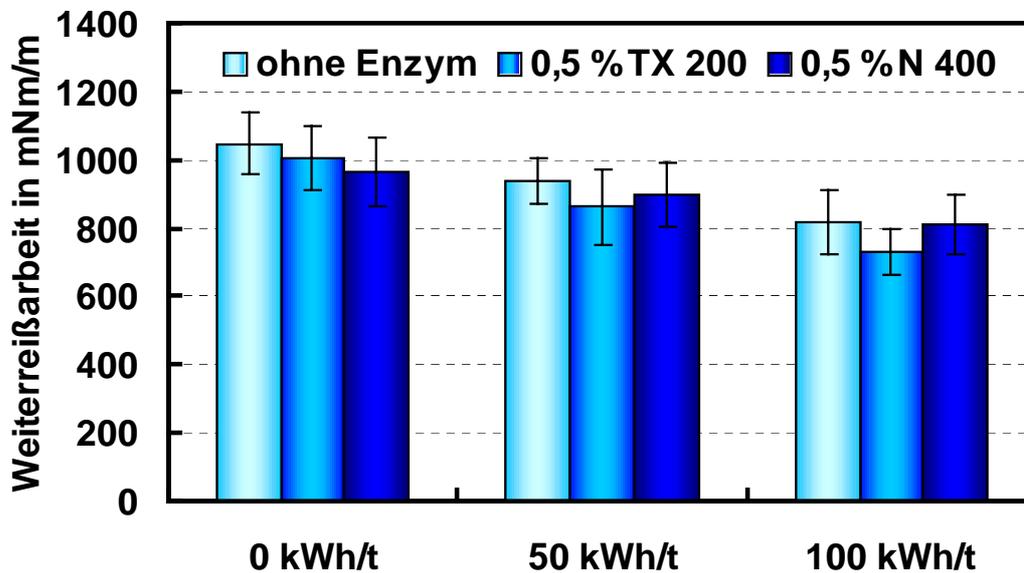


Abb. 5.3.4-3: Einfluss der Enzymbehandlung (0,5 % TX 200; 1,0 % N 400) vor der Nachmahlung im Scheibenrefiner auf die Weiterreißarbeit

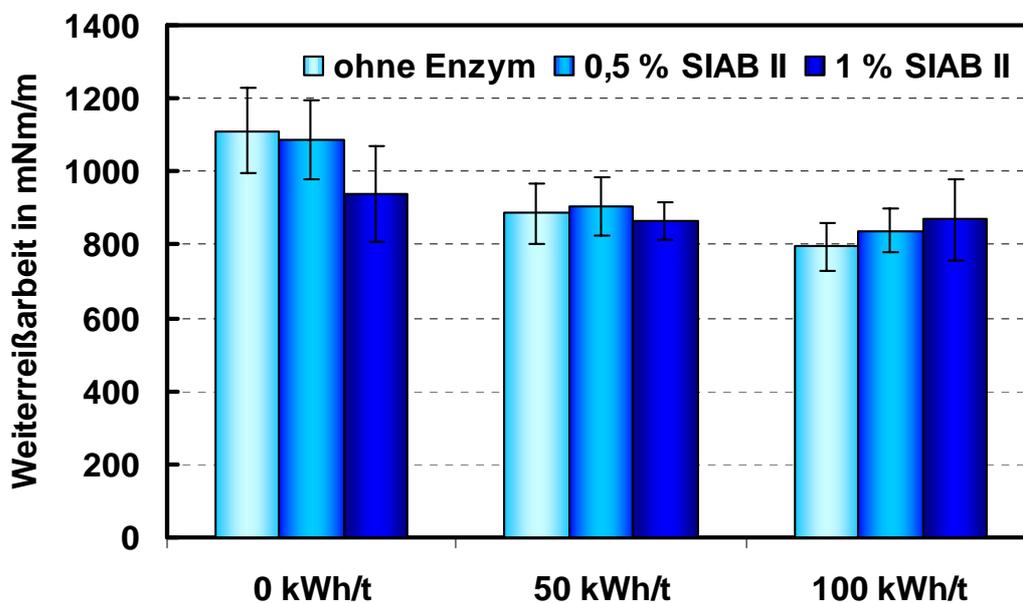


Abb. 5.3.4-4: Einfluss der Enzymbehandlung (0,5 % SIAB II; 1,0 % SIAB II) vor der Nachmahlung im Scheibenrefiner auf die Weiterreißarbeit

Bei näherer Betrachtung der eingesetzten hydrolytischen Enzymkomplexe sind die unterschiedlichen Xylanase-Aktivitäten besonders auffällig. Infolge der Aufkonzentrierung sind die-

se Aktivitäten bei den SIAB-Enzymen viel höher, als bei den handelsüblichen Industrieenzymen. Die Xylanase katalysiert die Spaltung von Hemicellulose-Lignin Kopplungen. Die unterschiedlichen Xylanase-Aktivitäten könnten eine Ursache für unterschiedliche Festigkeitsentwicklungen bei der Nachbehandlung von PGW-Grobstoffen sein.

In Vorbereitung eines Großversuches in der Papierfabrik Mochenwangen wurden im Labor des Lehrstuhls für Papiertechnik deshalb weitere Untersuchungen mit geringerem Mahlenergieeinsatz (25–30 kWh/t) und mit Enzymen mit niedriger Xylanase-Aktivität (SIAB III, ECOPULP ENERGY, CELLUPRACT AL-70) durchgeführt.

Mit ECOPULP® ENERGY und SIAB III konnte der Entwässerungswiderstand der Faserstoffsuspension bei gegebener massespezifischer Mahlarbeit (> 30 kWh/t) gegenüber der Referenz deutlich gesenkt werden. Durch die Enzymbehandlung kann der durch die Mahlung bedingte Anstieg des Entwässerungswiderstandes kompensiert werden. Die beste Wirkung zeigen hierbei die Enzymsysteme SIAB III und Ecopulp Energy. Sie bewirken eine Reduzierung des Entwässerungswiderstandes um bis zu 20 % (bei spez. Mahlaufwand größer 50 kWh/t).

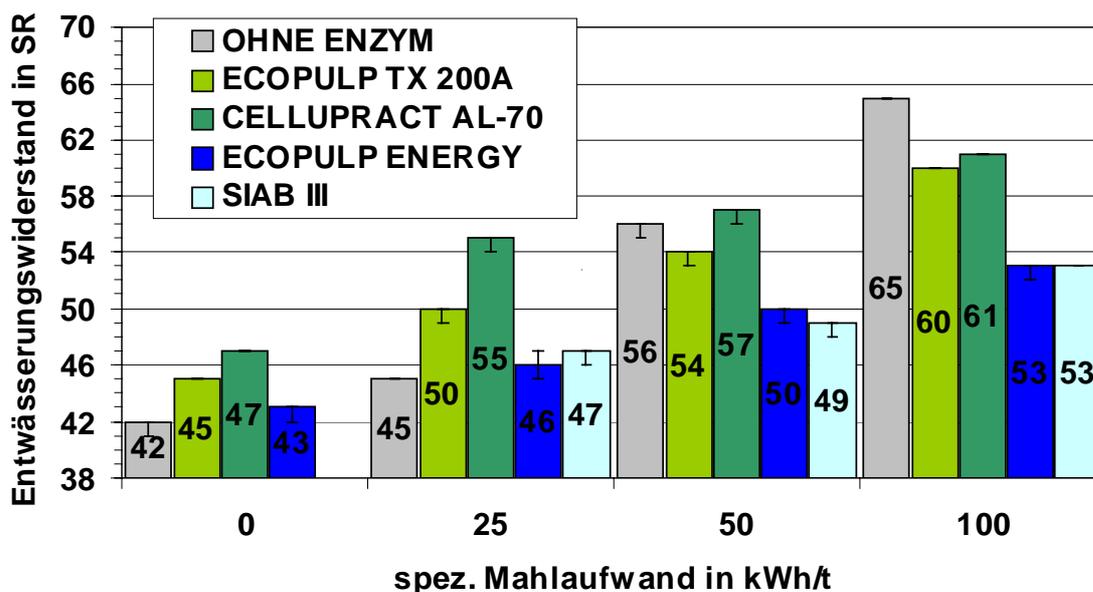
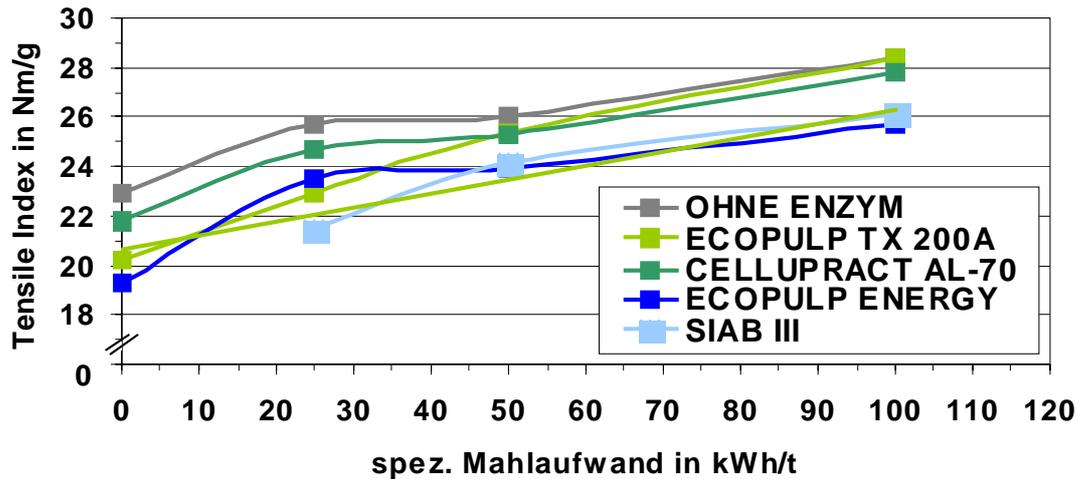


Abb. 5.3.4-5: Entwässerungswiderstand von nachgemahlenem PGW-Grobstoff in Abhängigkeit von den eingesetzten Enzympräparaten (Zugabemenge 0,5 %)

Durch die Enzymbehandlung wurde aber mit allen Enzympräparaten der Tensile-Index des nachgemahlenen PGW-Grobstoffs gegenüber der Referenzprobe zunächst verschlechtert (ca. um 10 %).



**Abb. 5.3.4-6: Tensile-Index von nachgemahlenem PGW-Grobstoff in Abhängigkeit vom Mahlaufwand**

Allerdings wird bei einer Enzymbehandlung ein stärkerer Anstieg des Tensile-Index bei steigenden Mahlgraden erreicht. So ist bei Einsatz von 0,5 % SIAB II bzw. Ecopulp Energy ab einem Mahlgrad von 53 eine höhere Zugfestigkeit zu verzeichnen, d. h. hier wird durch den Enzymeinsatz eine verbesserte Entwässerung mit höheren Festigkeiten erreicht.

Auf Grundlage der in der ersten Versuchsreihe erzielten Ergebnisse wurde die Entscheidung getroffen, das Enzympräparat ECOPULP ENERGY des finnischen Lieferanten AB ENZYMES Oy bei einem Großversuch in Zusammenarbeit mit der Mochenwangen Papier GmbH einzusetzen. Grund ist dessen deutliche Reduzierung des Entwässerungswiderstandes bei allen gemahlten Proben im Vergleich zur Referenz. SIAB III, welches vergleichbare Werte liefert, kann in den für einen Großversuch erforderlichen Mengen nicht bereitgestellt werden. Allerdings muss mit einer Reduzierung insbesondere der Zugfestigkeit gerechnet werden.

Dieses wurde in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt. Dabei wurde noch einmal untersucht, ob die Enzymzugabe vor oder nach der Mahlung effektiver ist. Sehr schön ist in der folgenden Abbildung zu erkennen, dass der Tensile-Index von der unbehandelten Probe über die vor der Mahlung inkubierte Probe bis zur nach der Mahlung behandelten Probe sinkt. Der umfassendere Abbau des Feinstoffs nach der im Anschluss an die Mahlung erfolgten Dosierung des Enzyms ist der Grund. Die Ergebnisse sprechen eindeutig für eine Enzymzugabe von ECOPULP ENERGY vor der Mahlung.

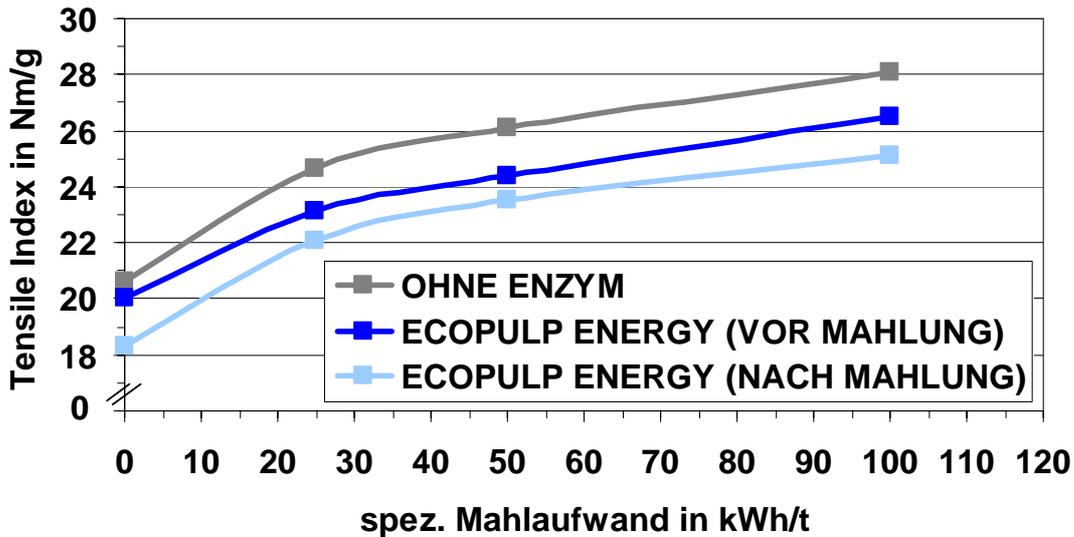


Abb. 5.3.4-7: Tensile-Index von nachgemahlenem PGW-Grobstoff in Abhängigkeit der Enzymzugabe (0,5 % ECOPULP ENERGY) vor oder nach der Mahlung

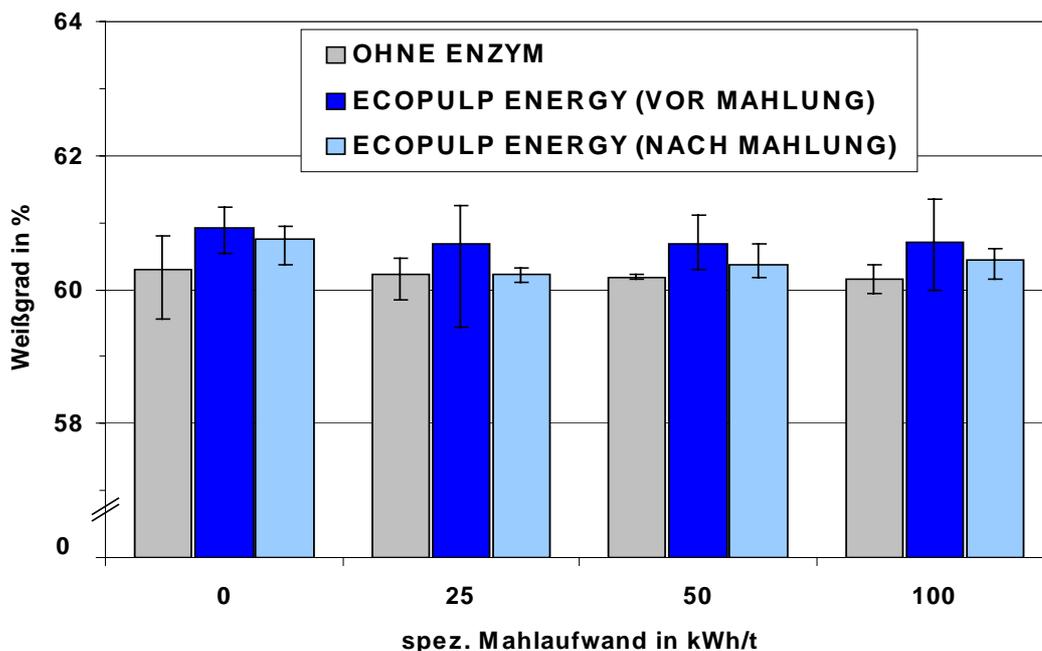


Abb. 5.3.4-8: Weißgrad von nachgemahlenem PGW-Grobstoff in Abhängigkeit der Enzymzugabe (0,5 % ECOPULP ENERGY) vor oder nach der Mahlung

Wie aus den Versuchen hervor geht, ist ein leichter Anstieg des Weißgrades gegenüber der Referenz durch eine enzymatische Behandlung des Grobstoffs vor der Mahlung im Refiner zu erwarten.

Um einen Anhaltspunkt bezüglich des Einflusses des Enzymeinsatzes auf den Chemischen Sauerstoffbedarf (CSB), sowie auf den Biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) der Kreislaufwässer zu erhalten, wurden entsprechende Laboruntersuchungen durchgeführt. Tabelle 5.3.4-

1 beinhaltet eine Übersicht zu den entnommenen Wasser- und Filtratproben. Das Trübfiltrat stammte aus Mochenwangen. Die Holzschliffsuspensionen hatten eine Stoffdichte von 3 % und es wurden 0,5 % Enzym dosiert. Zu den mit Enzym versetzten Proben, die nicht aus einer Holzschliffsuspension gewonnen wurden, wurde die einer 3 %igen Stoffsuspension entsprechende Enzymmenge dosiert. Die Inkubationsbedingungen (30 min, 50 °C, Laborrührer) wurden beibehalten. Die Bestimmung des BSB5 und des CSB wurde mithilfe des Dr. Lange Küvettentests durchgeführt. Bei dem eingesetzten Enzym handelte es sich um ECOPULP ENERGY.

**Tab. 5.3.4-1: Wasser- und Filtratuntersuchungen**

|         |   |
|---------|---|
| LW      | Leitungswasser  |
| LW+E    | Leitungswasser und Enzym  |
| LW+HS   | Holzschlifffiltrat (Grobstoffsuspension mit Leitungswasser hergestellt)                           |
| LW+E+HS | Holzschlifffiltrat (Grobstoffsuspension mit Leitungswasser hergestellt und enzymatisch behandelt) |
| TF      | Trübfiltrat   |
| TF+E    | Trübfiltrat und Enzym   |
| TF+HS   | Holzschlifffiltrat (Grobstoffsuspension mit Trübfiltrat hergestellt)                              |
| TF+E+HS | Holzschlifffiltrat (Grobstoffsuspension mit Trübfiltrat hergestellt und enzymatisch behandelt)    |

Die folgende Abbildung zeigt, dass der Einsatz von Enzymen zu einem leichten Anstieg des CSB-Wertes führt. Dieser Anstieg fällt jedoch nur bei den mit Trübfiltrat angefertigten Proben auf. Durch den enzymatischen Abbau kommt es zur Entstehung von Einfachzuckern und anderen Bestandteilen, die oxidierbar sind, was zum Anstieg des CSB-Wertes führt.

Auch der BSB-Wert reagiert mit einem Anstieg auf den Enzymeinsatz. Vor allem das Filtrat der enzymatisch behandelten Grobstoffsuspension mit Trübfiltrat zeigt einen deutlichen Anstieg gegenüber der Grobstoffsuspension mit Trübfiltrat (ohne Enzym). Grund sind die durch den enzymatischen Abbau entstehenden Einfachzucker (Monomere), die biologisch abgebaut werden.

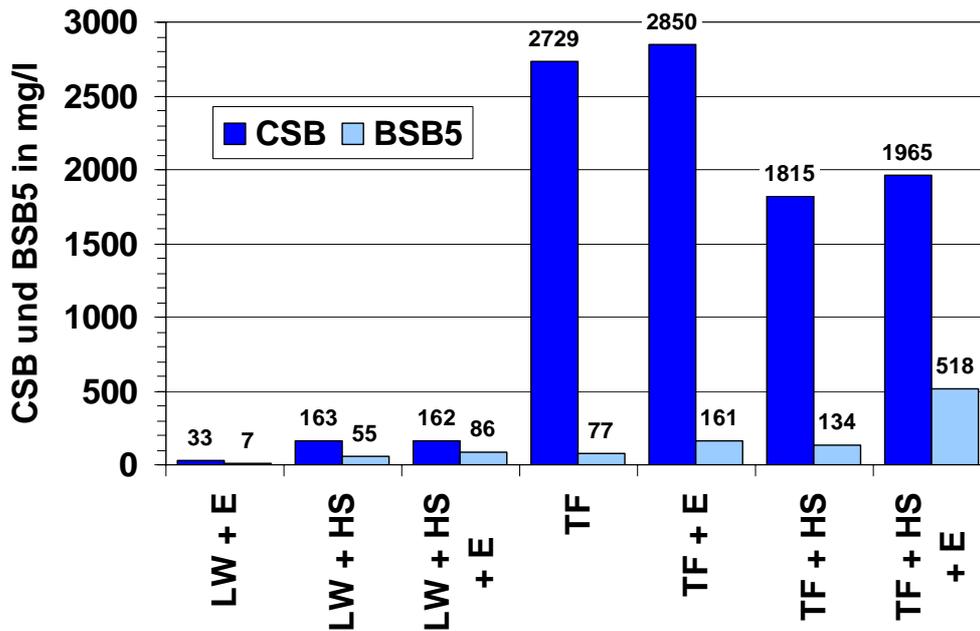


Abb. 5.3.4-9: Chemischer und Biologischer Sauerstoffbedarf

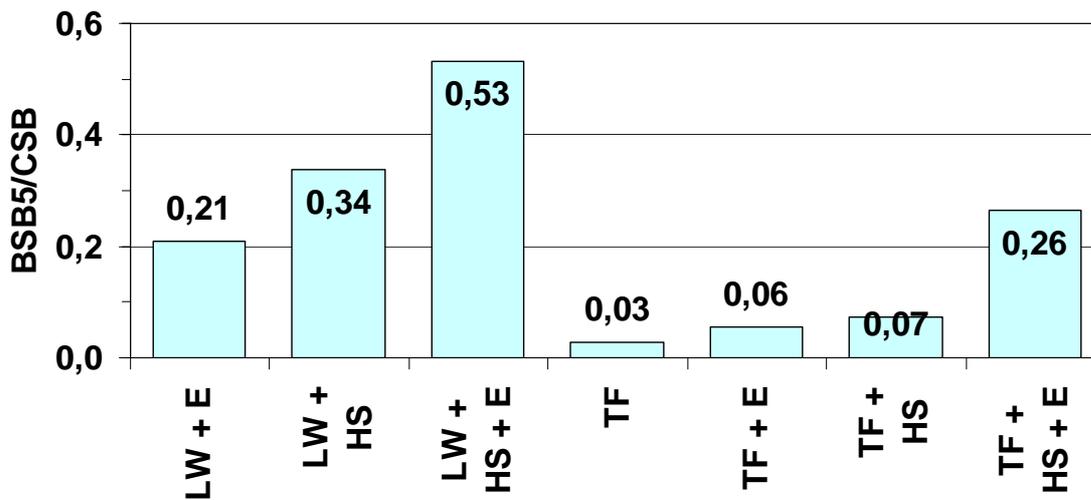


Abb. 5.3.4-10: Verhältnis BSB<sub>5</sub>/CSB

Das Verhältnis aus BSB<sub>5</sub> und CSB wird durch den Enzymeinsatz erhöht. Allgemein gilt, dass die Bestandteile einer Probe mit steigendem BSB<sub>5</sub>/CSB-Verhältnis besser biologisch abbaubar sind. Der Einsatz von Enzymen führt zu einer deutlichen Erhöhung des BSB-Wertes. Verglichen damit fällt die Erhöhung des CSB-Wertes gering aus. Die im Abwasser enthaltenen Stoffe sind demnach durch einen Enzymeinsatz besser biologisch abbaubar.

### 5.3.5 Großversuch bei der Mochenwangen Papier GmbH

Bei einem Großversuch über 3 Tage in der Papierfabrik Mochenwangen wurde das Ziel verfolgt, durch eine Enzymbehandlung die Entwässerungseigenschaften des Grobstoffes bei gegebener spezifischer Mahlarbeit im Sekundärstrang der Holzschleiferei zu senken (siehe Abb. 3.2.2-13). Danach sollte die spezifische Schleiferarbeit reduziert und der Durchsatz des Grobstoffes erhöht werden. Auf diese Weise sollte eine Energieeinsparung in der Schleiferei bzw. eine Erhöhung der Tagesproduktion erreicht werden.

Bei den Schleiferei-Kennwerten sind die zeitliche Auslastung der 4 Schleifer, der spezifische Arbeitsaufwand der Holzstoffaufbereitung insgesamt und die Tagesproduktion Druckschliff besonders zu berücksichtigen. Durch die Urlaubszeit kam es teilweise zu Unterbesetzung einzelner Schichten, so dass nicht mit maximaler Holzmenge gefahren werden konnte. Die Auslastung der Schleiferei wurde insbesondere durch das Sortenprogramm auf den 3 Papiermaschinen beeinflusst. Infolge einer durch das Sortenprogramm reduzierte Papierproduktion erhöhte sich die Enzymzugabemenge im Grobstoff auf ca. 1 %.

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

Durch Zugabe von 0,5–1 % ECOPULP ENERGY konnte im Versuchszeitraum und danach der Gesamt-Energie-Aufwand in der Schleiferei um ca. 11 % gesenkt werden. Damit wurden die Kosten für den Enzymeinsatz gedeckt. Eine weitere Kostenoptimierung ist möglich durch eine Reduzierung der Enzymzugabe bis auf 0,1 % vor der Nachmahlung bei gleichzeitiger Erhöhung des Grobstoffdurchsatzes. Es wird davon ausgegangen, dass bei Dauerbetrieb aufgrund einer Anreicherung von Enzymen im Kreislauf, die Enzymdosierung weiter verringert werden kann. Die Energieeinsparung kann aber insgesamt nur durch eine optimale Arbeitsweise mit den Schleifern erreicht werden. Das Enzym ist dabei nur ein Hilfsmittel.

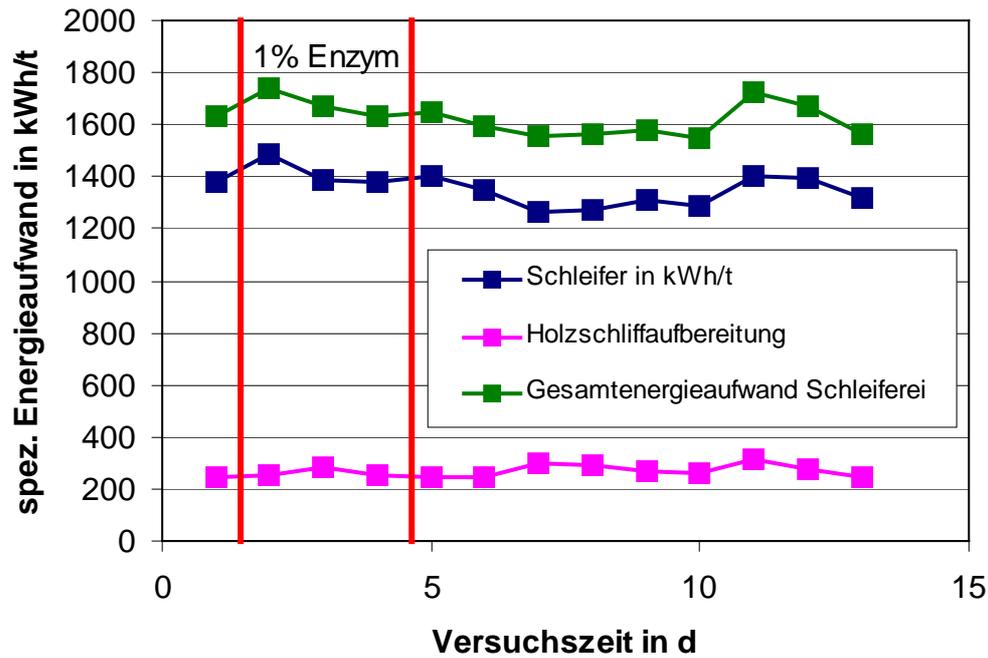


Abb. 5.3.5-1: Energieaufwand in der Schleiferei im Versuchszeitraum

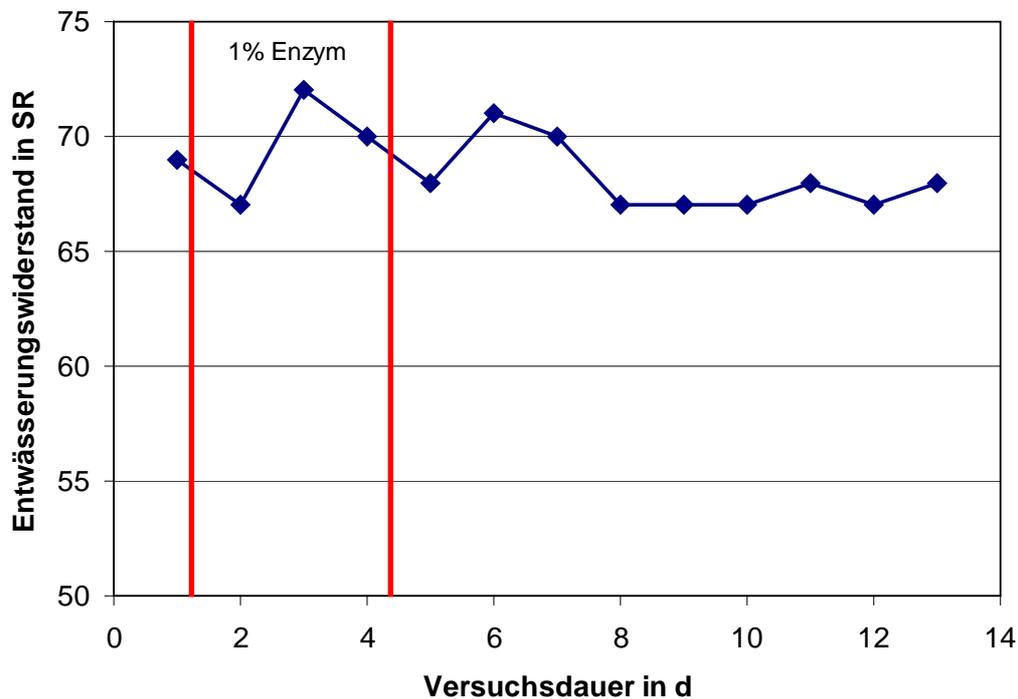


Abb. 5.3.5-2: Entwässerungswiderstand von Dünnstoff ungebleicht

Bei der Auswertung der Tagesberichte von Mochenwangen über 12 Tage (Enzymzugabe und Nachlauf) ist bei Druckschliff ungebleicht (Dünnstoff) tendenziell ein Absinken des Entwässerungswiderstandes zu beobachten.

runge widerstands SR, der Reißlänge und der Weiterreißarbeit erkennbar. Bis zu 3 Tagen nach der Enzymzugabe ist dagegen ein Anstieg der genannten Kennwerte zu verzeichnen.

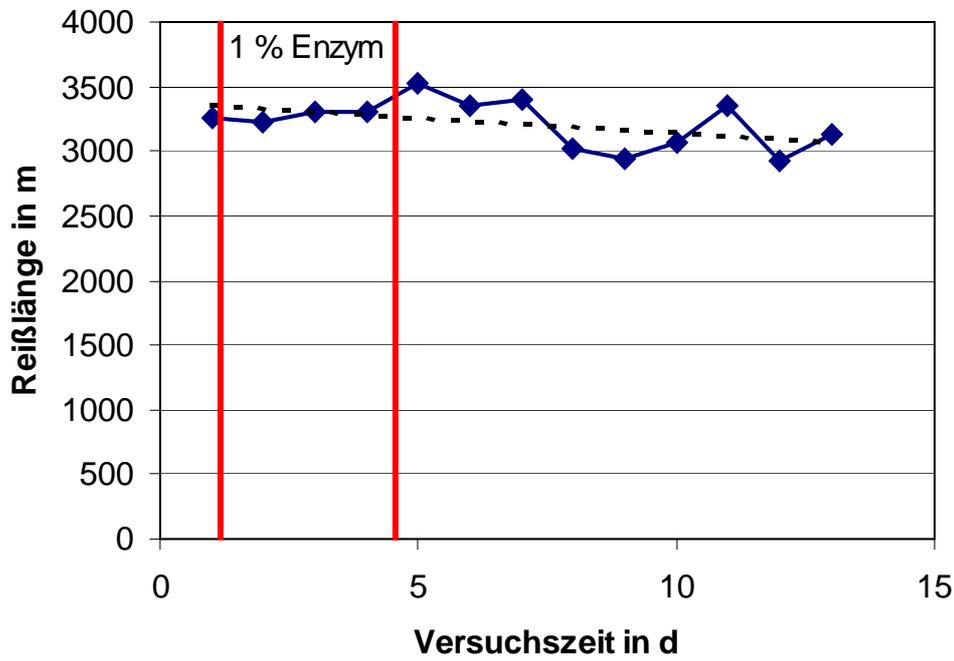


Abb. 5.3.5-3: Reißlänge von Dünnstoff ungebleicht (aus Tagesberichten)

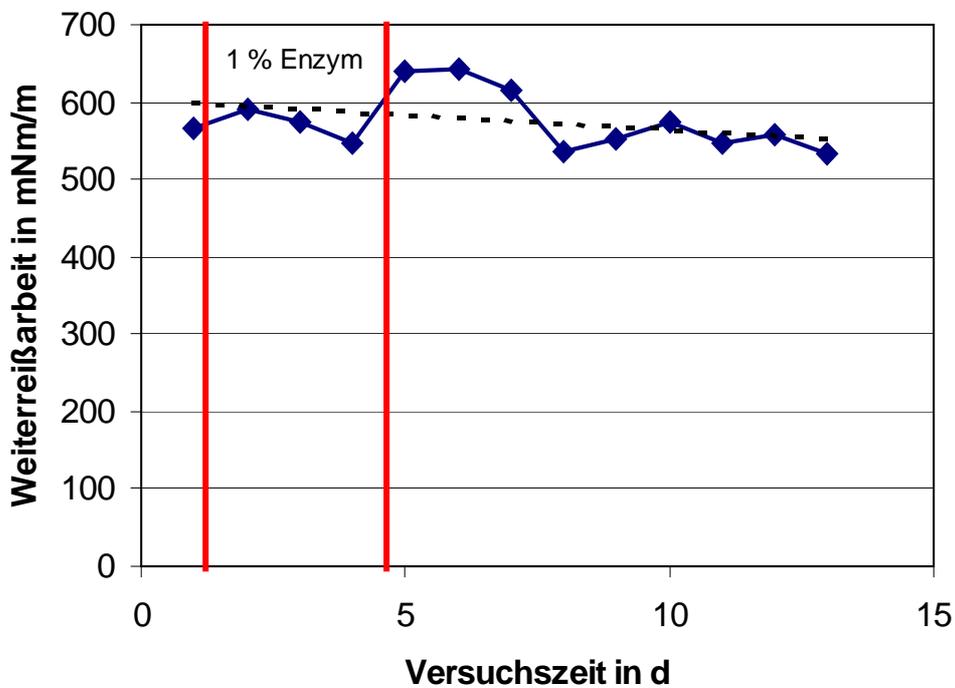
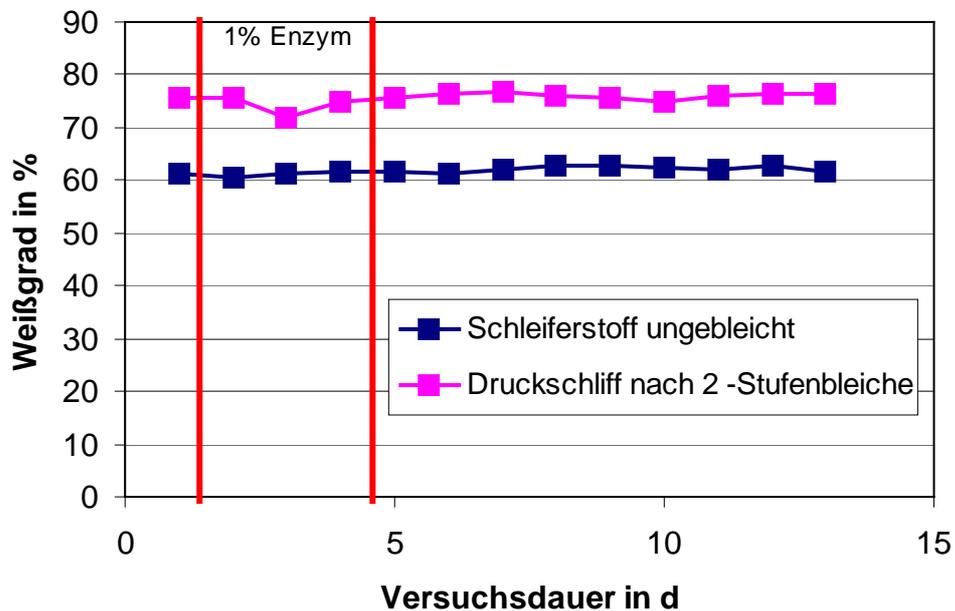


Abb. 5.3.5-4: Weiterreißarbeit von Dünnstoff ungebleicht (aus Tagesberichten)

Beim Weißgrad konnte im Versuchszeitraum und danach kein signifikanter Einfluss durch das Enzym nachgewiesen werden.



**Abb. 5.3.5-5: Weißgrad (aus Tagesberichten)**

Während des Versuches wurden aller 4 Stunden Stoffproben vom Schleiferstoff SS und Druckschliff ungebleicht DSU fraktioniert. Der DSU hatte gegenüber SS einen geringeren Splitteranteil (um ca. 75 % reduziert) und einen um 5 % höheren Feinstoffanteil. Bei der Auswertung der Tagesberichte wurden noch 3 Tage nach Beendigung der Enzymzugabe beim Dünnstoff (DSU) ein niedrigerer Feinstoffanteil und ein höherer Langfaseranteil registriert. Im Laufe der Zeit nahm dann der Feinstoffanteil wieder zu und der Langfaseranteil ab.

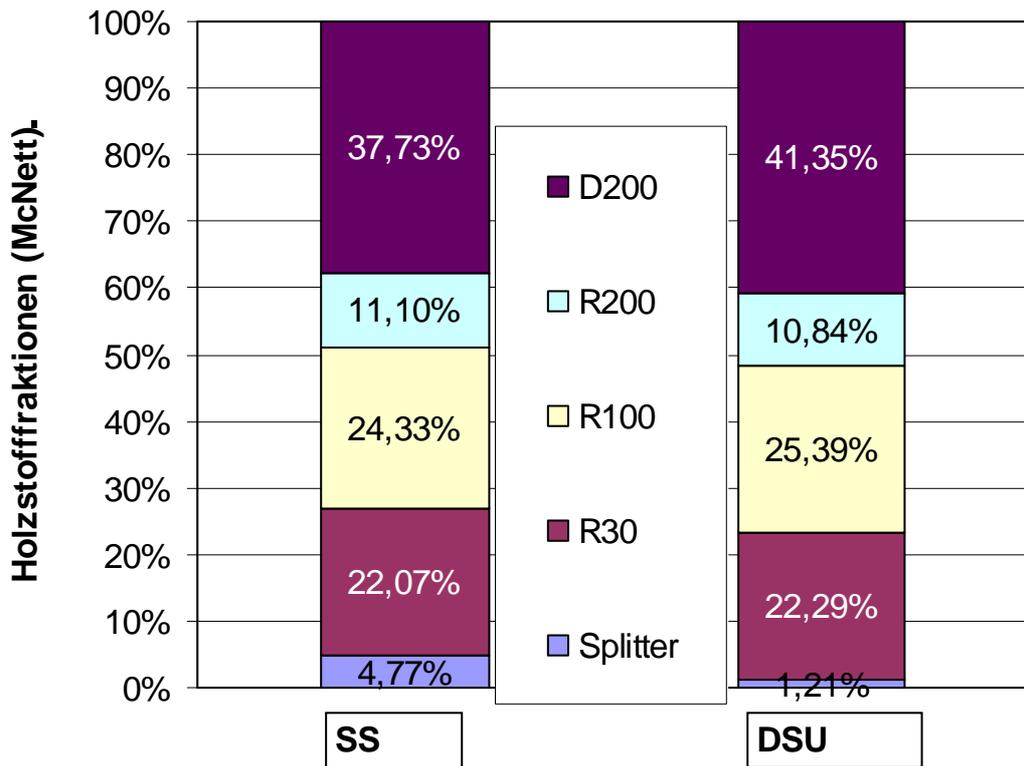


Abb. 5.3.5-6: Holzstofffraktionierung von Schleiferstoff und Druckschliff ungebleicht

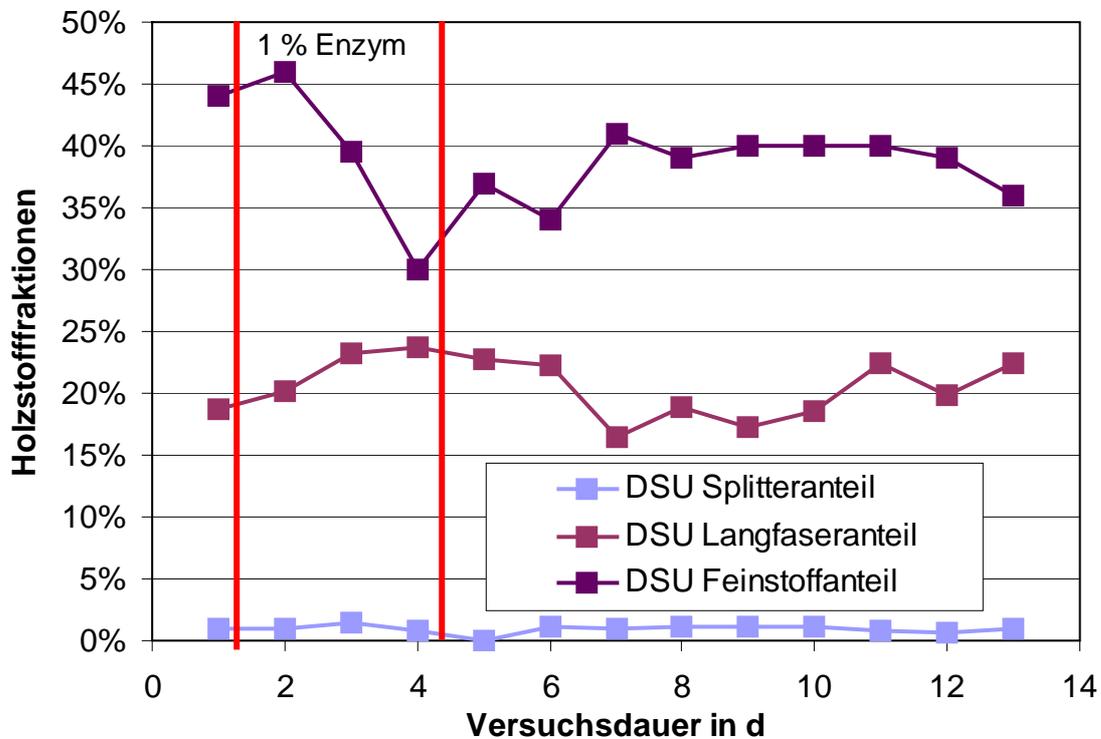
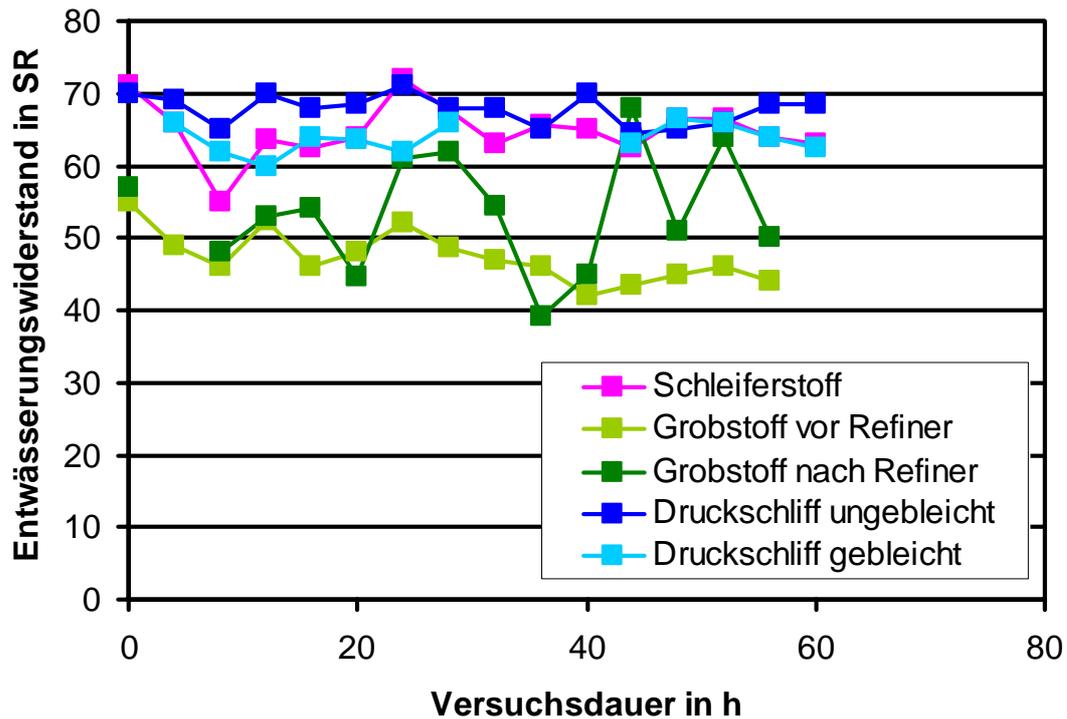


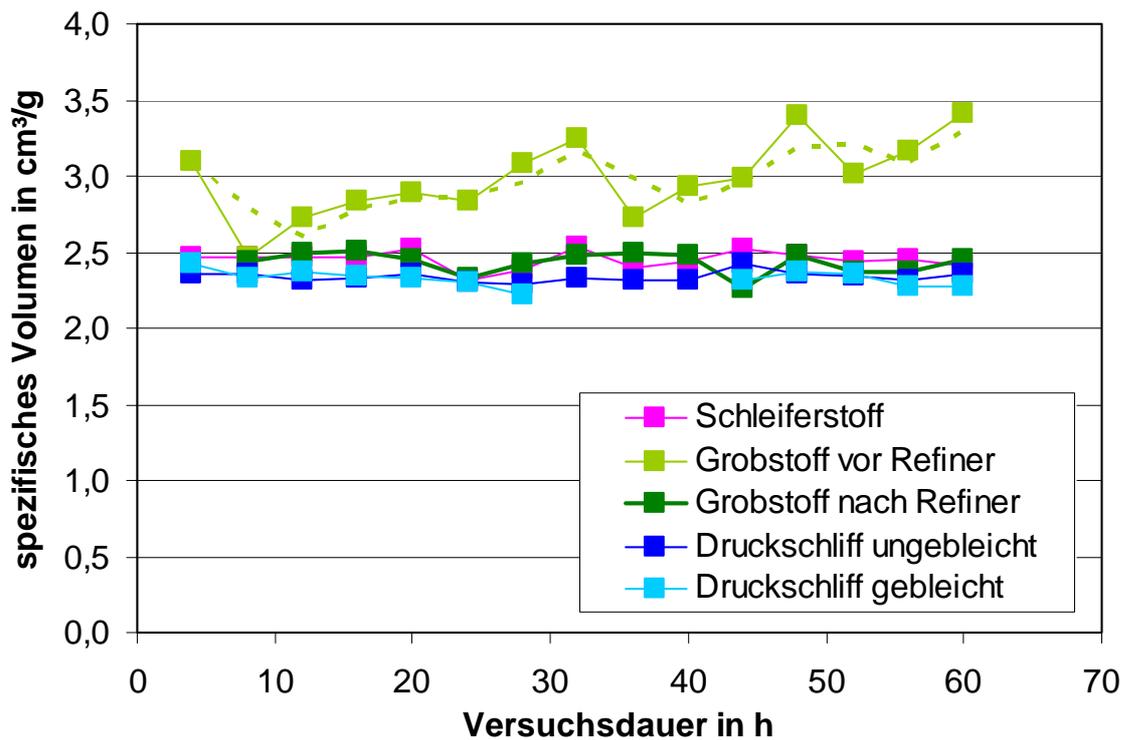
Abb. 5.3.5-7: ausgewählte Holzstofffraktionen über den Versuchszeitraum

Während der Enzymzugabe (60 h), sank der Entwässerungswiderstand beim Grobstoff vor Refiner GVR (unmittelbar nach der Einwirkungszeit) um ca. 10 SR-Punkte. Nach der Mahlung konnte beim Grobstoff nach Refiner GNR bei schwankenden Messwerten, die durch die Probenahme am Ausgang der Scheibenmühle verursacht waren, ein Ansteigen des Entwässerungswiderstandes in SR beobachtet werden. Beim Druckschliff ungebleicht DSU und beim Druckschliff gebleicht DSB im Primärstrang war der Einfluss bei leicht fallender Tendenz nicht mehr so groß.



**Abb. 5.3.5-8: Entwässerungswiderstand über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)**

Beim Grobstoff vor Refiner GVR konnte nach der Enzyminkubation eine Zunahme des spezifischen Volumens festgestellt werden. Dieses deutet auf einen Abbau von Feinstoffen hin. Bei den anderen Stoffproben konnte ein signifikanter Einfluss auf das spezifische Volumen durch die Enzymzugabe nicht ermittelt werden.



**Abb. 5.3.5-9: Spezifisches Volumen über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)**

Während des Versuches ist der Enzymeinfluss bei der Stoffprobe unmittelbar nach der Enzymdosierung, GVR, am stärksten ausgeprägt. Mit zunehmender Versuchsdauer nahm die Weiterreißarbeit bei GVR zu, dagegen trat beim Tensile-Index die erhoffte Wirkung nicht ganz ein. Bei den anderen Stoffproben sind bei den Festigkeitswerten kaum Entwicklungen festzustellen.

Weiterhin ist festzuhalten, dass durch die Nachmahlung des Grobstoffes die Kennwerte für zugförmige Belastungen erwartungsgemäß zunehmen, während die Weiterreißarbeit abnimmt (vergleiche GVR mit GNR). Auch infolge der 2-Stufen-Bleiche nehmen die Festigkeitswerte ab (Vergleiche DSU mit DBU).

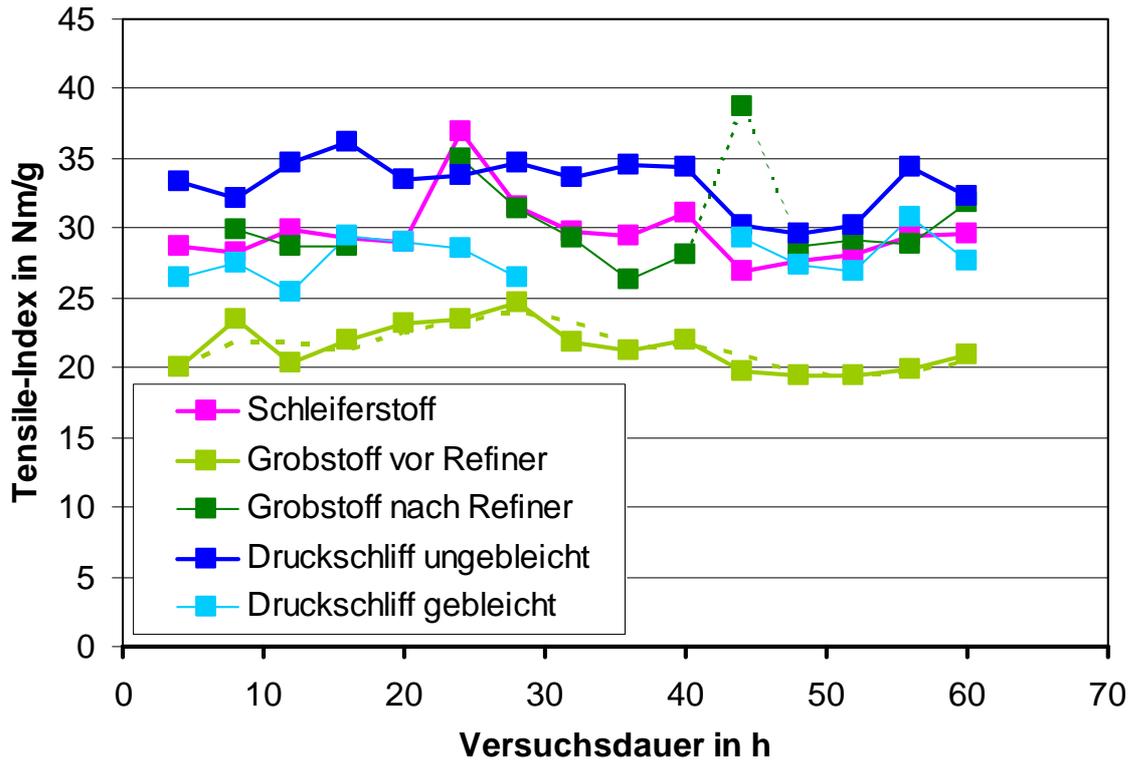


Abb. 5.3.5-10: Tensile-Index über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)

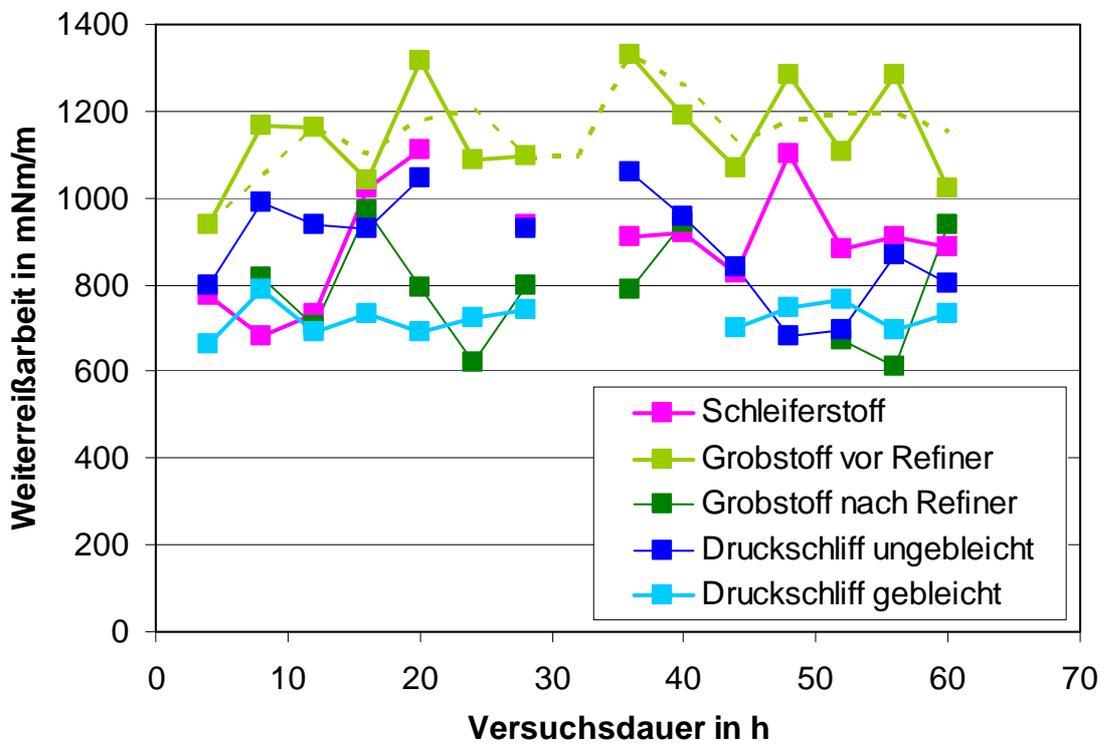


Abb. 5.3.5-11: Weiterreißarbeit über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)

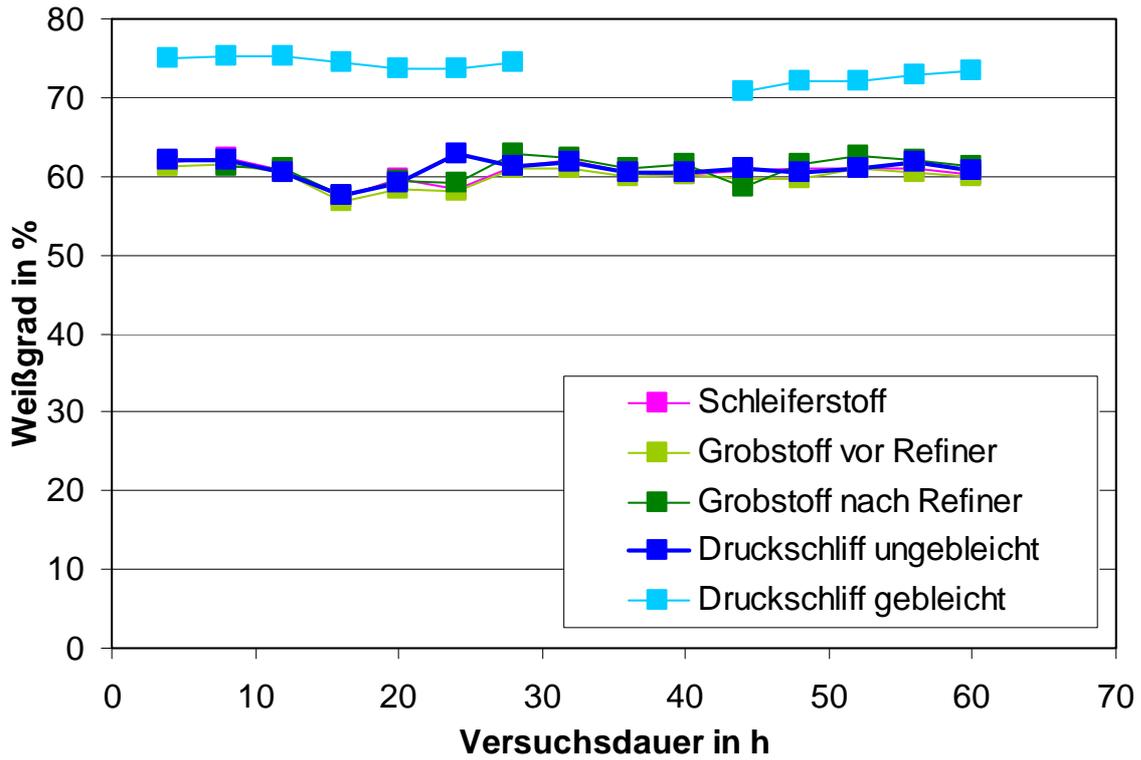


Abb. 5.3.5-12: Weißgrad über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)

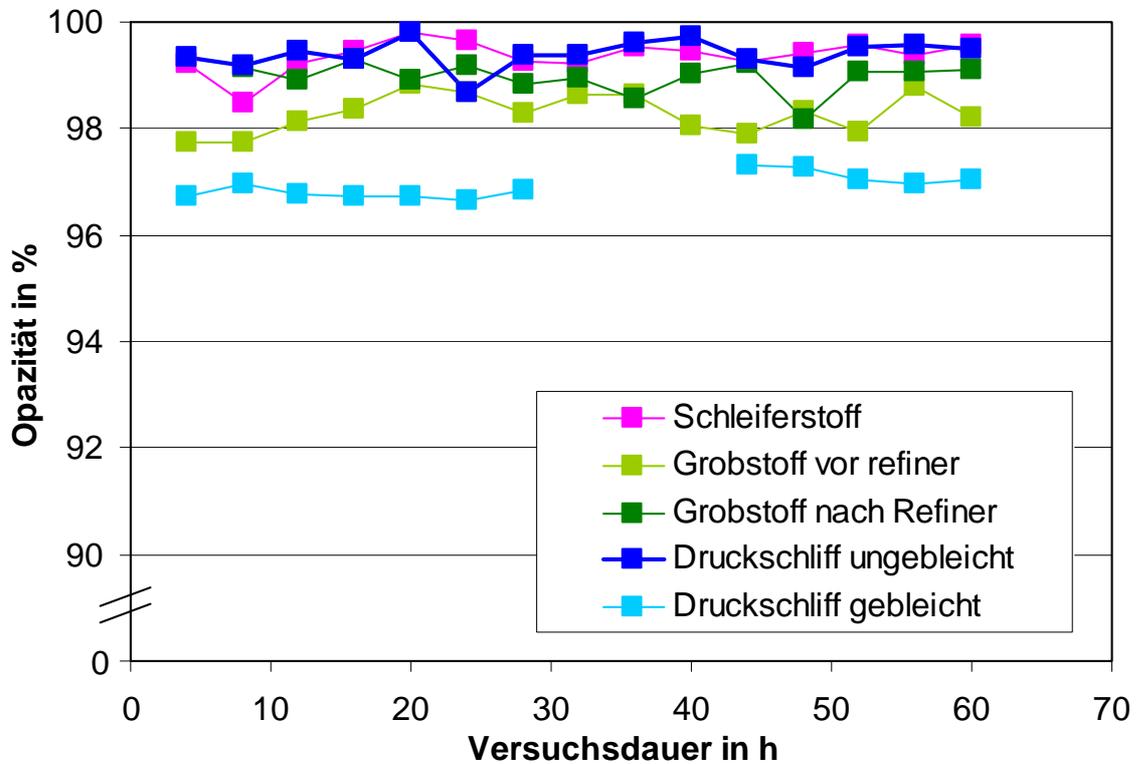


Abb. 5.3.5-13: Opazität über den Versuchszeitraum (1 % Enzym)

Einflüsse der Enzymbehandlung auf die optischen Eigenschaften wurden während des Versuchszeitraumes nicht festgestellt.

Die Frage nach der Verweildauer der Enzyme im Prozesskreislauf konnte aufgrund der hohen Verdünnung bzw. einer Enzymkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethoden nicht endgültig beantwortet werden. Selbst eine Verlängerung der Inkubationszeit am Substrat erbrachte keine aussagekräftigen Ergebnisse. Hier ist die Entwicklung genauerer Bestimmungsmethoden notwendig.

Die Messwerte unterliegen relativ starken Schwankungen, so dass eine Verifizierung der Ergebnisse bei mehrwöchigem Einsatz der Enzyme sinnvoll erscheint. Für weitere Untersuchungen besteht noch Optimierungspotenzial hinsichtlich der Anpassung der hydrolytischen Enzymkomplexe an den Produktionsprozess, der Reduzierung der Enzymzugabemenge, der Optimierung der Fahrweise der Schleifer und der Refiner im Sekundärstrang.

Es kann festgestellt werden, dass enzymatische Verfahren eine zunehmende Bedeutung für die Papierindustrie gewinnen. Wichtige Fortschritte wurden bei der Verringerung der Inkubationszeiten, der Enzymeinsatzmengen und deren Prozess-Stabilität erzielt. Es steht die vorrangige Aufgabe, den Enzymeinsatz kostengünstiger zu gestalten und die Prozesstoleranz der Enzyme zu erhöhen.

## 6 Dämmplattenherstellung unter Einsatz von Enzymen

Zunächst wurde ein Enzymscreening mit Fichten-TMP-Faserstoff durchgeführt. Dazu wurde der inkubierte Faserstoff zu Laborblättern weiterverarbeitet. Die Inkubation der Faserstoffe wurde mit verschiedenen Enzymdosierungen durchgeführt. Die Blätter wurden auf ihre Reißlänge hin getestet, um die Wirkung der Enzyme auf die Festigkeit der Blätter bzw. auf das Bindevermögen der Fasern zu analysieren und daraus Schlussfolgerungen für die weiteren Untersuchungen zu ziehen. Die Einflüsse des Prozesswassers bzw. der verschiedenen Additive (Farbe, Hydrophobierungsmittel und Fällungsmittel), die bei der Dämmplattenherstellung eingesetzt werden, wurden untersucht.

Basierend auf den Ergebnissen der Laborblattprüfung wurden die geeigneten Enzyme ausgewählt und die Inkubation von Faserstoffen für die Herstellung von Dämmplatten im Labormaßstab durchgeführt. Bei der Fermentation der Faserstoffe wurde auch die Enzymkonzentration variiert.

Zum Schluss wurde ein Upscaling-Versuche bei der Firma Gutex durchgeführt, um die Wirkung der Enzyme unter produktionsähnlichen Bedingungen zu testen.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Untersuchungen ausführlich erläutert:

### 6.1 Material, Methoden und Versuchsdurchführung zur Dämmplattenherstellung

Für die Untersuchungen während der Projektlaufzeit wurden folgende Faserstoffe und Enzymsysteme eingesetzt:

- Fichten-TMP-Faserstoff<sup>1</sup> (industriell hergestellt)
- Gutex-Faserstoff (Rafi-Faserstoff)<sup>2</sup>
- Neutrale hydrolytische Enzyme (Cellulasen, Xylanasen und deren Kombination): Ecoston N 400, Ecopulp C1 (ähnlich wie N 400, aber deutlich höhere Aktivität), Ecopulp TX200 und SIAB II
- Phenoloxydierendes Enzym: Laccase NL 51003

#### 6.1.1. Charakterisierung der verwendeten Faserstoffe

Hierbei wurden chemische und physikalische Merkmale der beiden verwendeten Faserstoffe ermittelt:

- Cellulosebestimmung nach FHIS 256
- Ligninbestimmung nach WIHS 177

---

<sup>1</sup> Hierbei handelt es sich um Faserstoff für Faserplatten, welcher im Gegensatz zu TMP-Faserstoffen für Papiere nur in einer Stufe zerfasert wurde.

<sup>2</sup> Hierbei handelt es sich um Faserstoff für Dämmplatten, die 2stufig nach TMP-Verfahren (Kombination Defibrator und Rafinator) zerfasert wurde.

- Gesamtzuckerbestimmung nach WIHS 177
- Prüfung von Papier und Pappe , Bestimmung des Glührückstandes nach DIN 54370, 2007-06
- Kaltwasserextraktbestimmung
- pH-Wert-Ermittlung
- Faserstoffe - Bestimmung des Entwässerungsverhaltens - Teil 1: Schopper-Riegler-Verfahren nach DIN ISO 5267-1, 2000-10 -1
- Siebfraktionierung des Faserstoffes nach FHIS 164
- Zugfestigkeit bzw. Reißlänge der Laborblätter nach DIN EN ISO 1924-2

#### **6.1.1.1 Bestimmung des Cellulosegehaltes**

Die Bestimmung der Cellulose erfolgte nach Werkstandard FHIS 256. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Lignin mit alkoholischer Salpetersäure zu auswaschbarem Nitrolignin.

Zunächst wurde die Nitrier Mischung aus vier Volumenanteilen (160 ml) 96%igem Äthylalkohol und einem Volumenanteil (40 ml) Salpetersäure hergestellt. Diese wurde in einen 300 ml Erlenmeyerkolben gegeben, welche ein Gramm der zu untersuchenden Probe enthielt, und dieses eine Stunde lang mit dem Nitriergerät unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde der gesamte Inhalt mit einer Vakuumpumpe durch eine Fritte der Größe 1 G 3 filtriert. Der Rückstand wurde wiederum mit 25 ml Nitrier Mischung in einen Erlenmeyerkolben zurückgespült und zweimal im Rückfluss gekocht und filtriert.

Die zurückgebliebene Cellulose wurde zunächst mit Alkohol und dann mit heißem Wasser gewaschen. Danach wurde die Cellulose mit 100 ml heißem Wasser im Erlenmeyerkolben 30 Minuten unter Rückfluss gekocht, durch die Fritte mit der Vakuumpumpe filtriert und der Rückstand mit heißem Wasser behandelt. Schließlich wurde die Fritte im Trockenschrank bei 105 °C über Nacht getrocknet und die Massedifferenz ermittelt.

#### **6.1.1.2 Bestimmung des Ligningehaltes**

Die Bestimmung des Ligningehaltes erfolgte nach WIHS 177. Dazu wurde jeweils 1 g des extrahierten Analysenmaterials aus der Bestimmung der extrahierbaren Anteile zunächst mit 20 ml 67%iger Schwefelsäure versetzt und 16 Stunden stehen gelassen. Danach wurde das Gemisch zusammen mit 0,65 Liter destilliertem Wasser in einen 1000 cm<sup>3</sup>-Rundkolben gegeben, fünf Stunden unter Rückfluss gekocht und in einen 1000 cm<sup>3</sup>-Maßkolben gegeben. Dieser wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und anschließend wiederum 16 Stunden stehen gelassen. Dann wurde das Lignin durch eine Fritte der Größe 1 G 4 mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes wurden von dem Filtrat 0,2 Liter entnommen. Das Lignin wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und gewogen.

### **6.1.1.3 Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes**

Das Prinzip bei der Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes besteht in der Reduktion von reduzierenden Verbindungen, in diesem Falle Zucker, zu Kupferoxid ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) in der Anwesenheit von Fehlingscher Lösung.

Von der 0,2 Liter-Lösung, die bei der Ligninbestimmung zurückgestellt wurden, wurden 20 ml in einen 300  $\text{cm}^3$ -Erlenmeyerkolben pipettiert. Dann wurden jeweils 10 ml Fehlingscher Lösung zugesetzt, das Gemisch drei Minuten gekocht und anschließend abgekühlt. Der gebildete Niederschlag von  $\text{Cu}_2\text{O}$  wurde durch einen Filtertiegel der Größe 1 G 4 von der übrigen Lösung abgetrennt. Anschließend musste der Niederschlag mit destilliertem Wasser von Cu-Ionen befreit werden. Der Niederschlag wurde dann mit 0,5 ml konzentrierter Salpetersäure und zweimal mit 1 ml 2,5 M Salpetersäure aufgelöst und mit 50 ml destilliertem Wasser nachgespült. Danach wurde mit Ammoniak ein pH-Wert von 8 eingestellt. Durch Zugabe einer Spatelspitze Murexidgemisch färbte sich die Lösung grün. Schließlich wurde mit 0,02 M Chelaplex III-Lösung titriert, bis die Lösung sich violett färbte.

Aus dem Verbrauch an Chelaplex-Lösung konnte der Gesamtzuckergehalt der Probe des jeweiligen Bestimmungspunktes ermittelt werden.

### **6.1.1.4 Bestimmung des Kaltwasserextraktes**

Eine 5 g atro entsprechende Faserstoffmenge (0,1 mg genau gewogen) wurde mit destilliertem Wasser in einem 250 ml Erlenmeyerkolben zu einem Gesamtgewicht von 155 g versetzt und für 24 Stunden bei 20 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Faserstoff über einen vorher getrockneten und ausgewogenen Filtertiegel abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen, danach bei 103 °C bis zur Massekonstanz getrocknet. Aus der Gewichtsabnahme wurde der Gehalt an Kaltwasserextrakt ermittelt.

### **6.1.1.5 Bestimmung des pH-Wertes des Faserstoffes**

Eine 5 g atro entsprechende Menge Faserstoff, der vorher fein gemahlen wurde, wurde mit destilliertem Wasser bis zu einem Gesamtmasse von 155 g versetzt und bei 20 °C für 24 h geschüttelt. Anschließend wurde im wässrigen Auszug der pH-Wert mittels eines elektrischen pH-Meßgerätes gemessen.

### **6.1.1.6 Aufnahme der Siebkennlinie nach FHIS 164**

Die Fraktionsverteilung wurde mit Hilfe von Siebeinsätzen unterschiedlicher Maschenweite 4; 2; 1,6; 1,0; 0,63; 0,5; 0,315; 0,1 mm bestimmt. Dabei werden 10 g Faserstoff auf das oberste Sieb mit der größten Maschenweite aufgegeben und durch Schwingbewegungen und Verteilungshilfen vereinzelt, so dass feinere Partikel in die unteren Ebenen gelangen. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung. Aus der errechneten Siebkennlinie lassen sich Korngrößenintervall, mittlere Korngröße, Grobgut- und Feingutanteil bestimmen.

### **6.1.1.7 Bestimmung der Zugfestigkeit von Laborblättern in Anlehnung an DIN 53112**

Die Festigkeitseigenschaften der Prüfblätter wurde im Zugversuch nach DIN 53112 auf einer Universalprüfmaschine der Fa. Hegewald und Peschke ermittelt. Dabei beschreibt die ermittelte Reißlänge die Kraft, die benötigt wird, um eine Probe (durch die Masse des Eigengewichtes) auseinander zu reißen. Sie ist abhängig vom Bindungsvermögen der Einzelfasern im Verband. Die Prüfungen erfolgten bei Prüfgeschwindigkeiten von 0,8...1 mm/min.

## **6.1.2. Versuchsdurchführung zur Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung**

### **6.1.2.1 Inkubation des Faserstoffes unter Einsatz von Frischwasser**

Mit Faserstoffinkubation meint man die Behandlung des Faserstoffes mit Enzymen, um eine enzymatisch katalysierte Reaktion zu ermöglichen. Wichtige Einflussgrößen dabei sind die Inkubationstemperatur und -zeit, der pH-Wert und die Enzymaktivität. Die beiden letzten Größen können durch Zugabe von Pufferlösungen eingestellt werden.

Die Wirkung der Enzyme auf den Fichten-TMP-Faserstoff und auf die Festigkeit der daraus hergestellten Laborblätter wurde untersucht. Dabei wurde die Enzymmenge bezogen auf den Faserstoff und die Inkubationsdauer variiert. Die Inkubation der Faserstoffe wurde wie folgt durchgeführt:

600 ml Pufferlösung in einem Glasgefäß wurden in einem temperierten Wasserbad auf die vorgesehene Temperatur vorerwärmt. Dann wurden die benötigten Enzymmenge (bezogen auf 30 g Faserstoffe) hinzugefügt (für Referenzversuch wurde kein Enzym eingesetzt). Anschließend kamen 30 g atro Faserstoff hinzu und das Gemisch wurde ständig gerührt.

Folgende Inkubationsbedingungen wurden gewählt:

- pH-Wert der Pufferlösungen:
  - pH 4,5 für Laccase und SIAB II und
  - pH 7 für TX 200 und N 400
- Inkubationstemperatur:
  - T = 70 °C für TX 200 und
  - T = 50 °C für alle anderen Enzyme
- Inkubationsdauer: 10, 20, 40 und 60 Minuten
- Enzymkonzentration: 1; 5; 10 und 20 % bezogen auf Faserstoffmenge (atro) bzw. 0,05; 0,25; 0,5 und 1 % bezogen auf Puffer-Enzym-Lösung

Die Referenzproben (RP) wurden unter den gleichen Bedingungen behandelt und hergestellt. Statt Enzym-Puffer-Lösung wurde hierbei nur Pufferlösung eingesetzt.

Der so behandelte Faserstoff wurde für die Herstellung von Laborblättern verwendet. Die Faserstoff-Suspension wurde unmittelbar nach der Inkubation auf 20 °C abgekühlt (Verdünnung mit kaltem Wasser) und direkt danach zu Laborblättern weiterverarbeitet. Die Herstellung der Laborblätter wurde in Anlehnung an die DIN EN ISO 5269-2, 2005-03 durchgeführt. Bei dem Ra-

pid-Köthen-Verfahren werden Laborblätter gefertigt, deren Festigkeit lediglich aus Bindekräften die zwischen den Fasern wirken resultiert, ohne dass Fremdbindemittel verwendet werden. Durch Prüfen spezieller Eigenschaften dieser Blätter lässt sich die Qualität der aufgeschlossenen Fasern charakterisieren. Die Blätter hatten auf Grund des wesentlich geringeren Schopper- Riegler-Wertes des eingesetzten Faserstoffes gegenüber Holzstoff und TMP-Faserstoff der Papierindustrie ein Masse von 5 g pro Blatt.

Zur Herstellung eines Faserblattes wurde 5 g (otro) Faserstoff in 1000 ml Wasser verteilt und aufgeschlagen. Die Bildung der Blätter erfolgte automatisch durch Entwässerung über einem Sieb. Die Trocknung der Blätter erfolgte bei 104 °C.

Die Bestimmung von Zugfestigkeit und Reißlänge der Laborblätter wurde in Anlehnung an DIN 53112 mit einer Universal-Prüfmaschine der Fa. Hegewald und Petschke durchgeführt.

### **6.1.2.2. Inkubation von Faserstoff unter Einsatz von Prozesswasser**

In diesen Versuchen wurde die Inkubation von Fichten-TMP-Faserstoffen unter Einsatz von Prozesswasser der Fa. Gutex untersucht

Diese Untersuchungen wurden sowohl mit Fichte-TMP-Faserstoff als auch mit Gutex-Faserstoff durchgeführt. Die Inkubationen und die Laborblätterherstellung erfolgten wie bei der Inkubation der Faserstoffe mit Pufferlösung. Der Unterschied bestand darin, dass hier Prozesswasser eingesetzt und der pH-Wert der Faserstoffsuspension nicht geregelt wurde. Auch hier wurde Enzymkonzentration variiert.

Folgende Inkubationsbedingungen wurden gewählt:

- pH-Wert der Pufferlösungen:
  - pH 4,5 für Laccase und SIAB II und
  - pH 7 für Tx200 und N400
- Inkubationstemperatur:
  - T = 70 °C für Tx200 und
  - T = 50 °C für alle anderen Enzyme
- Enzymkonzentration: 1; 5; 10 und 20 % bezogen auf Faserstoffmenge (otro)

Die Referenzproben (RP) wurden unter den gleichen Bedingungen nur mit Prozesswasser behandelt und hergestellt.

### **6.1.2.3 Untersuchung des Einflusses von Prozesswasser auf die Enzymaktivitäten**

Bei der Herstellung von Papier sowie Dämmplatten nach dem Nassverfahren wird das Prozesswasser im Kreislauf eingesetzt, was zur Anreicherung gelöster Stoffe (gelöste Bestandteile des Holzes, Additive) führt. Enzyme, die der Stoffsuspension zugesetzt werden müssen eine möglichst hohe Stabilität und Toleranz gegenüber diesen Stoffen aufweisen. Die hier durchgeführten Analysen sollen Auskunft über die Stabilität der verwendeten Enzymsysteme

geben. Dabei wurden prozessnahe Bedingungen gewählt. Für die Versuche wurde Prozesswasser aus der Dämmplattenproduktion der Fa. Gutex eingesetzt.

Das Mischungsverhältnis Enzym: Prozesswasser betrug 1 : 400 (z. B. 10 µl Enzym + 3990 µl Prozesswasser). Als Kontrolle wurde anstelle des Prozesswassers Puffer eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Versuchsansätze bis zum Vermessen der Aktivitäten auf Eis gestellt.

Da die eingesetzten Enzymkonzentrate unterschiedliche pH- und Temperatur-Optima aufweisen, wurden die entsprechenden Parameter für die Inkubation sowie Aktivitätsmessung für das jeweilige Konzentrat folgendermaßen eingestellt:

- 1) SIAB 03 Konzentrat vom August 2006 (= SIAB II)  
Inkubation und Vermessung der Aktivität mit Citratpuffer (pH 4,5) & bei 50 °C
- 2) Ecostone N 400 vom März 2007  
Inkubation und Vermessung der Aktivität mit Phosphatpuffer (pH 7) & bei 50 °C
- 3) Ecopulp TX 200 vom März 2007  
Inkubation und Vermessung der Aktivität mit Phosphatpuffer (pH 7) & bei 70 °C

Um sicher zu gehen, dass vom Prozesswasser kein extremer pH-Wert eingebracht wird, wurden das Prozesswasser und die jeweilige Kombination mit dem Enzym vermessen. Das Prozesswasser besitzt einen schwach sauren pH-Wert, der durch Zugabe aller Enzyme leicht sinkt.

**Tab. 6.1.2.3-1: Bestimmung der pH-Werte der Enzym : Prozesswasser-Mischungen (1 : 400)**

|                    | pH-Wert |
|--------------------|---------|
| Prozesswasser (PW) | 5,03    |
| PW + SIAB II       | 4,81    |
| PW + N 400         | 4,82    |
| PW + TX-200        | 4,76    |

Durch das hohe Verdünnungsverhältnis (1:400) der Proben konnten nicht alle im Konzentrat enthaltenen Einzelenzymaktivitäten vermessen werden. Bei SIAB II wurden die Endoglucanase- und die Xylanaseaktivität gemessen, während bei den Enzymen Ecostone N 400 und Ecopulp TX-200 jeweils nur eine der beiden Aktivitäten nachweisbar waren

#### **6.1.2.4 Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung im Labormaßstab**

Zur Untersuchung der Wirkung der Enzyme auf die Eigenschaften der Dämmplatten, wurden zunächst Dämmplatten (40x40 cm) im Labormaßstab (Batch) im Holztechnikum der TU-Dresden hergestellt. Bei diesen Versuchen wurden Fichten-TMP-Faserstoff und Frischwasser eingesetzt. Die Abbildung 6.1.2.4-1 zeigt den Herstellungsablauf für diese Werkstoffe.

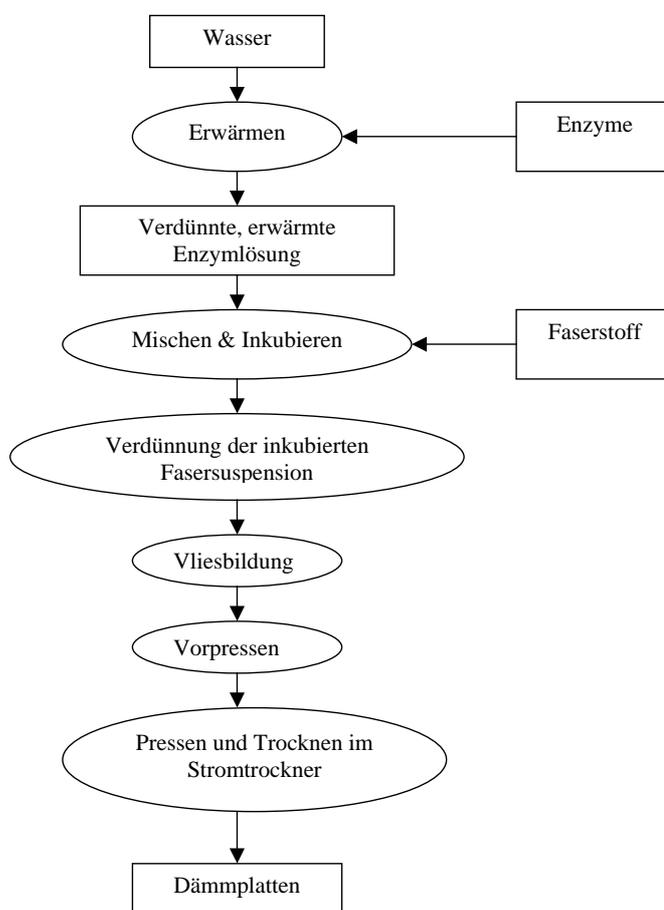
Herstellungsparameter:

- Enzym: TX 200, N 400, SIAB II
- Enzymkonzentration: 1 %, 5 % und 10 % bezogen auf Faserstoffmenge

- Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer: 50 °C und 20 Minuten
- pH-Wert der Fasersuspension: ca. 6 (wurde einmalig eingestellt)
- Zielrohddichte: 140 kg/m<sup>3</sup> und 240 kg/m<sup>3</sup>
- Kalibriertemperatur und -zeit: 180 °C und 15 Minuten
- Trocknungstemperatur im Trockenschrank/Stromtrockner: 150 °C

Es wurden folgende Prüfungen durchgeführt:

- Rohddichte nach EN 323
- Biegefestigkeit nach EN 310 (BF)
- 2 h und 24 h Wasseraufnahme (massebezogen) nach EN 317 (komplett eingetaucht) (w2h, w24h)



**Abb. 6.1.2.4-1: Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung im Labormaßstab**

### 6.1.2.5 Upscaling von Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung bei Firma Gutex

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen sollten in einem größeren Maßstab verifiziert werden. Dazu wurde im November 2007 ein Upscaling-Versuch zur Faserstoffinkubation und Dämmplattenherstellung bei der Firma Gutex durchgeführt. Die Inkubation der Faserstoffe erfolgte hier unter produktionsnahen Bedingungen im 1 m<sup>3</sup>-Maßstab. Dabei wurden Faserstoff-

fe aus dem Produktionsprozess eingesetzt. Zur Dämmplattenherstellung wurde eine kontinuierlich arbeitende Dämmplattenproduktionsanlage eingesetzt.

Es wurden folgende Faserstoffsuspensionen eingesetzt:

- Faserstoffsuspension ohne Additive (4%ig),
- Faserstoffsuspension mit Additiven (3%ig; mit Farbe, Fällungs- und Hydrophobierungsmittel)

Es wurden jeweils ca. 20 kg Faserstoff (otro) pro Variante eingesetzt.

Folgende Enzyme wurden für die Versuche verwendet:

- Ecopulp TX 200
- Ecostone C1, (ähnlich wie N 400, nur mit höherer Aktivität – daher auch niedrigerer Konzentration)
- SIAB II
- Enzymdosierung: 0,5 und 1 % Enzymlösung bezogen auf atro Faserstoffmenge

**Tab. 6.1.2.5-1: Varianten zur Herstellung von Dämmplatten bei Gutex**

| Variante | Additive | Enzymlösung (%)    | Faserstoffmenge kg | Ist-Temperatur °C | Ist-pH-Wert |
|----------|----------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------|
| 1        |          | ohne               | 20                 | 52,5              | 5,14        |
| 2        |          | 0,5 % Ecostone C1  | 20                 | 49,5              | 5,1         |
| 3        |          | 1 % Ecopulp TX 200 | 20                 | 47,1              | 5,04        |
| 4        |          | 1 % SIAB II        | 20                 | 49,6              | 5,1         |
| 5        | x        | ohne               | 20                 | 48                | 5,03        |
| 6        | x        | 1 % Ecopulp TX 200 | 20                 | 50,7              | 5,04        |
| 7        | x        | 0,5 % Ecostone C1  | 20                 | 50                | 5,08        |
| 8        | x        | 1 % SIAB II        | 20                 | 50,2              | 5,12        |



**Abb. 6.1.2.5-1 und 2: kontinuierliche Technikumsanlage zur Dämmplattenherstellung bei der Firma Gutex**

Die Fasersuspensionen wurden mit Prozesswasser in einer 1 m<sup>3</sup> Bütte auf einen Trockengehalt von 2 % verdünnt. Die nötige Enzymmenge wurde der Suspension hinzugefügt. Die gesamte Suspension wurde während der Inkubationsdauer von 20 Minuten ständig gerührt. Anschließend wurde die Fasersuspension mit einer Pumpe dem Stoffauflauf der kontinuierlichen Dämmplattenanlage zugeführt. Nach dem Stoffauflauf wurde das Wasser mit Vakuum abgesaugt. Die Dicke des Vlieses wurde durch ein Kalibrierband eingestellt. Pro Versuchsvariante wurden 7 Platten (60 x 60 cm) hergestellt, die bei einer Temperatur von 150 °C in einer Trockenkammer getrocknet wurden.

An den Dämmplatten wurden folgende Parameter bestimmt:

- Rohdichte nach EN 323
- Biegefestigkeiten nach EN 310 (BF)
- Druckfestigkeiten nach EN 826 (DF)
- Querkzugfestigkeiten nach EN 319 (QF)
- Wasseraufnahme, flächenbezogen nach EN 1609 (1 cm eingetaucht) (WA)
- 2 h und 24 h Wasseraufnahme, massebezogen nach EN 317 (komplett eingetaucht) (w2h, w24h),
- 2 h und 24 h Dickenquellung nach EN 317 (komplett eingetaucht) (d2h, d24h),
- Wärmeleitfähigkeit (WLF) nach DIN 52612 – 1

#### **6.1.2.6 Analyse der Enzym-Restaktivitäten bei der Dämmplattenherstellung im Upscalingversuch**

Ziel der Untersuchungen war hier die Analyse der Enzymaktivitäten im Ablaufwasser **nach** der Plattenherstellung im Hinblick auf eine Kreislaufnutzung der Enzyme und eine damit verbundene Kostensenkung.

Im Upscalingversuch zur Herstellung der Dämmstoffplatten bei der Fa. Gutex ergaben sich sehr hohe Verdünnungen von 1:5.000 bis 1:50.000. Daher waren nur ausgewählte Bestimmungsmethoden, wie die Bestimmung der Xylanase- und Azo-CMC-Aktivität geeignet (siehe Kap. 4.3)

#### **6.1.2.7 Bestimmung des chemischen und biologischen Sauerstoffbedarf des Abwassers (CSB & BSB<sub>5</sub>)**

##### **Chemischer Sauerstoffbedarf CSB nach LCK 014:**

Das Prinzip zur Bestimmung des CSB besteht in der Reaktion oxidierbarer Stoffe mit schwefelsaurer Kaliumdichromatlösung in Gegenwart von Silbersulfat als Katalysator. Chlorid wird mit Quecksilbersulfat maskiert. Ausgewertet wird die Grünfärbung des Cr<sup>3+</sup>. Zur Bestimmung wurde das Abwasser mit den gelösten und abgebauten Bestandteilen durch Filtrieren vom übrigen Faserstoff getrennt. Die oxidierbaren Stoffe setzen sich in diesem Fall aus allen ohnehin in der Enzymlösung gelösten und den durch das jeweilige Enzym abgebauten Stoffen zusammen.

Zur Durchführung der Bestimmung wurden die Küvetten der Firma LANGE verwendet. Zunächst wurde jeweils 1 ml der zu untersuchenden Lösung des jeweiligen Bestimmungszeitpunktes in eine Küvette gegeben. Anschließend wurde der gesamte Küvetteninhalt durch Schwenken gemischt und in dem Thermostat „LT 100“ bei 148 °C zwei Stunden gekocht, die Küvette entnommen, vorsichtig geschwenkt, auf Raumtemperatur abgekühlt und in das Bestimmungsgerät „Lasa 100“ eingesetzt.

#### **BSB<sub>5</sub>-Küvettestest:**

Die Bestimmung des Biochemischen-Sauerstoff-Bedarfs mit Küvettestestsätzen lehnt sich an den Verdünnungs-BSB nach DIN EN 1899-1 an. Das verwendete Verdünnungswasser entspricht praktisch den Forderungen der Normmethode, nicht aber die Art und Weise der Bestimmung der Sauerstoffkonzentration. Der Verdünnungs-BSB nach DIN EN 1899-1 verlangt explizit die Verwendung entweder der iodometrischen Titration oder der amperometrischen Sauerstoffsonde. Beim BSB-Küvettestest wird die Konzentrationsbestimmung aber photometrisch durchgeführt.

Die Bestimmung mit dem Küvettestestsatz 00687 läuft wie folgt ab: Die verdünnte Probe und das Verdünnungswasser müssen vor und nach der Inkubation auf ihren Sauerstoffgehalt untersucht werden. Ein Teil wird für die Anfangsbestimmung verwendet und dann verworfen, der Rest wird in den entsprechenden Gefäßen bei 20 °C für 5 Tage inkubiert und dann für die Endkonzentrationsbestimmung verwendet. Für das BSB Messergebnis sind damit insgesamt vier photometrische Bestimmungen notwendig.

#### **6.1.2.8 Untersuchung des Einflusses der Enzymdosierung und der Additive auf die Eigenschaften von Dämmplatten**

Die Ergebnisse der Upscaling-Untersuchungen haben gezeigt, dass der Enzym Tx200 der am besten geeignete von allen eingesetzten Enzyme ist. Für die weiteren Untersuchungen wurde nur dieses Enzym verwendet.

Ziel dieser Untersuchungen war

- die mögliche Reduzierung der Enzymmenge, ohne dass die Eigenschaften der Platten entscheidend zu verringern und/oder
- die mögliche Substitution der Additive, die bei der Firma Gutex während der Plattenherstellung eingesetzt wurden.

Die Faserstoffe wurden unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- Inkubationstemperatur: 50 °C
- Inkubationsdauer: 20 Minuten
- Enzymkonzentration: 1 %, 0,5 % und 0,1 % bezogen auf die Faserstoffmenge

Anteil der Additive:

- Hydrophobierungsmittel: 0,5 % Paraffinemulsion (0,25 % Festparaffin auf atro Faserstoff)
- Farbelösung: 0,06 % bezogen auf die atro Faserstoff

- Fällungsmittel (Aluminiumsulfat  $Al_2(SO_4)_3$ ): 1,1 % bezogen auf die Faserstoffmenge

**Tab. 6.1.2.8-1 : Versuchsprogramm zur Reduzierung der Enzymkonzentration**

|         | Additive        |           |                | Enzym       |
|---------|-----------------|-----------|----------------|-------------|
|         | Hydrophobierung | Farbstoff | Fällungsmittel | Anteil in % |
| Var. 1  |                 |           |                | 0           |
| Var. 2  |                 |           |                | 0,1         |
| Var. 3  |                 |           |                | 0,5         |
| Var. 4  |                 |           |                | 1           |
| Var. 5  | x               |           | x              | 1           |
| Var. 6  |                 | x         |                | 1           |
| Var. 7  |                 |           | x              | 1           |
| Var. 8  | x               | x         | x              | 1           |
| Var. 9  | x               | x         | x              | 0,5         |
| Var. 10 | x               | x         | x              | 0           |

Die Dämmplatten aus den inkubierten Faserstoffen wurden mit den folgenden Herstellungsparametern hergestellt:

- Zielrohddichte: 240 kg/m<sup>3</sup>
- Kalibriertemperatur und -zeit: 180 °C und 15 Minuten
- Trocknungstemperatur im Trockenschrank/Stromtrockner: 150 °C

Die Werkstoffe wurden auf folgende Merkmale hingepüft:

- Rohddichte nach EN 323
- Biegefestigkeiten nach EN 310 (BF)
- 2 h und 24 h Wasseraufnahme, massebezogen nach EN 317 (komplett eingetaucht) (w2h, w24h)

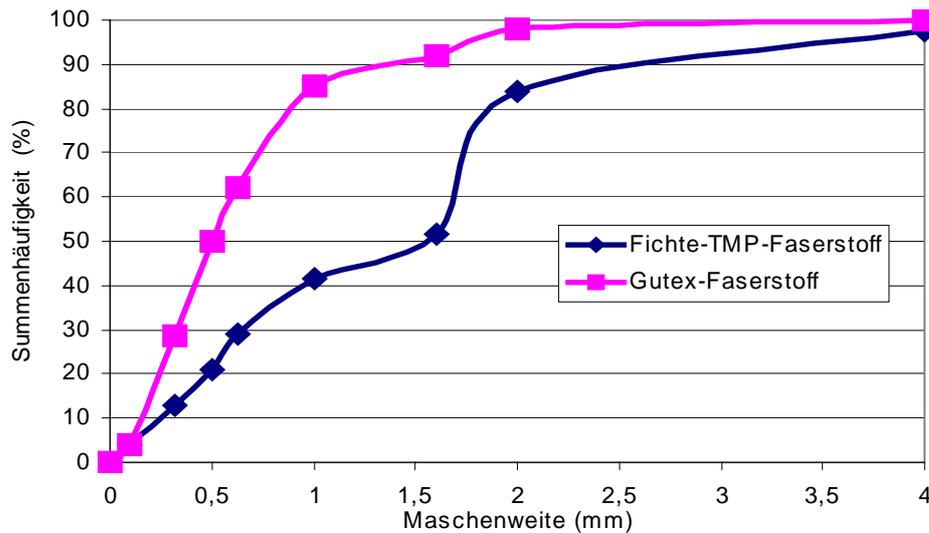
## 6.2 Ergebnisse der Dämmplattenherstellung unter Einsatz von Enzymen

### 6.2.1 Eigenschaften der verwendeten Faserstoffe

Die Ergebnisse der Bestimmungen der chemischen und physikalischen Merkmale der eingesetzten Faserstoffe werden in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

**Tab. 6.2.1-1 Chemische und physikalische Merkmale der verwendeten Faserstoffe**

|                       | Fichte-TMP-Faserstoff | Gutex-Faserstoff |
|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Cellulose [%]         | 47,50                 | 50,80            |
| Gesamtzucker [%]      | 67,70                 | 68,05            |
| Lignin [%]            | 28,10                 | 27,63            |
| Asche [%]             | 1,87                  | 2,11             |
| Kaltwasserextrakt [%] | 1,02                  | 1,53             |
| pH-Wert               | 4,52                  | 5,02             |
| SR-Grad               | 14                    | 13               |
| Reißlänge [m]         | 245                   | 210              |



**Abb. 6.2.1-1: Siebkennlinien der verwendeten Faserstoffe**

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass zwischen den 2 verwendeten Faserstoffen deutliche Unterschiede, vor allem in der Morphologie, bestehen. So weist der Fichten-Faserstoff niedrigeren Feinstoffanteil, wesentlich höheren Langfaseranteil und größere Reißlängen als der Gutex-Faserstoff auf. Bei der chemischen Zusammensetzung gibt es nur geringe Unterschiede.

### 6.2.2 Einfluss von Enzymart und -dosierung auf die Eigenschaften von Laborblätter aus Fichten-TMP-Faserstoff

Sowohl hydrolytische als auch phenoloxydierende Enzyme zeigen Einfluss auf die Eigenschaften von Laborblättern hergestellt aus Fichte-TMP-Faserstoff. Die Wirkung ist von Enzymart und -anteil sowie von der Inkubationsdauer abhängig (siehe Abb. 6.2.2-1 bis 4):

- Unter den eingesetzten Enzymen zeigte Ecopulp Tx200 die beste Wirkung auf die Zugfestigkeit und Reißlänge der Laborblätter. Beide Eigenschaften wurden deutlich verbessert. Auch die Inkubation des Faserstoffes mit SIAB II- und bei Ecopulp N 400 führte zur Verbesserungen der Eigenschaften.
- Ecopulp TX 200 zeigt die besten Ergebnis bei einer Enzymdosierung von 10 % und einer Inkubationsdauer von 20 Minuten; Ecostone N 400 bei 5 % Enzymdosierung und einer Inkubationsdauer von 20 Minuten und SIAB II bei 5 % Enzymdosierung und einer Inkubationsdauer von 40...60 Minuten. Es ist auch festzustellen, dass bereits ein Enzymanteil von nur 1 % bezogen auf die Faserstoffmenge (für alle eingesetzten Enzyme) zu deutlichen Verbesserungen der Reißlänge der Laborblätter führte.
- Das Entwässerungsverhalten des Fichten-TMP-Faserstoffes aus der ersten Zerkleinerungsstufe wird durch die Inkubation mit den Enzymen kaum verändert. Der Entwässer-

rungswiderstand des Faserstoffes lag immer im Bereich von 9 bis 10 SR bei allen Va-  
 rianten.

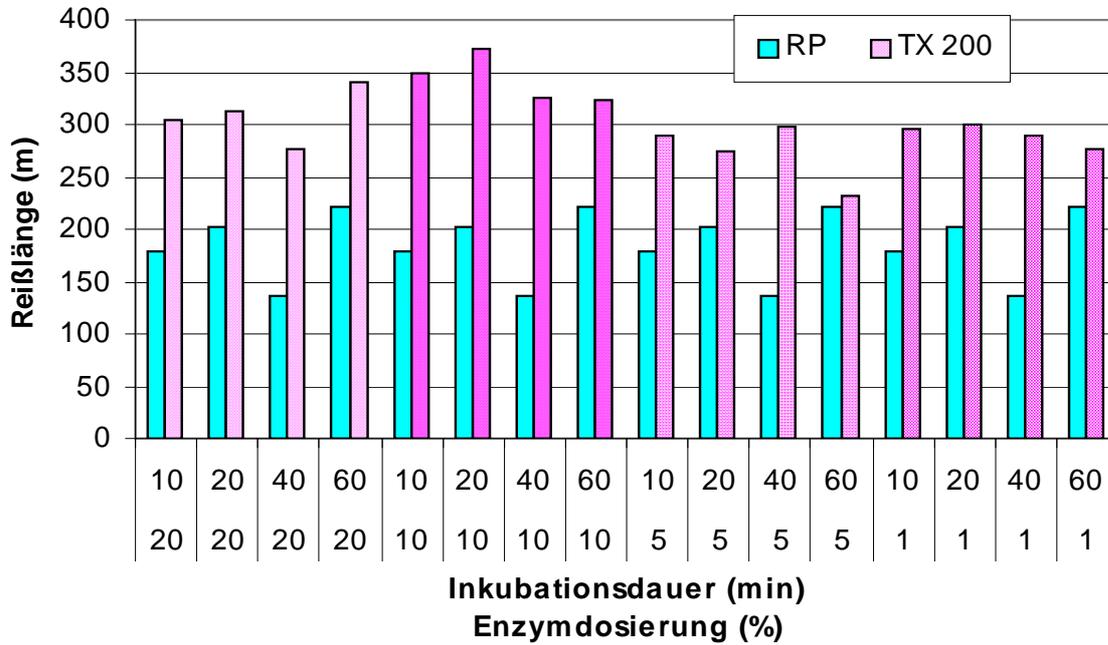


Abb. 6.2.2-1: Reißlänge bei Einsatz von Ecopulp TX 200

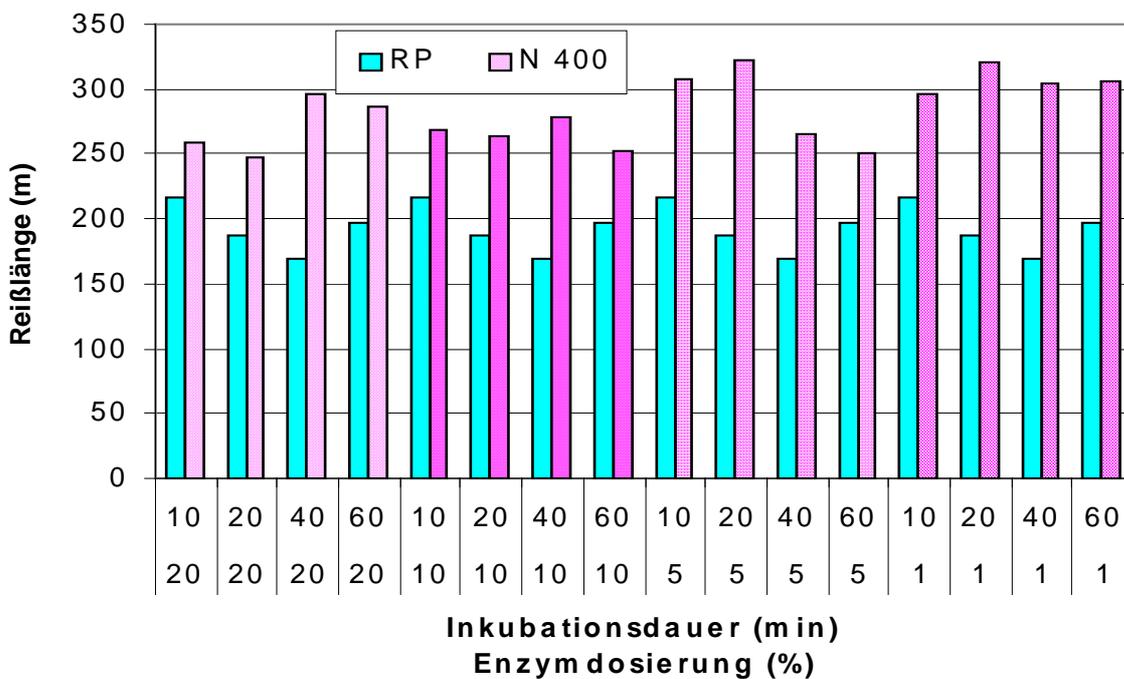


Abb. 6.2.2-2: Reißlänge bei Einsatz von Ecoston N 400

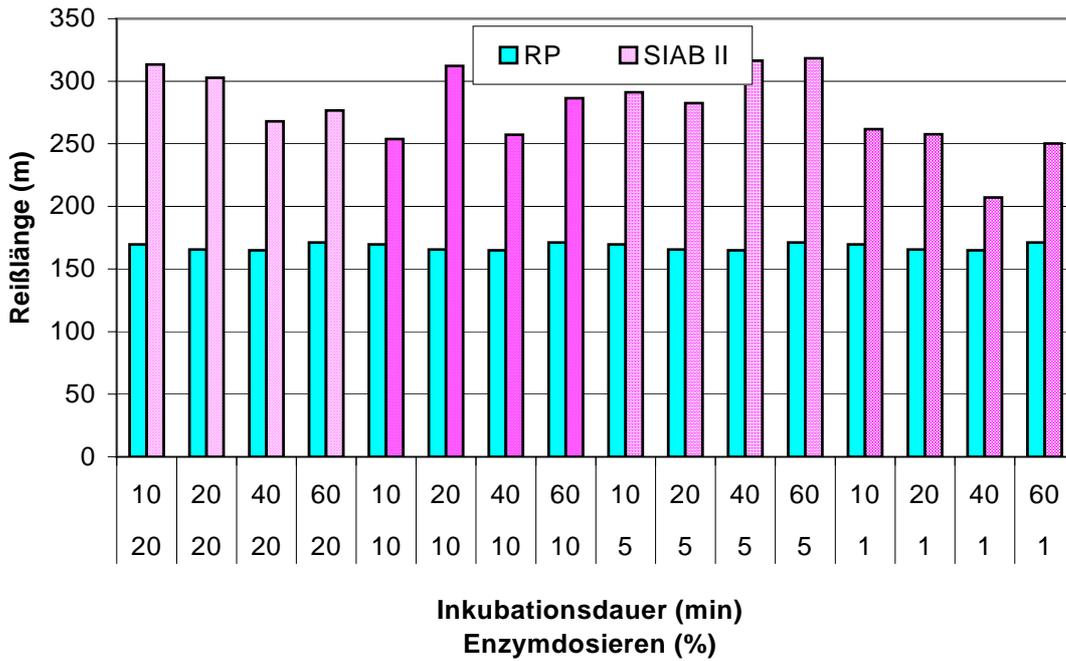


Abb. 6.2.2-3: Reißlänge bei Einsatz von SIAB II

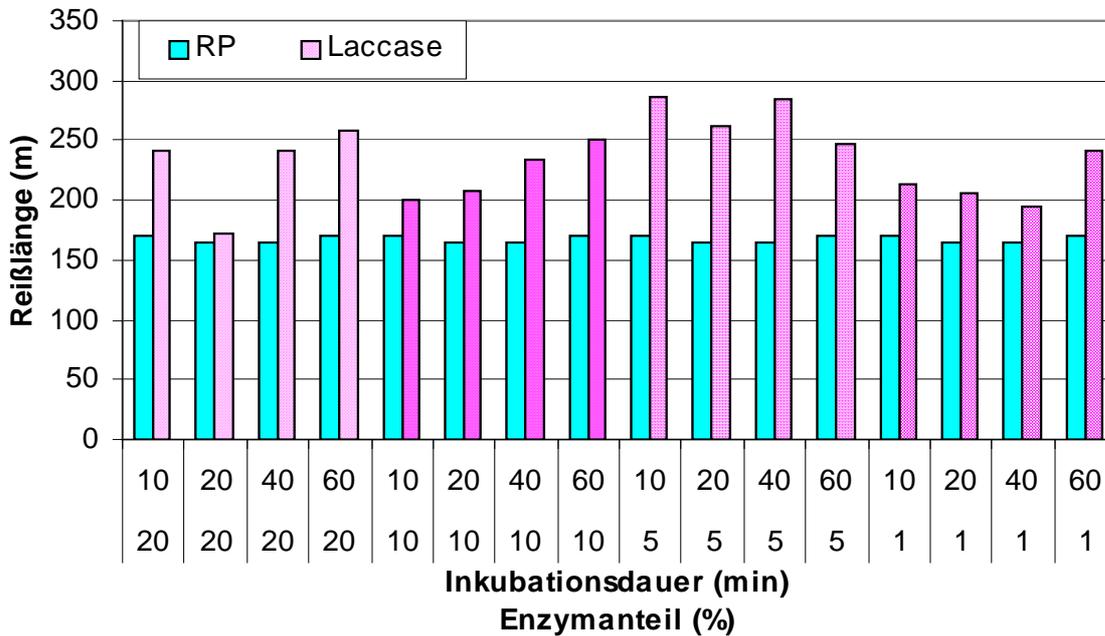


Abb. 6.2.2-4: Reißlänge bei Einsatz von Laccase

### 6.2.3 Einfluss des Prozesswassers auf die Enzymaktivitäten

Verglichen mit der Inkubation in den Pufferlösungen hat das Prozesswasser bei kurzen Inkubationszeiten keinen nennenswerten negativen Einfluss auf die verbleibende Enzymaktivität der getesteten Cellulase-/ Xylanase- Systeme (Tabelle 6.2.3-1).

**Tab. 6.2.3-1: Restaktivitäten der Enzyme nach 20 min Inkubation in Prozesswasser bzw. Puffer**

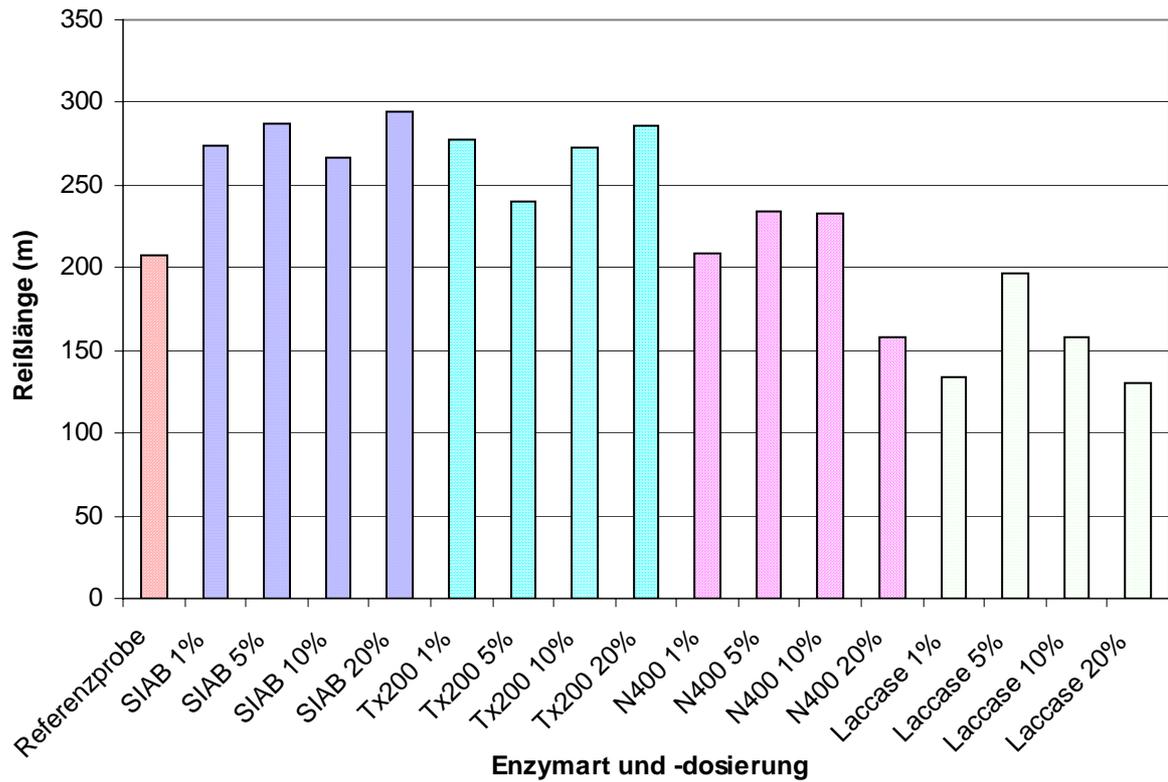
| Probe                 | Xylanase [IU/ml] | AZO-CMC [U/ml] |
|-----------------------|------------------|----------------|
| SIAB II               |                  |                |
| P1 mit Citratpuffer   | 14030,77         | 312,2          |
| P2 mit Prozesswasser  | 15011,43         | 217,58         |
|                       |                  |                |
| N 400 März 2007       |                  |                |
| P1 mit Phosphatpuffer | n.n.             | 67,41          |
| P2 mit Prozesswasser  | n.n.             | 66,26          |
|                       |                  |                |
| Tx 200 März 2007      |                  |                |
| P1 mit Phosphatpuffer | 6054,55          | n.n.           |
| P2 mit Prozesswasser  | 6124,95          | n.n.           |

### 6.2.4 Einfluss des Prozesswassers auf die Eigenschaften von Laborblättern

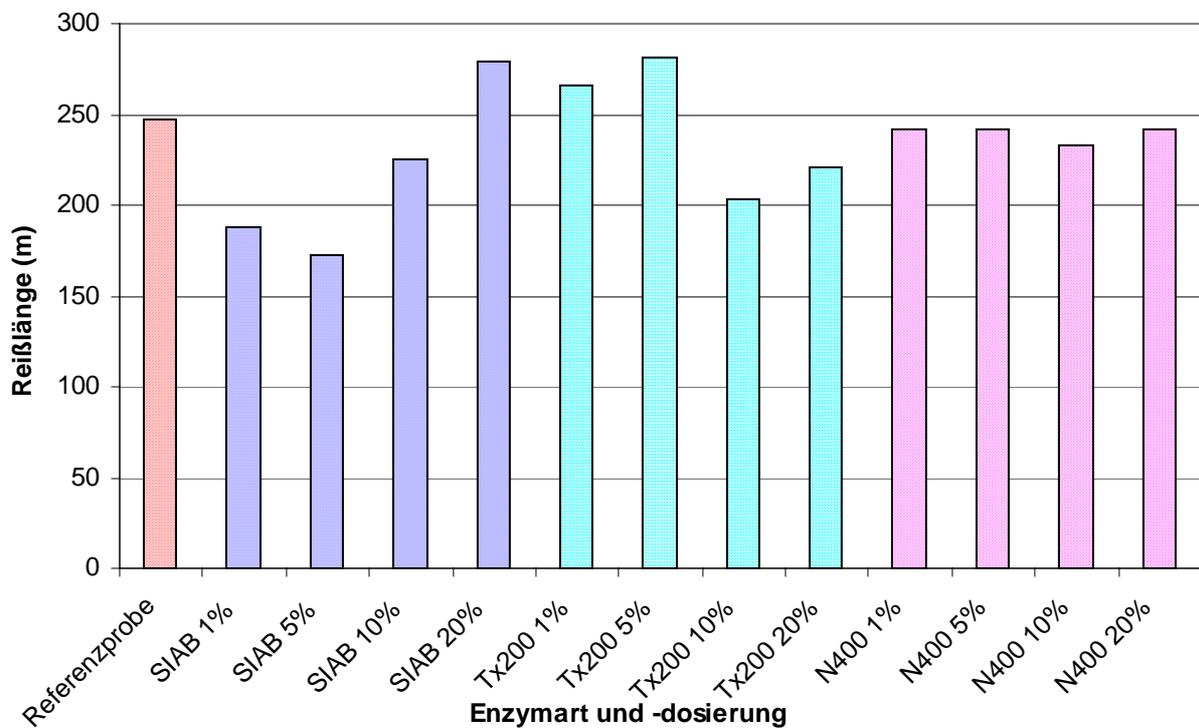
Die Laborblätter, die mit Prozesswasser hergestellt wurden, wiesen etwas geringere Reißlängen auf, als die Standardlaborblätter.

Durch einen Enzymeinsatz werden bei **Gutex-Faserstoff** diese Festigkeitsverluste kompensiert und Festigkeitssteigerungen erreicht. Ähnlich wie bei der Faserstoffinkubation unter Einsatz von Frischwasser zeigen SIAB II und Tx 200 deutliche Festigkeitszunahmen von bis zu 40 %. Ecostone N 400 zeigt dagegen nur noch geringe Effekte. Beim Einsatz von Laccase werden im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Frischwasser keine positiven Effekte erreicht (Abb. 6.2.4-1).

Bei **Fichten-TMP-Faserstoff** in Kombination mit Prozesswasser sind positive Ergebnisse nur noch mit bei niedrig dosiertem TX 200 und hohen Dosierungen von SIAB II zu verzeichnen (Abb. 6.2.4-2).



**Abb. 6.2.4-1: Reißlänge von Laborblättern bei Inkubation von Gutex-Faserstoff mit verschiedenen Enzymsystemen unter Einsatz von Prozesswasser**



**Abb. 6.2.4-2: Reißlänge von Laborblättern bei Inkubation von Fichten-Faserstoff mit verschiedenen Enzymsystemen unter Einsatz von Prozesswasser**

Für die Versuche zur Dämmplattenherstellung wurde aufgrund der erzielten Laborergebnisse auf den Einsatz von Laccase verzichtet.

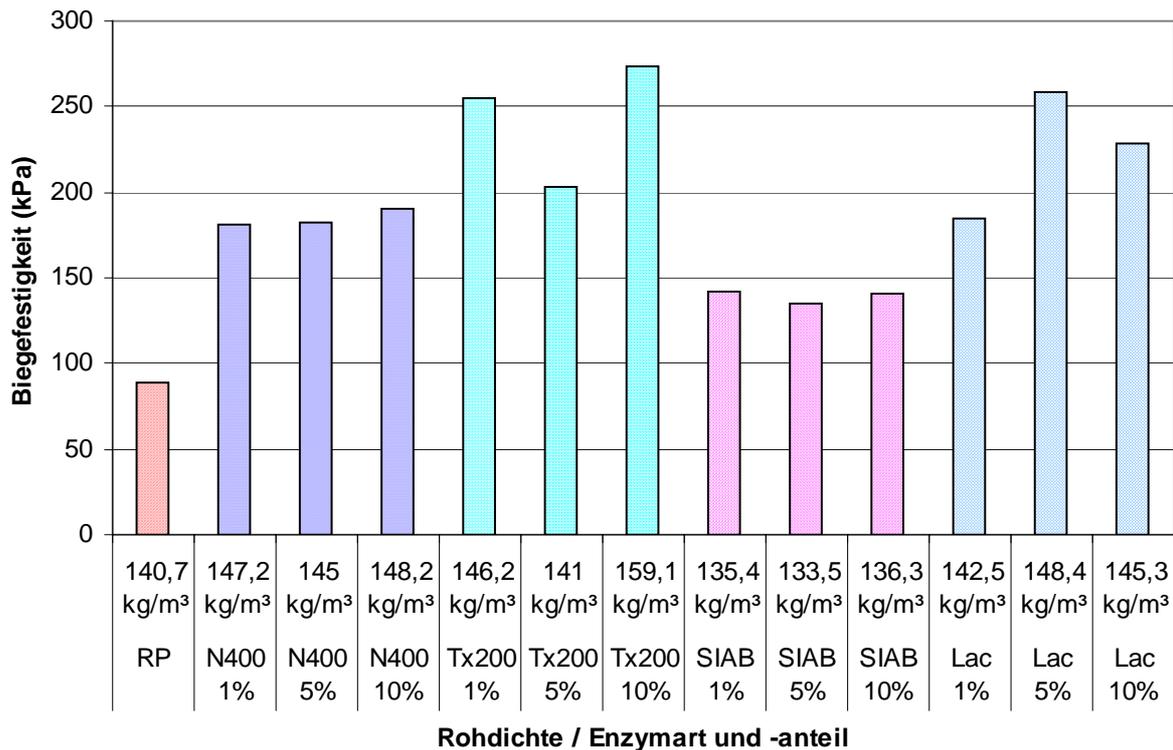
### 6.2.5 Eigenschaften von Dämmplatten hergestellt im Labormaßstab

Die Ergebnisse der Dämmplattenherstellung im Labormaßstab zeigen trotz geringer Dichten der Dämmplatten positive Einflüsse der hydrolytischen Enzyme auf deren Eigenschaften. Die Ergebnisse der Screeningtests mit Laborblättern werden damit bestätigt.

**Tab. 6.2.5-1: Eigenschaften der hergestellten Laborplatten aus Fichten-Faserstoff**

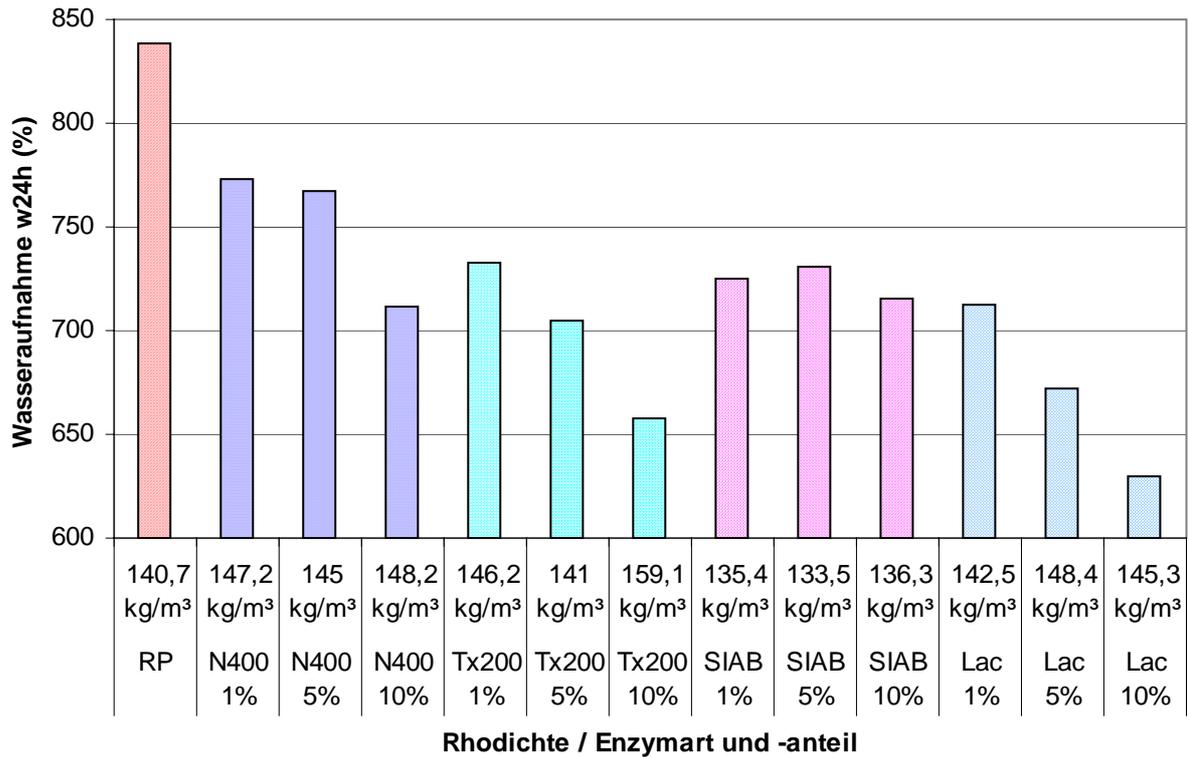
|                    | <b>Rohdichte</b>        | <b>BF</b>  | <b>w2h</b> | <b>w24h</b> | <b>d2h</b> | <b>d24h</b> |
|--------------------|-------------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
|                    | <b>kg/m<sup>3</sup></b> | <b>kPa</b> | <b>%</b>   | <b>%</b>    | <b>%</b>   | <b>%</b>    |
| <b>RP</b>          | 140,7                   | 89,3       | 789,93     | 838,40      | 14,42      | 18,32       |
| <b>N400 1%</b>     | 147,2                   | 181,7      | 706,68     | 773,50      | 15,55      | 19,16       |
| <b>N400 5%</b>     | 145                     | 181,9      | 717,51     | 767,37      | 14,47      | 15,69       |
| <b>N400 10%</b>    | 148,2                   | 190,8      | 666,19     | 711,82      | 12,97      | 14,70       |
| <b>Tx200 1%</b>    | 146,2                   | 255        | 685,27     | 732,61      | 12,45      | 15,18       |
| <b>Tx200 5%</b>    | 141                     | 203,4      | 681,98     | 704,92      | 10,59      | 12,91       |
| <b>Tx200 10%</b>   | 159,1                   | 273,8      | 622,66     | 657,89      | 11,54      | 13,12       |
| <b>SIAB 1%</b>     | 135,4                   | 142        | 677,68     | 724,97      | 9,39       | 10,82       |
| <b>SIAB 5%</b>     | 133,5                   | 135        | 697,20     | 730,66      | 9,39       | 11,96       |
| <b>SIAB 10%</b>    | 136,3                   | 141,1      | 669,49     | 714,92      | 10,33      | 13,59       |
| <b>Lacasse 1%</b>  | 142,5                   | 185        | 684,71     | 712,72      | 12,23      | 15,01       |
| <b>Lacasse 5%</b>  | 148,4                   | 258,8      | 652,90     | 671,79      | 11,91      | 14,18       |
| <b>Lacasse 10%</b> | 145,3                   | 228,2      | 602,23     | 630,12      | 9,22       | 11,08       |
| <b>RP</b>          | 230,5                   | 271,7      | 477,22     | 507,90      | 30,42      | 35,93       |
| <b>N400 5%</b>     | 254,4                   | 853,1      | 391,26     | 414,41      | 25,60      | 28,94       |
| <b>N400 10%</b>    | 246,9                   | 796,6      | 296,96     | 387,94      | 19,99      | 24,39       |

Bei Einsatz von Frischwasser haben alle eingesetzten Enzyme eine positive Wirkung auf die Festigkeits- und Quelleigenschaften. Ecopulp TX 200 bewirkt bei einer Dosierung von 1 % bereits eine Verdreifachung der Biegefestigkeiten. Hier sind weitere Potentiale für eine Verringerung der Enzymdosierungen vorhanden.

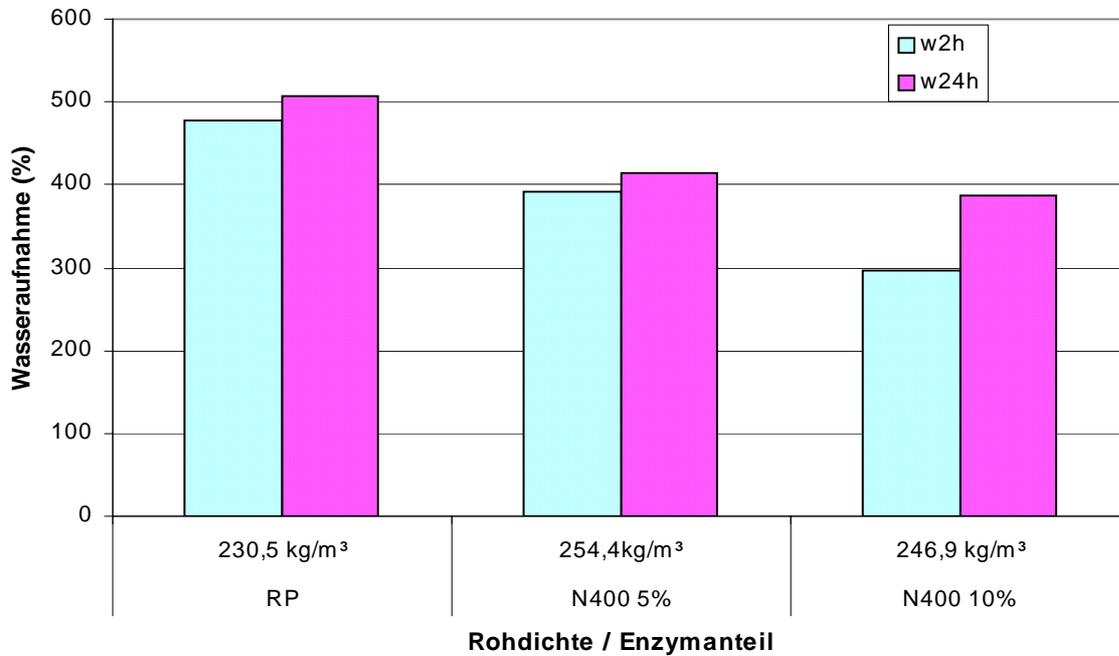


**Abb. 6.2.5-1: Biegefestigkeiten der Dämmplatten (Rohdichte von 140 kg/m³)**

Überraschen zeigte sich, dass auch die hygroskopischen Eigenschaften der hergestellten Dämmplatten durch den Einsatz von sowohl von Cellulase/Xylanase-Komplexen als auch von Laccase erheblich verbessert werden. Bei den Dämmplatten mit einer Rohdichte um 140 kg/m³ liegen die erreichten Verbesserungen bei der massebezogenen Wasseraufnahme zwischen 15 (1 % Laccase) und 25 % (10 % Laccase). Die 24 h Dickenquellung kann um bis zu 41 % (1 % SIAB II) reduziert werden. Mit zunehmender Rohdichte verstärken sich diese Effekte. So verstärkt sich die Reduzierung der Wasseraufnahme durch die Inkubation mit 5 % Ecostone N 400 von 9 % (Dichte 140 kg/m³) auf 19 % bei einer Rohdichte von 240 kg/m³. Je höher der Enzymanteil ist, desto stärker verringert sich die Wasseraufnahme der Dämmplatten.



**Abb. 6.2.5-2: Wasseraufnahme von Dämmplatten (Rohdichte von 140 kg/m³)**



**Abb. 6.2.5-3: Wasseraufnahme von Dämmplatten (Rohdichte von 240 kg/m³)**

## 6.2.6 Ergebnisse der Upscalingversuche bei der Fa. Gutex

Ziel der Versuche war die Verifizierung der im Labor- und Technikummaßstab gewonnenen Ergebnisse auf einer kontinuierlich arbeitenden Anlage zur Dämmplattenherstellung. Besonderes Augenmerk galt dem Vergleich von Additiv- und Enzymwirkung einzeln und in Kombination. Tabellen 6.2.6-1 und 2 zeigen die erzielten Eigenschaften der hergestellten Dämmplatten.

**Tab. 6.2.6-1: Eigenschaften der bei Fa. Gutex hergestellten Dämmplatten (geprüft an der TU-Dresden)**

| Var.   | Rhodichte         | BF     | DF    | QF   | w2h   | w24h  | WA                | WLF    |
|--------|-------------------|--------|-------|------|-------|-------|-------------------|--------|
|        | kg/m <sup>3</sup> | kPa    | kPa   | kPa  | %     | %     | kg/m <sup>2</sup> | W(m*K) |
| Var. 1 | 252               | 1530,5 | 222,3 | 62,9 | 257,3 | 355,8 | 16,05             | 0,0445 |
| Var. 2 | 242               | 1744,9 | 237,3 | 65,7 | 196,7 | 318,1 | 14,63             | 0,0433 |
| Var. 3 | 257               | 2060,9 | 227,0 | 72,2 | 91,7  | 209,6 | 14,25             | 0,0458 |
| Var. 4 | 240               | 1456,3 | 231,3 | 43,4 | 162,3 | 262,1 | 16,97             | 0,0437 |
| Var. 5 | 234               | 1540,2 | 257,2 | 53,6 | 96,5  | 182,1 | 9,67              | 0,0430 |
| Var. 6 | 247               | 1940,7 | 294,0 | 57,3 | 42,7  | 108,4 | 1,20              | 0,0451 |
| Var. 7 | 274               | 2167,5 | 263,8 | 65,0 | 33,2  | 83,1  | 0,82              | 0,0469 |
| Var. 8 | 288               | 2178,9 | 246,3 | 56,1 | 73,3  | 147,9 | 8,37              | 0,0485 |

BF = Biegefestigkeit; DF = Druckfestigkeit; QF = Querkzugfestigkeit; WA = Wasseraufnahme (flächenbezogen); w2h bzw. w24h = Wasseraufnahme nach 2 bzw. 24 Wasserlagerung (massebezogen); WLF = Wärmeleitfähigkeit

**Tab. 6.2.6-2: Eigenschaften der bei Fi. Gutex hergestellten Dämmplatten (geprüft bei Gutex)**

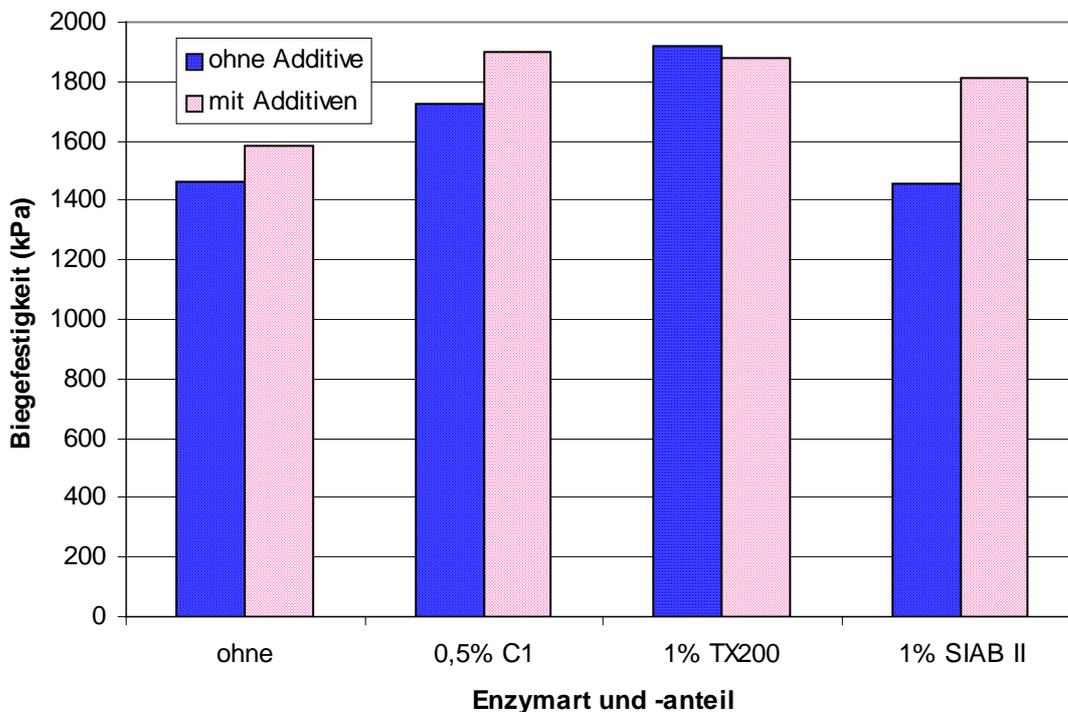
| Variante | Rohdichte         | Restfeuchte | Biegefestigkeit | Wasseraufnahme    |
|----------|-------------------|-------------|-----------------|-------------------|
|          | kg/m <sup>3</sup> | %           | kPa             | kg/m <sup>2</sup> |
| Var. 1   | 238               | 9,6         | 1360            | 16,99             |
| Var. 2   | 244               | 7,9         | 1750            | 12,39             |
| Var. 3   | 253               | 8,7         | 2055            | 13,48             |
| Var. 4   | 237               | 8,0         | 1500            | 2,77              |
| Var. 5   | 235               | 8,9         | 1675            | 7,42              |
| Var. 6   | 241               | 6,0         | 1870            | 0,83              |
| Var. 7   | 276               | 6,4         | 2420            | 0,64              |
| Var. 8   | 275               | 8,9         | 1890            | 10,55             |

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Einsatz von Enzymen als auch der von Additiven sowie deren Kombination deutlich die hydrophoben Eigenschaften der Dämmplatten verbessern:

- Die **massebezogene Wasseraufnahme** nach 2 h verringerte sich durch Additivzugabe um ca. 62 % bzw. nach 24 h um 49 % (Abb. 6.2.6-2 und 3).
- Durch Enzymzugabe beträgt die Verringerung nach 2 h bis zu 64 % bzw. nach 24 h bis zu 41 %, d. h. die Enzymzugabe führt hier zu ähnlichen Verbesserungen wie die Additivzugabe.

- Bei Kombination von Additiven und Enzymen beträgt die Verringerung nach 2 h bis zu 87 % und nach 24 h bis zu 77 %.
- Die **flächenbezogene Wasseraufnahme** verringert sich durch Zugabe der Additive um ca. 37 %, bei der Zugabe der Enzyme wird ohne Additive eine Verringerung von bis zu 12,5 % erreicht (Abb. 6.2.6-4 und 5). Bei kombiniertem Einsatz von Additiven und Enzymen beträgt die Verringerung bis zu 95 %, d. h. auch hier ist ein deutlicher Synergieeffekt sichtbar.

Die Biegefestigkeit der Dämmplatten wird durch Additive nur geringfügig verbessert. Ein separater Einsatz von Enzymen kann insbesondere bei der Biegefestigkeit zu deutlichen Verbesserungen führen (bis 32 %) (Abb. 6.2.6-1). Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und Additiven erbringt eine Verbesserung der Biegefestigkeit von ca. 20 %. Druck- und Querkzugfestigkeiten werden weder durch Additive noch durch Enzyme signifikant beeinflusst.



**Abb. 6.2.6-1: Biegefestigkeiten (normiert auf Rohdichte von 240 kg/m<sup>3</sup>)**

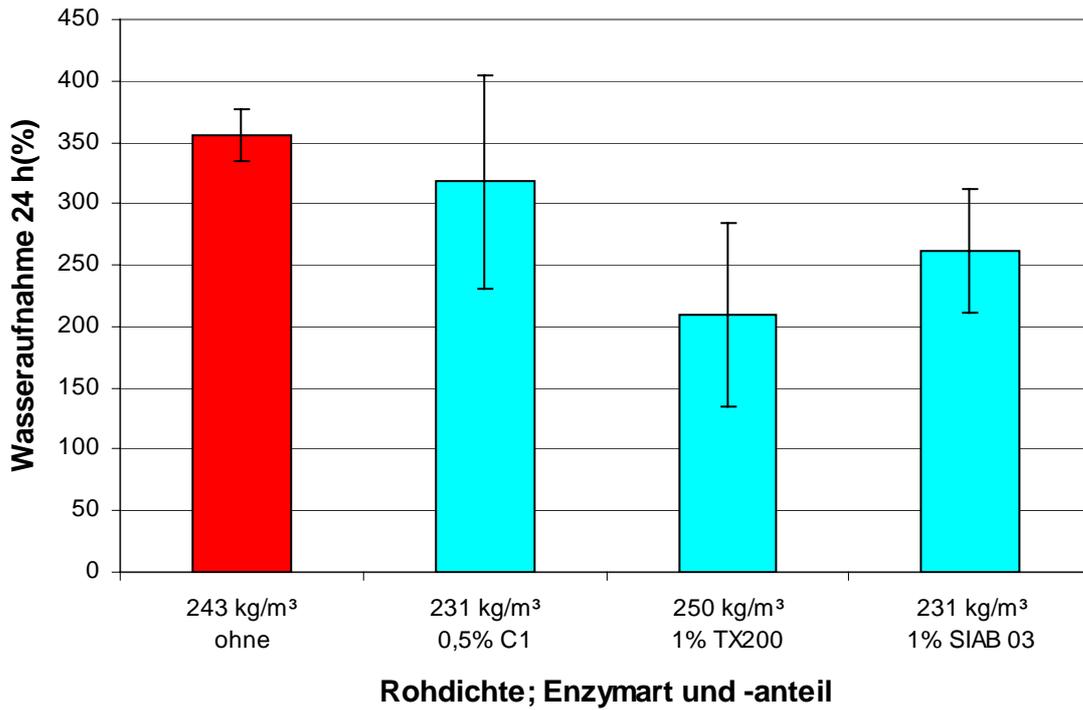


Abb. 6.2.6-2: Wasseraufnahme 24 h (massebezogen) ohne Additive

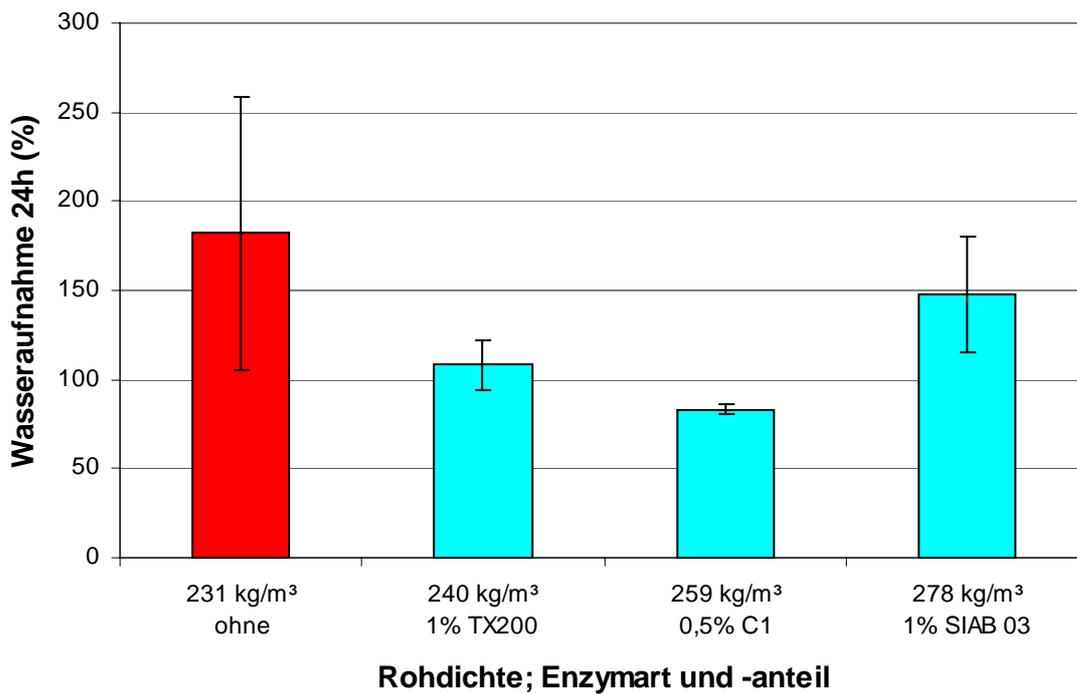


Abb. 6.2.6-3: Wasseraufnahme 24 h (massebezogen) mit Additiven

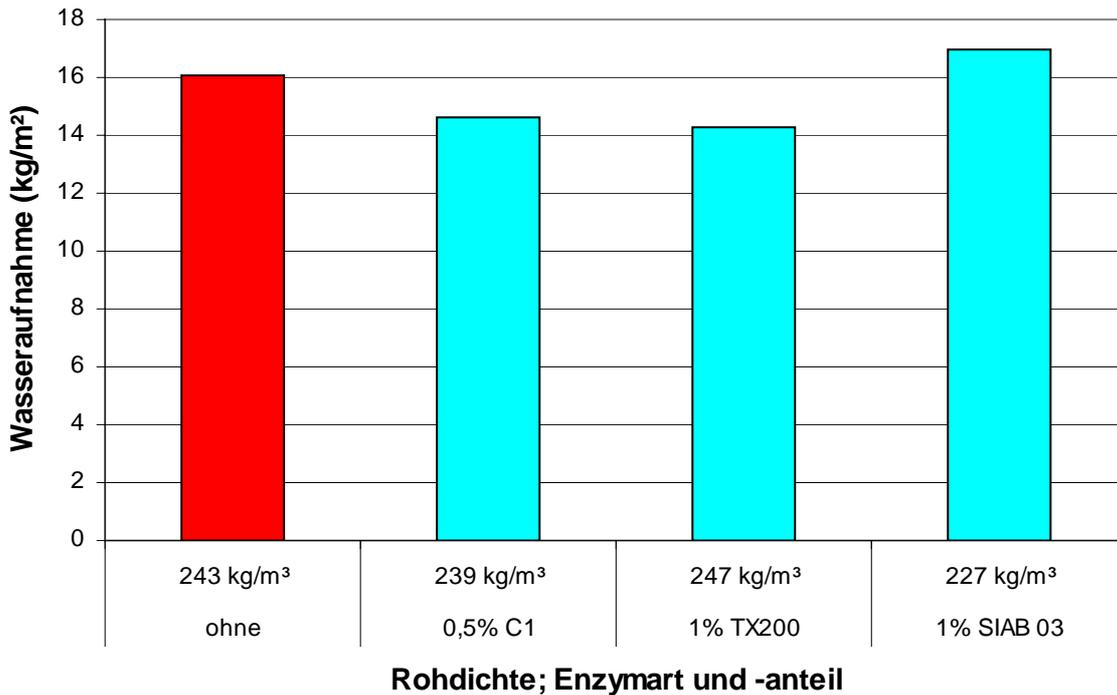


Abb. 6.2.6-4: Wasseraufnahme der Dämmplatten (flächenbezogen) ohne Additive

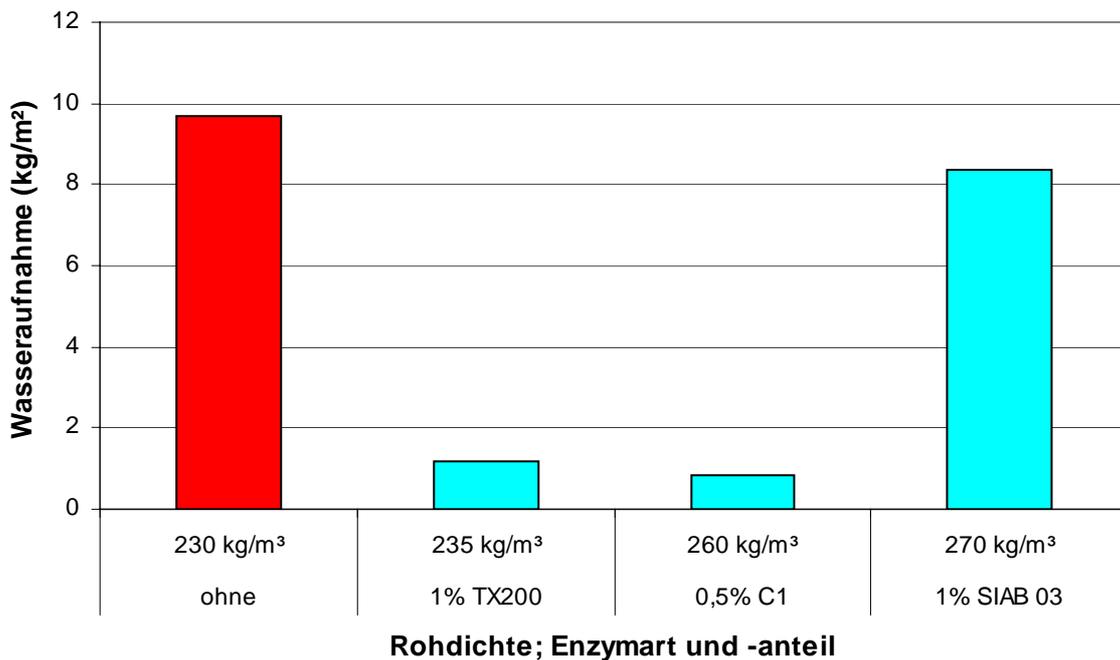


Abb. 6.2.6-5: Wasseraufnahme der Dämmplatten (flächenbezogen) mit Additiven

### 6.2.7 Restaktivitäten bei der Dämmplattenherstellung im Upscalingversuch

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 3.2.3.11 hervorgeht, ist die gewinnbare Restaktivität im Ablauf bei den verwendeten Enzymen sehr unterschiedlich. Vor allem betrifft das Enzym SI-AB II, bei dem nur 17–23 % Restaktivität verbleiben. Die Verluste bei dem Präparat TX-200 A sind sehr niedrig. Bei der Variante 6 sind am Ende der 20 min Inkubation bei 50 °C sogar

80 % der vorher zugegebenen Enzymaktivität im Ablauf nachweisbar. Hier ergeben sich erhebliche Potentiale für eine Kreislaufnutzung.

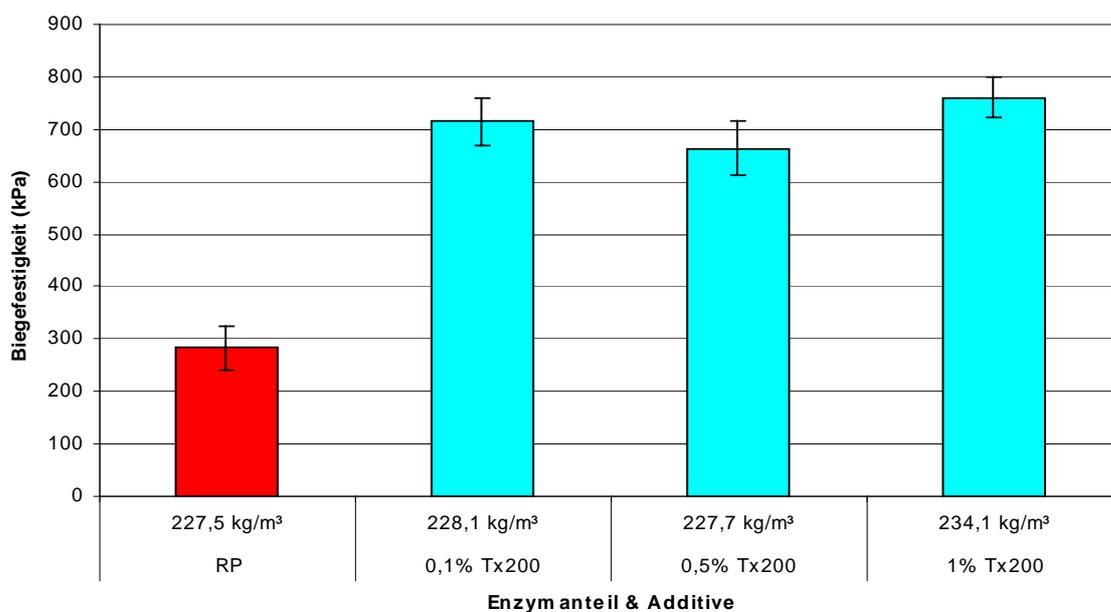
**Tab. 6.2.7-1: Enzym-Rest- Aktivitäten der Dämmstoffherstellung (bei Gutex)**

| Variante | Enzym    | Enzymmenge*    | Verdünnung<br>der Enzymlö-<br>sung | Restaktivitäten |                 |
|----------|----------|----------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|
|          |          |                |                                    | Xylanase %      | Endoglucanase % |
| 2        | C1       | 0,5 % 100 ml   | 1:10 000                           |                 |                 |
| 3        | TX-200 A | 1 % (200 ml)   | 1: 5 000                           | <b>51,8</b>     |                 |
| 4        | SIAB II  | 1 % (200 ml)   | 1: 5 000                           | <b>23,0</b>     | <b>18,3</b>     |
| 6        | TX-200 A | 1 % (200 ml)   | 1: 5 000                           | <b>80,9</b>     |                 |
| 7        | C1       | 0,5 % (100 ml) | 1:10 000                           |                 |                 |
| 8        | SIAB li  | 1 % (200 ml)   | 1: 5 000                           | <b>19,5</b>     | <b>17,4</b>     |

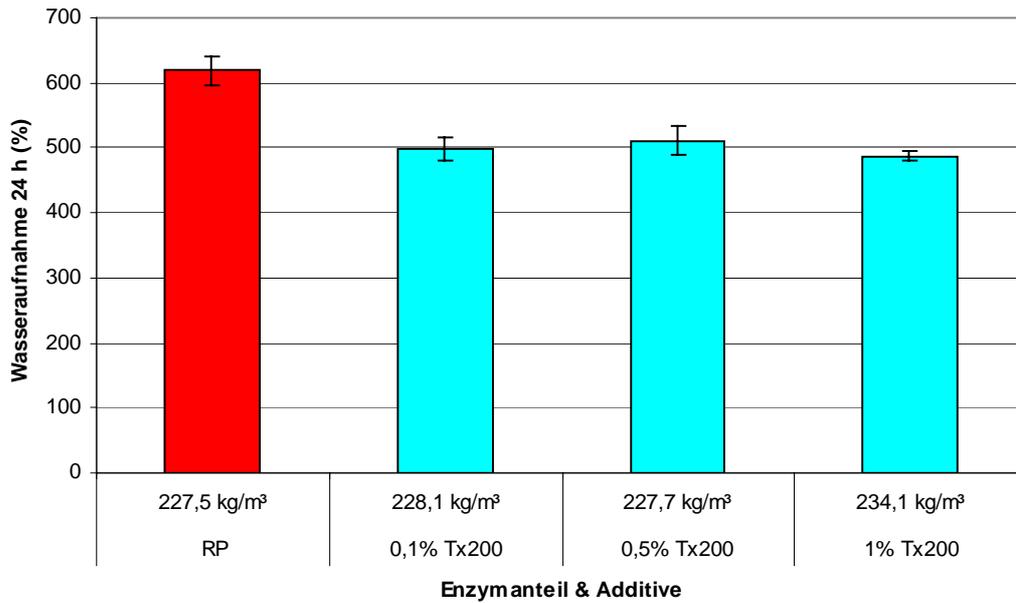
\*Enzymlösung bezogen auf otro Faserstoff

### 6.2.8 Einfluss von Enzymdosierung und Additiven auf die Eigenschaften von Dämmplatten aus Fichten-TMP-Faserstoff

Hierbei wurden nur der Fichten-TMP-Faserstoff und das Enzym Tx200 verwendet. Es wurde eine Enzymdosierung von 1 %, 0,5 % und 0,1 % bezogen auf die Faserstoffmenge gewählt. Der Faserstoff wurde unter Einsatz von Frischwasser mit dem Enzym inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug 50 °C und die Inkubationsdauer 20 Minuten.

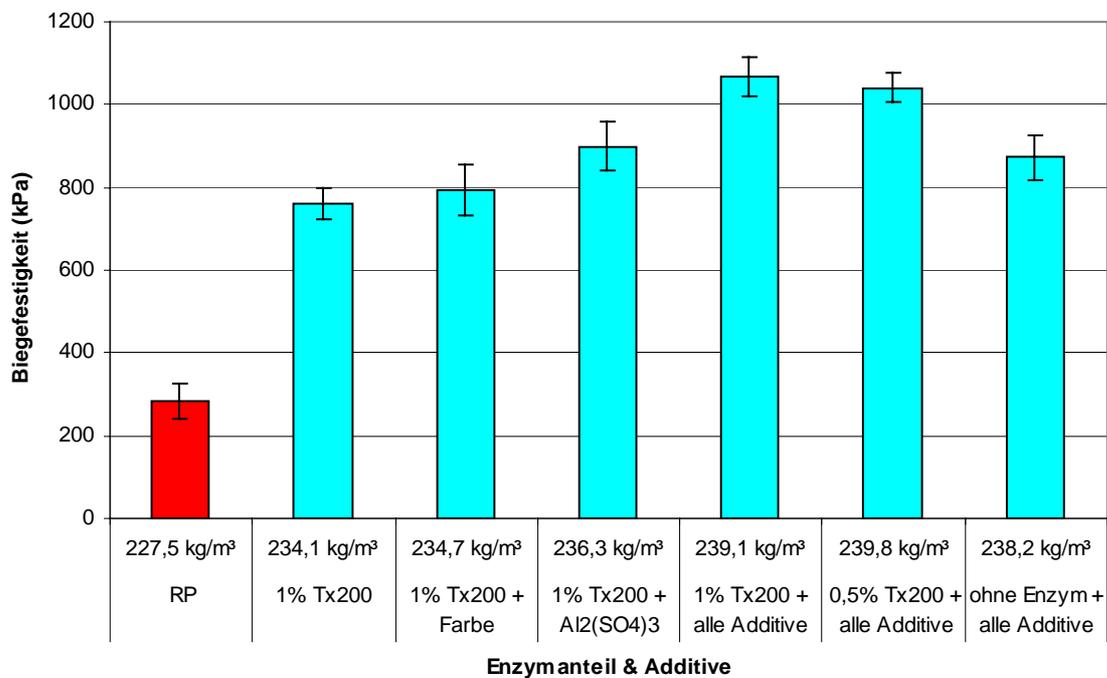


**Abb. 6.2.8-1: Biegefestigkeit der Dämmplatten in Abhängigkeit von der Enzymdosierung**

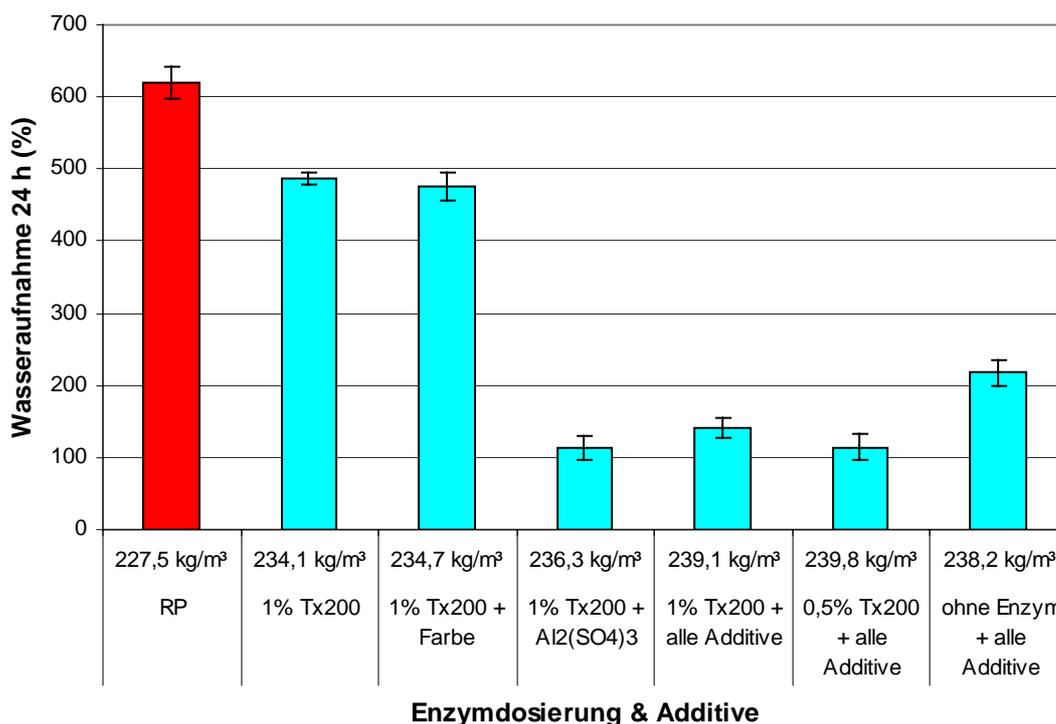


**Abb. 6.2.8-2: Wasseraufnahme der Dämmplatten in Abhängigkeit von der Enzymdosierung**

Der Enzymeinsatz verbessert deutlich die Festigkeitseigenschaften der Platten. Ein Enzymanteil von nur 0,1 % bezogen auf die Faserstoffmenge führt schon zur deutlichen Verbesserung der Biegefestigkeit der Platten. Hier könnte der Enzymanteil noch weiter reduziert werden. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig.



**Abb. 6.2.8-3: Biegefestigkeit der Dämmplatten in Abhängigkeit von Enzym- und Additiv-einsatz**



**Abb. 6.2.8-4: Wasseraufnahme der Dämmplatten in Abhängigkeit von Enzym- und Additiveinsatz**

Daraus lässt sich folgendes ableiten:

- Sowohl Enzyme als auch Additive verbessern deutlich die Festigkeits- und hygroskopischen Eigenschaften der Dämmplatten aus Fichten-TMP-Faserstoff. Der Einsatz von Enzym und Additive in Kombination führt zur weiteren Verbesserung der Eigenschaften, insbesondere der Biegefestigkeit und Wasseraufnahme (siehe Abb. 6.2.8-3 und 4).
- Von den Additiven bewirken insbesondere das Hydrophobierungsmittel und Aluminiumsulfat eine deutlichen Verbesserung der Wasseraufnahme der Platten
- Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und Additiven bewirkt eine deutliche Verbesserung der Biegefestigkeit und Wasseraufnahme schon bei sehr geringen Dosierungen von 0,5 % Enzymlösung.

### 6.2.9 Einfluss der Enzyme und Additive auf CSB und BSB<sub>5</sub> im Prozesswasser

Die Prozesswasser-Proben, die bei den Versuchen zur Herstellung von Dämmplatten bei Firma Gutex entnommen wurden, wurden auf deren chemischen und biologischen Sauerstoffbedarf (CSB & BSB<sub>5</sub>) untersucht.

Es wurde dabei festgestellt, dass

- das Prozesswasser auch ohne Enzym und Additive bereits stark organisch belastet ist,
- die Belastung durch die Zugabe von Additiven nur leicht zunimmt,
- durch den Einsatz von Enzymen die Abwasserbelastung geringfügig erhöht wird,

- die Inhaltsstoffe des Siebwassers nur schwer biologisch abgebaut werden können, da das Verhältnis  $BSB_5/CSB$  aller untersuchten Wässer deutlich niedriger als 50 % liegt (siehe Abb. 6.2.9-3)

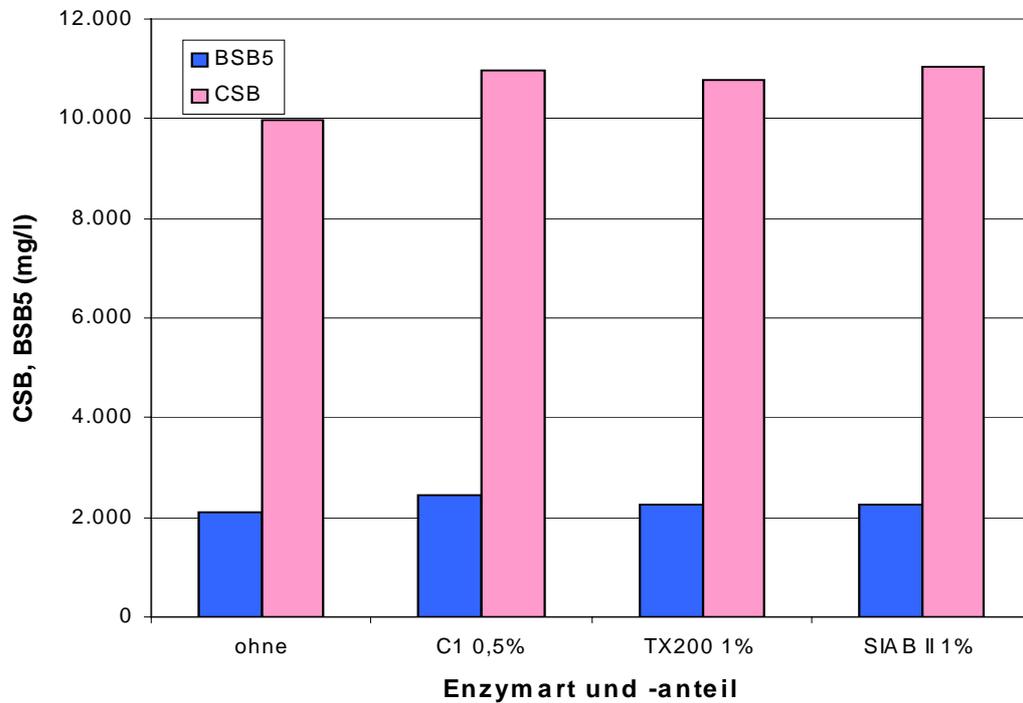


Abb. 6.2.9-1: CSB und  $BSB_5$  der Prozesswässer ohne Additive

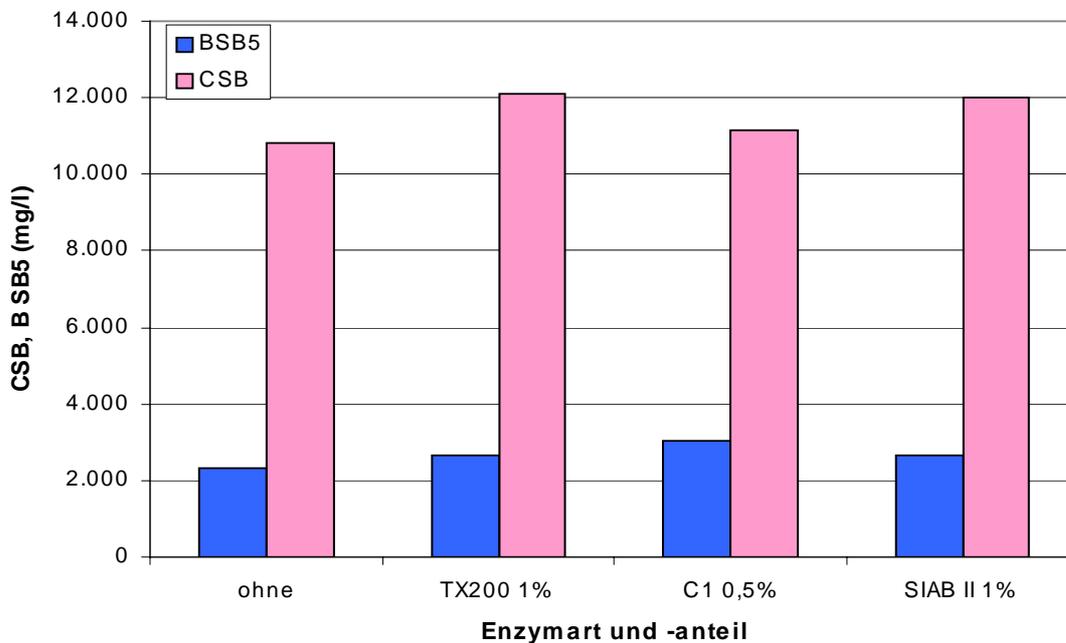
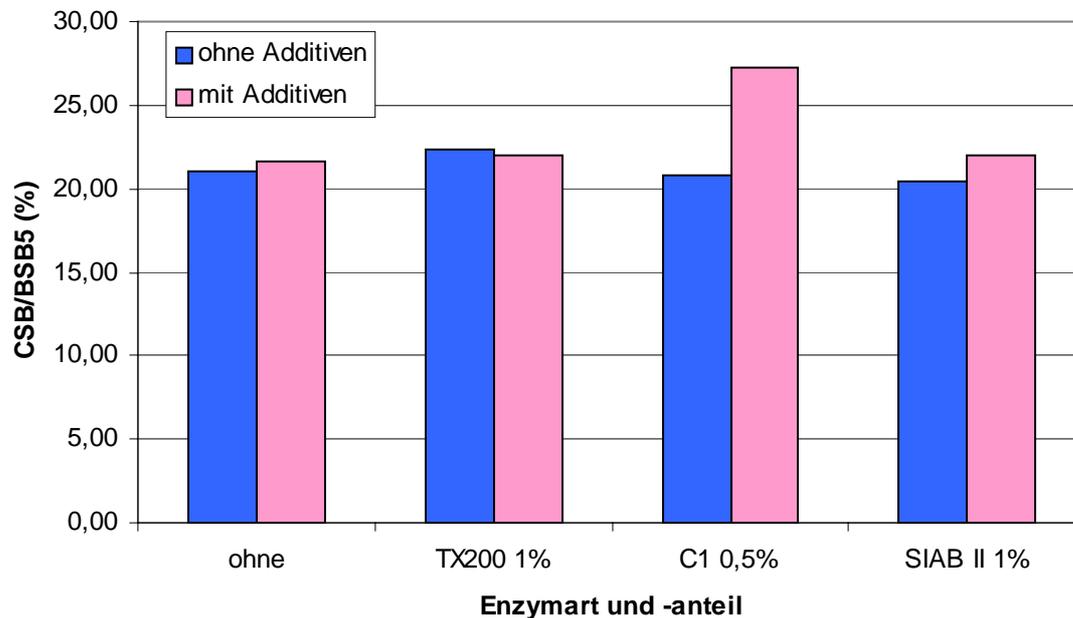


Abb. 6.2.9-2: CSB und  $BSB_5$  der Prozesswässer mit Additiven



**Abb. 6.2.9-3: CSB/BSB<sub>5</sub> der Prozesswässer**

Zusammenfassend können folgende Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Dämmplattenherstellung gezogen werden:

- Das eingesetzte phenoloxydierende Enzym Laccase zeigt nur positive Wirkung auf die Eigenschaften der Laborblätter, wenn kein Prozesswasser bei der Inkubation der Faserstoffe mit diesem Enzym eingesetzt wird. Dieses Enzym ist somit kaum geeignet für die Herstellung von Dämmplatten im Nassverfahren.
- Im Gegensatz dazu erweisen sich die eingesetzten hydrolytischen Enzyme (Cellulase, Xylanase- Komplexe und deren Kombination) stabiler gegenüber Prozesswasser. Sie haben auch bei Einsatz von Prozesswasser eine positive Wirkung auf die Eigenschaften der Laborblätter.
- Obwohl das Prozesswasser kaum Einfluss auf die Aktivität der hydrolytischen Enzyme hat, zeigt es doch negative Wirkung auf die Festigkeitseigenschaften der Laborblätter. Diese negative Wirkung konnte aber durch den Einsatz geeigneter Enzyme aber mehr als nur kompensiert werden.
- Sowohl Enzyme als auch Additive verbessern deutlich die Biegefestigkeit der Dämmplatten aus TMP-Fichtenfaserstoffen. Bei Platten aus Gutex-Faserstoffen war die Verbesserung durch Additive eher gering. Ein separater Einsatz von Enzymen kann, insbesondere bei den Biegefestigkeiten, zu deutlichen Verbesserungen führen (bis 32 %). Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und Additiven führte zu einer weiteren Verbesserung der Biegefestigkeit um ca. 20 %. Druck- und Querkzugfestigkeiten der Dämmplatten werden durch Additive und/bzw. Enzyme nur geringfügig verbessert.

- Die größte Verbesserung durch Enzyme und Additive wurde bei der hydrophoben Eigenschaften der Dämmplatten (sowohl aus Gutex- als auch aus Fichten TMP-Faserstoff) erzielt. Die Wasseraufnahme, insbesondere bei kurzzeitiger Wasserlagerung (2 h), wurde sehr stark verringert. Hier könnte ein Teil der Additive durch Enzyme substituiert werden. Ein kombinierter Einsatz von Enzymen und Additiven führt zu einer weiteren sehr deutlichen Verringerung der Wasseraufnahme auf unter 1 kg/m<sup>2</sup> und unterschreitet somit selbst Normwerte für Dämmplatten nach dem Trockenverfahren.
- Die Organische Belastung der Prozesswasser wird durch Enzyme nur leicht erhöht.
- Sowohl der Enzym- als auch der Additiveinsatz (vor allen Hydrophobierungs- und Fällungsmittel) können weiter reduziert werden. Hier besteht noch Optimierungs- und Kosteneinsparungspotenzial.
- Von allen eingesetzten Enzymen erwies sich TX 200 als das stabilste und geeignetste Enzym für die Herstellung von Dämmplatten im Nassverfahren.

## **7 Zusammenfassungen und Ausblick**

### **7.1 Zusammenfassung zur Enzymgewinnung**

Die Untersuchungen zur Enzymgewinnung erfolgten mit einem im SIAB vorhandenen *Trichoderma reesei*-Produktionsstamm, der bereits zur Gewinnung von Cellulase-/Hemicellulase-Komplexen für andere Einsatzgebiete, wie beispielsweise der Textil- und Futtermittelindustrie, im Produktionsmaßstab verwendet wird. Durch Variation der Prozessbedingungen wurden Enzymkomplexe unterschiedlicher Zusammensetzung hinsichtlich der Einzel-Enzymkomponenten fermentiert und für empirische Applikationsuntersuchungen im Rahmen des Projektes bereitgestellt. Durch Fermentation auf einem Standardmedium mit Lactosezugaben in einer speziellen fed-batch-Technik wurden Cellulasekomplexe mit einem erhöhten Anteil an Endoglucanase und einem verringerten Anteil an Xylanase gewonnen. Durch Fermentation auf Basis von Brennerei-Dünnschlempe enthielten die Enzymkomplexe einen ca. 10-fach erhöhten Anteil an Xylanase. Die Enzymkomplexe wurden im Vergleich mit ausgewählten kommerziellen Enzympräparaten für die Applikationsuntersuchungen des Projektes eingesetzt. Neben der Testung hinsichtlich Eignung der Enzyme für die jeweils untersuchte Anwendung bestand das Ziel auch darin, Erkenntnisse zu den erforderlichen Einzel-Enzymkomponenten zu erlangen. Die optimale Zusammensetzung der Enzymkomplexe ist applikationsabhängig und neben den enzymologischen Charakteristika der Enzymkomponenten von ausschlaggebender Bedeutung für den jeweiligen Einsatz der Enzymkomplexe.

Beim Einsatz von Enzymen in Prozessen der Zellstoff- und Papierindustrie handelt es sich in der Regel um sog. „Einweg-Enzyme“, d.h. die Enzyme können aus dem Prozess nicht rückgewonnen werden. Damit sind für einen wirtschaftlichen Prozess die zulässigen Kosten für die Enzyme begrenzt. Wesentliche Kriterien der Wirtschaftlichkeit des Einsatzes technischer En-

zyme für die enzymatische Modifikation von Lignocellulose-Faserstoffen werden von den nachfolgenden Fakten bestimmt:

(1) Enzymologische Charakteristika

- Spezifische Aktivität der Enzyme
- Die gemessene Aktivität von Enzymkomponenten, z.B. von verschiedenen Endoglucanasen, ist kein hinreichendes Kriterium für deren Eignung; beispielsweise ist die anwendungsbezogene Adsorption der Enzymkomponenten an das Substrat zu berücksichtigen
- pH und Temperaturoptima der Enzyme
- Enzymstabilität, z.B. Stabilität gegen Scherkräfte

(2) Prozessführung der Enzymgewinnung

- Einsatz genetisch stabiler Produktionsstämme mit hoher Exkretionsleistung der Enzyme ins Fermentationsmedium
- Prozesstechniken zur Realisierung der genetisch fixierten Enzymbildung der Produktionsstämme im Fermentationsprozess, z.B. feedback-kontrollierte fed-batch-Techniken
- Applikationsbezogene Optimierung des Nährmediums
- Kosten für die Abtrennung/Aufkonzentrierung der Enzyme aus dem Fermentationsprozess

(3) Enzymapplikation

- Optimale Zusammensetzung der Enzymkomplexe
- Enzymstabilität im Prozess
- Anpassung von pH- und Temperaturoptimum der Enzyme an den pH und die Temperatur des Applikationsprozesses
- Minimierung des Enzymeinsatzes und der Inkubationszeit

(4) Möglichkeiten zur Kostenreduzierung

- Reduzierung der Kosten für das Fermentationsmedium, z.B. Verwendung von Dünn- oder Rohschlempe als Substrat/Induktor für die Fermentation
- Einsatz von Kulturfiltrat der Fermentation ohne kostenintensives down stream processing
- Minimierung des Enzymeinsatzes durch Substrat-optimierte Enzymkomplexe

Aus den vorliegenden Untersuchungen ergeben sich weiterführende Forschungsarbeiten, um den Enzymeinsatz für Anwendungen in der Zellstoff- und Papierindustrie zu verbessern und ggf. neue Anwendungen zu erschließen:

- Aufklärung der molekularen Mechanismen der enzymatischen Modifikation von Lignocellulose

- Entwicklung anwendungsoptimierter Produktionsstämme mittels molekularbiologischer/gentechnischer Methoden.

Die Aufwendungen hierfür betreffen Grundlagenforschungen, die über den Umfang eines Projektes wie im vorliegenden Fall weit hinausgehen. Die enzymatische Nutzung von Lignocellulose zur Gewinnung von Ethanol und anderen Rohstoffen findet seinen Niederschlag in umfangreichen Förderprojekten des 7. Rahmenprogrammes der EU. Hier sind sicher Ergebnisse zu erwarten, die auch für den Enzymeinsatz in der Zellstoff- und Papierindustrie nutzbar sind.

## **7.2 Zusammenfassung zur Papierherstellung**

Im Labor wurden Enzymzugabemengen und Inkubationszeiten bei verschiedenen Holzstoffen variiert. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Enzymmenge von 1 % auf otro Holzstoff und der Inkubationsdauer von 10 Minuten im neutralen Bereich erzielt. Der Einsatz von unterschiedlich wirksamen hydrolytischen Enzymkomplexen brachte bei allen Holzstoffen eine Verringerung des Entwässerungswiderstandes und bei TMP eine Erhöhung der Festigkeiten. Bei PGW und SGW konnte Steigerung der Festigkeiten nicht erreicht werden.

Bei Versuchen mit einer an die Inkubation anschließenden Mahlbehandlung von TMP in der Jokro-Mühle konnte gezeigt werden, dass ein nahezu gleiches Festigkeitsniveau wie bei unbehandelten gemahlten Proben, aber mit verringertem Entwässerungswiderstand erreicht werden kann.

Mit dem Laccase-Präparat NL 51003 und den gewählten Inkubationsbedingungen konnten keine Verbesserungen der Festigkeitseigenschaften erzielt werden. Außerdem führte schon die geringster Zugabe von Laccase bei allen Holzstoffen im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Cellulase zu einem starken Weißgradverlust.

Bei der TMP-Herstellung aus Fichtenholzhackschnitzeln an der TMP-Anlage des Instituts konnte durch eine Enzymbehandlung mit SIAB II zwischen der 1. und 2. Mahlstufe mit einem 20 % niedrigerem Mahlaufwand gleiche bis bessere Festigkeitseigenschaften erzielt werden. Abwasseruntersuchungen zeigten leicht erhöhte CSB- und BSB-Werte bei den enzymbehandelten gegenüber den unbehandelten Proben und beweisen damit auch den Abbau von organischer Substanz durch die Enzyme.

Im Labor konnten bei der Nachmahlung von PGW-Grobstoffen mit einer vorausgehenden Enzymbehandlung die statischen Festigkeiten verbessert werden. Durch die Mahlung werden aber die Festigkeitseigenschaften der Holzstoffe stärker verändert, als durch die Enzymbehandlung. Die eingesetzten Enzymsysteme haben jedoch in Bezug auf Dosierung und Aktivitäten sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Festigkeitseigenschaften. Mit den Enzymen SIAB III und ECOPULP ENERGY wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Bei dem Großversuch über 3 Tage konnte durch den Enzymeinsatz bei der Nachmahlung von PGW-Grobstoffen der Energieaufwand in der Schleiferei der Papierfabrik gesenkt werden. Für eine erfolgreiche Anwendung ist dabei jedoch erforderlich, dass der Enzymeinsatz kostengünstig gestaltet wird.

Neue Impulse werden durch effektivere Verfahren zur Hackschnitzelvorbereitung und bei der Holzstofferzeugung erwartet.

### **7.3 Zusammenfassung zur Dämmplattenherstellung**

Die Untersuchungen zum Einsatz von Enzymen bei der Dämmplattenherstellung haben vorwiegend positive Ergebnisse auf die Eigenschaften von Laborblättern und Dämmplatten gezeigt. Durch den Einsatz von hydrolytischen Enzymen bei der Dämmplattenherstellung konnten sowohl mechanische als auch hygroskopische Eigenschaften dieser Werkstoffe verbessert werden. Insbesondere die Biegefestigkeiten, aber vor allem die Wasseraufnahme der Dämmplatten konnten stark verbessert werden. Die Enzyme könnten einen großen Teil der Additive substituieren, die üblicherweise bei der Dämmplattenherstellung im Nassverfahren eingesetzt werden. Beim Einsatz von Additiven und Enzymen in Kombination konnten Dämmstoffe mit sehr geringer Wasseraufnahme (unter 1 kg/m<sup>2</sup>) hergestellt werden. Diese unterschreiten selbst Normwerte für Dämmplatten nach dem Trockenverfahren.

Die eingesetzten hydrolytischen Enzyme (Cellulase, Xylanase-Komplexe und deren Kombination) erweisen sich sehr stabil gegenüber Prozesswasser. Obwohl das Prozesswasser kaum Einfluss auf die Aktivität der hydrolytischen Enzyme hat, zeigt es doch negative Wirkung auf die Festigkeitseigenschaften der Laborblätter. Diese negative Wirkung konnte aber durch den Einsatz hydrolytischer Enzyme mehr als ausgeglichen werden. Von allen eingesetzten Enzymen erweist sich Ecopulp TX 200 als das geeignetste Enzym für die Herstellung von Dämmplatten im Nassverfahren. Im Gegensatz zeigen phenoloxydierende Enzyme wie Laccase nur positive Wirkung auf die Eigenschaften der Laborblätter, wenn kein Prozesswasser bei der Inkubation der Faserstoffe mit diesem Enzym eingesetzt wird. Dieses Enzym ist somit kaum geeignet für die industrielle Herstellung von Dämmplatten im Nassverfahren.

Die Abwasserbelastung wird durch den Enzymeinsatz nur in geringem Maße erhöht. Der Enzym- und Additiveinsatz (vor allen Hydrophobierungs- und Fällungsmittel) kann je nach Anforderungen noch weiter reduziert werden. Hier besteht noch Optimierungspotenzial. Dazu sind aber noch weitere Untersuchungen im Produktionsmaßstab notwendig.

## **8 Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse**

### **8.1 Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse**

Zur Nutzergruppe der im Projekt gewonnenen Ergebnisse gehören klein- und mittelständische Betriebe der Papier-, Zellstoff- und Holzwerkstoffindustrie sowie Enzymproduzenten. Für Holzstoffverarbeiter ergeben sich durch Nutzung der Forschungsergebnisse insbesondere

Möglichkeiten der Energieeinsparung bei der Zerfaserung bei gleichbleibend guten Eigenschaften.

Aufgrund des interdisziplinären Lösungsansatzes durch die Integration biotechnologischer Methoden bietet das Verfahren eine innovative Alternative zum Einsatz von anderen festigkeitserhöhenden Zusätzen bei der Papier- und Dämmplattenherstellung.

Durch den Einsatz von Enzymen können Festigkeitsreserven ohne oder mit weniger Zusatzstoffen erschlossen werden. Durch eine kontrollierte enzymkatalysierte Depolymerisation von Hemicellulose und Lignin zwischen den Mahlstufen soll der Aufschlussgrad des Faserstoffes erhöht werden. Bessere Verarbeitungseigenschaften der Rohstoffe führen zu einer Produktivitätssteigerung bei der Herstellung von Papierprodukten. Papierprodukte und Holzfaserdämmplatten werden zum überwiegenden Teil aus natürlichen Rohstoffen hergestellt. Ein Umstand, der ihre hohe Akzeptanz in der Gesellschaft prägt. Mit dem Einsatz von Enzymen zur Verbesserung der Produkteigenschaften wird diesem Anspruch weiter Rechnung getragen.

Es werden konkurrenzfähige und umweltfreundliche Produkte hergestellt. Dadurch können langfristig Arbeitsplätze gesichert und neue Investitionen angeregt werden. Durch den Einsatz lignozellulöser Rohstoffe ergeben sich außerdem erweiterte Absatzchancen für die regionale Forstwirtschaft. Des Weiteren wird durch das Verfahren ein völlig neues Einsatzfeld für biotechnologische Produkte und Industrieenzyme mit bedeutendem Marktpotenzial geschaffen.

Eine Präsentation erster Projektergebnisse für die Öffentlichkeit erfolgte bereits zu den AIF-Tagen am 20.03.2007 und 10.04.2008 in Darmstadt. Des weiteren erfolgte eine Präsentation der Projektergebnisse auf dem PTS- Fachseminar:

Kerns, G., Unbehaun, H., Weber P.-G., Fischer, R.: Modifizierung von lignocellulösen Faserstoffen mit hydrolytischen Enzymkomplexen, Vortrag zum PTS – Fachseminar: „Nanotechnologisch modifizierte Fasern - Schlüssel für die zukünftige Entwicklung neuer Papierprodukte? am 01.10.2008 in Heidenau.

Eine weitere Präsentation aller Projektergebnisse für den AIF Tag am 24.03.2009 und zur LIGNA (18.-24.05.2009) in Hannover sind in Vorbereitung.

Zur weiteren Verbreitung der Ergebnisse sind außerdem Veröffentlichungen in fachspezifischen Zeitschriften wie

- dem Wochenblatt für Papierfabrikation,
- dem Holzzentralblatt,
- der Holztechnologie,
- der Holz als Roh- und Werkstoff

geplant.

Präsentationen auf Fachmessen sind ebenso vorgesehen wie Vorträge auf relevanten Fachsymposien wie z. B. dem in zweijährigem Rhythmus stattfindenden PTS- Faserstoffsymposium, der APV-Jahrestagung, dem Zellcheming-Kongress.

## **8.2 Industrielle Umsetzung der angestrebten Forschungsergebnisse**

Die Entwicklung des neuen Verfahrens erfolgte von Beginn an in enger Zusammenarbeit mit Industriepartnern aus den relevanten Industriebereichen. Während der Projektbearbeitung wurde durch Konsultationen und eine Einbeziehung der im projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Firmen der Papier- und Holzwerkstoffindustrie sowie Enzymproduzenten eine praxisrelevante Realisierung der Forschungsaufgabe erreicht. In einem Upscalingversuch und einem Industrierversuch wurde die Eignung der entwickelten Verfahren im Industriemaßstab verifiziert. Insbesondere die im projektbegleitenden Ausschuss mitarbeitenden Unternehmen haben ein Interesse an einer Umsetzung der Forschungsergebnisse in die Praxis.

Es wird ein weiterführender Transfer zu Holzstoff- und Papiererzeugern, Dämmplatten- und Enzymherstellern angestrebt.

Zur weiteren Bekanntmachung der Ergebnisse sind außerdem weitere Vorträge und Veröffentlichungen in fachspezifischen Zeitschriften geplant. Präsentationen auf Fachmessen sind ebenso vorgesehen wie die Veröffentlichung von Forschungsergebnissen im Internet.

## 9 Literatur- und Normenverzeichnis

### 9.1 Literaturverzeichnis

- Bajpal, P.; Bajpal, P.K.; Kondo, R.: Pulp Bleaching with Xylanases. In: Biotechnology for Environmental Protection in the Pulp and Paper Industry. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1999. Chapter 4, 49-64
- Bajpal, P.; Bajpal, P. K.; Kondo, R.: Wood Pretreatment to remove toxic extrac-tives. In: Bio-technology for Environmental Protection in the Pulp and Paper Industry. Berlin; Heidel-berg: Springer Verlag, 1999. Chapter 2, 13-28
- Blechschmidt, J.; Heinemann, S., Süß, H.-U.: Mechanical Pulping. In: Sixta, H. (Hrsg.): Handbook of Pulp, Volume 2. 1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH, 2006
- Blechschmidt, J., Opherden, A.: Aufbau des Holzes. In: Technologie der Holzstofferzeugung. 1. Auflage, 1985
- Bos, J. H.; Veerstra, P.; Verhoeven, H.; Vos, P. D.: Das Papierbuch – Handbuch der Papierherstellung. 1. Auflage. Houten: EPN Verlag, 1999.
- Call, H.P.; Raven, A.; Leyrer, H.: Einsatz von lignolytischen Enzymen bei der Zellstoff- und Papierherstellung (Biopulping, Biobleaching). In: Das Papier 44 (1990), Heft 10A, V33-V41
- Chang, H.-M.; Kirk, T.K.; Stomp, A.M.: Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. TAPPI China Paper Conference Proceedings, 1993
- DE 10 2006 022 729 B4: Verfahren zur Verwertung von Schlempe; Anmeldung: 10.05.2006.
- Erhard, K.: Ladungseigenschaften von Fasern – Titrationsverfahren zur Bestimmung von funk-tionellen Gruppen, (Hrsg.) PTS- Manuskript NF 837, München, 2008
- Eriksson, K.-E.; Vallander, L.: Properties of Pulps from Thermomechanical Pulpings of Chips Pretreated with Fungi. In: Svensk Papperstidning 85 (1982), No. 6, R33-R38
- Eriksson, L.A.; Heitmann, J. A.: Applications of enzyme technology in the paper industry. TAPPI Pulping Conference Proceedings, 1998
- Fujita, Y.; Awaji, H.; Taneda, H.; Matsukura, M.; Hata, K.; Shimoto, H.; Sharoyo, M.; Sakagu-chi, H.; Gibson, K.: Recent advances in enzymic pitch control. Tappi J. 75, 117-122 (1992)
- GDI – Gesamtverband Dämmstoffindustrie 2007
- Ghose, T. K., Bisaria, V. S., (1984), Measurement of Hemicellulase Activities. Part 1. Xy-lanases, Commission on Biotechnology, IUPAC, Pure & Appl. Chem., 59 (12), 1739-1752
- Ghose, T. K., (1987), Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem., 1987, Vol. 59, No. 2, pp. 257-268

- Grethlein, H.E.: The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Bio/Technology*, 1985(3): p. 155 - 160.
- Gliese, T. Kleemann, S.: Enzymatische Verfahren in der Zellstoff- und Papierherstellung. In: *Wochenblatt für Papierfabrikation* 122 (1994), Nr. 8, 310-317
- Grossmann, H; Weber, P.-G.: *Holzstofftechnik 1*. TU Dresden, Institut für Holz- und Papier-technik, Vorlesungsskript Pulp Technologies, Dresden,
- Jaeger, K.-E.; Reetz, M.T.: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. In: *Trends in Biotechnology*, Volume 16, Issue 9 (1998) Pages 396-403, London: Elsevier Ltd., 2009
- Kerns, G.; Unbehaun, H. König, S., Bley, Th., Kühne, G., Wagenführ, A.: Untersuchungen zur enzymatischen Aktivierung von lignocellulosen Faserstoffen mit hydrolytischen Enzymen, erschienen im Tagungsband zur internationalen Tagung Naturstofftechnik 15./16.02.2001 der TU Dresden
- Kharazipour, A., Hüttermann, A., Trojaniwski, J., Nonniger, K.: Formkörper , insbesondere in Form einer Faserplatte, DE 43 40 518 A1, 1993
- Koch, G.: Raw Materials for Pulp. In: Sixta, H. (Hrsg.): *Handbook of Pulp*, Volume 1. ,1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH, 2006
- Koenig, S., Unbehaun, H., Kerns, G., Bley, Th., Wagenfuehr, A. 2002: Xylanase-/Cellulase complexes for the production of glue-free medium density fibre boards, Vortrag + Posterpräsentation zur Konferenz "Industrial Application of Biocatalysis", 22. – 27.06.2002 in Moskau
- Koenig, S.; Unbehaun, H.; Kerns, G.; Bley, Th.; Wagenfuehr, A.: Xylanase-/cellulase complexes for the production of adhesive-free medium density fibre boards. *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2, Khimiya* (2003), 44(1), 72-79
- Koenig, S.; Kerns, G.; Unbehaun, H.: Enzymatic modification of lignocellulosic substances for the production of materials from wood, Vortrag und Publikation im Tagungsband, *Biocatalysis 2007* in Moskau
- Limatainen, H.; Haikkala, P.; Lucander, M.; Karojärvi, R.; Tuovinen, O.: Grinding and Pressure Grinding. In: Gullichsen, J.; Paulöapuro, H. (Hrsg.): *Papermaking Science and Technology*, Book 5: Mechanical Pulping, Helsinki: Fapet Oy, 1999
- Lowry et al. 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265–275
- Moulin, U.-B., Petterson, B.: Improved papermaking by cellulase treatment before refining, *Abstract Book of 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, June 4-8, 2001, Helsinki, Finland, p. 78-79
- Megazyme, S-ACMC 04/07, Assay of endo-1,4-β-Glucanase (Cellulase) using Azo-CM-Cellulose, <<http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/S-ACMC.pdf>>, (07.01.2009)

N.N. Papier 2008 - Ein Leistungsbericht, VDP - Tabelle N 19

Ouyang, Jia; Yan, Ming; Kong, Dechong; Xu, Lin. A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Journal*, (2006), 1(11), 1266-1274

Pere, J., Siika-Aho, M., Viikari, L., (1994): Verfahren zur Herstellung von mechanischem Faserbrei, DE 694 12 077 T2, EP 0687 320 B1, Valtion Teknillinen Tutkimuskes, Espoo 1994

Pere, J., Siika-Aho, M., Viikari, L., Process and enzyme preparation for preparing mechanical pulp, in Patent Cooperation Treaty Application. 1994: CA 2 157 512.

Pere, J., Siika-Aho, M., Viikari, L., Biomechanical pulping with enzymes: response of coarse mechanical pulp to enzymatic modification and secondary refining. *Tappi Journal*, 2000. 80(5)

Pere, J., Ellmen, J., Viikari, L., Process for preparing mechanical pulp. 2007:US 2007/0151683 A1

Scott, G.M.; Swantney, R.: New Technology for Papermaking: Biopulping Economics. In: *TAPPI Journal* 81 (1998), No. 12, 153-157

Srebotnik, E., Messner, K., Enzymatic attack of wood is limited by the inaccessibility of the substrate, in *Biotechnology in pulp and paper manufacture*, T.K. Kirk, Chang, H., Editor. 1990, Butterworth-Heinemann: London. p. 111- 122.

Swaney, R.; Akthar, M.; Horn, E.; Lentz, M.; Houtman, C.; Klungsnee, J.: Commercialization of Biopulping: An Energy-Saving and Environmentally-Friendly Technology for the Paper Industry. *TAPPI Fall Technical Conference*, 2000

Tienvieri, T.; Huusari, E.; Sundholm, J.; Vuorio, P.; Kortelainen, J.; Nystedt, H.; Artamo, A. : Thermomechanical Pulping. In: Gullichsen, J.; Paulapuro, H. (Hrsg.): *Papermaking Science and Technology*, Book 5: Mechanical Pulping, Helsinki: Fapet Oy, 1999

Unbehaun, H., König, S., Kerns, G., Kühne, G., Wagenführ, A., Bley, Th.: Verfahren zur enzymatischen Aktivierung von lignozellulosen Faserstoffen zur Herstellung von Werkstoffen, DE 100 43 662 A1, 2001

Unbehaun, H., König, S., Kerns, G., Kühne, G., Wagenführ, A., Bley, Th.: Verfahren zur enzymatischen Aktivierung von lignozellulosen Faserstoffen zur Herstellung von Werkstoffen, EP 1184144 A2, 2002

Viforr, S.: New and innovative processes for radical changes in the European pulp & paper industry: Enzymatic pre-treatment of wood chips for energy reductions at mechanical pulp production - A review, Holmen Paper AB: Project 500345 (NMP2-CT-2004-500345); Project acronym: ECOTARGET, 30 May 2008

Wagenführ, A., Tech, S., Unbehaun, H., Telschow, D., Albrecht, B.: Bindemittelfreier Faserdämmstoff und Verfahren zu dessen Herstellung, DE 10164659C2, 2003

Wagenführ, A.; Tech, S.; Unbehaun, H.: Modifizierung der Holzeigenschaften durch Enzyme, Schweizer Zeitschrift für Forstwesen, 156 (2005) 11

Wang, X.H., Ma, J. H., Jiang, C. L., Brown, W. D. JR., Treatment of wood chips using enzymes. 2007: WO2007035481

Wong, K.K.Y.; Mansfield, S.D.: Enzymatic processing in the pulp and paper manufacture – a review. In: APPITA Journal 52 (1999), No. 6, 409-418

Yde, B.: Polymerization of lignin at alkaline pH, WO 94/01488, 1993

## 9.2 Normenverzeichnis

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>DIN EN 323</b>        | Holzwerkstoffe; Bestimmung der Rohdichte, 1993  |
| <b>DIN EN 310</b>        | Holzwerkstoffe; Bestimmung des E-Moduls und der Biegefestigkeit, 1990   |
| <b>DIN EN 317</b>        | Spanplatte; Bestimmung der Dickenquellung nach Wasserlagerung, 1990   |
| <b>DIN 53115</b>         | Weiterreißprüfung nach Brecht-Imset; 12/1977  |
| <b>DIN 53124</b>         | Bestimmung des pH-Wertes in wässrigen Extrakten   |
| <b>DIN 53140</b>         | Farbmessung und Farbortbestimmung; Aufnahme der Werte L*, a*, b* bei D65-10; 07/1992                                      |
| <b>DIN 53145-1</b>       | Messgrundlagen zur Bestimmung des Reflexionsfaktors – Messung an nicht fluoreszierenden Proben; 03/2000                   |
| <b>DIN 53146</b>         | Bestimmung der Opazität; 04/2000  |
| <b>DIN 54360</b>         | Faserstoff-Labormahlung – Jokro-Mühle-Verfahren, 07/2004  |
| <b>DIN 54500</b>         | Bestimmung der dichtebezogenen Lichtstreu- und Lichtabsorptionskoeffizienten von Faserstoffen und Papieren; 04/2004       |
| <b>DIN EN 1899-1</b>     | Biochemischen Sauerstoffbedarf BSB <sub>n</sub> , 1998-05   |
| <b>DIN EN 20187</b>      | Normklima für die Vorbehandlung und Prüfung und Verfahren zur Überwachung des Klimas und der Probenvorbehandlung; 11/1993 |
| <b>DIN EN 20287</b>      | Bestimmung des Feuchtegehalts; 09/1994  |
| <b>DIN EN ISO1924-2</b>  | Bestimmung von Eigenschaften bei zugförmiger Belastung; 04/1995   |
| <b>DIN EN ISO 4119</b>   | Halbstoffe – Bestimmung der Stoffdichte; 05/1996  |
| <b>DIN EN ISO 5263-2</b> | Faserstoffe – Nassaufschlagen im Laboratorium; 12/2004  |
| <b>DIN EN ISO 5267-1</b> | Prüfung des Entwässerungsverhaltens; 10/2000  |
| <b>DIN EN ISO 5269-2</b> | Faserstoffe - Laborblattbildung für physikalische Prüfungen; 03/2005  |
| <b>DIN EN ISO 534</b>    | Bestimmung der Dicke, der Dichte und des spezifischen Volumens; 05/2005   |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>DIN EN ISO 536</b> | Bestimmung der flächenbezogenen Masse; 08/1996  |
| <b>FHIS 164</b>       | Prüfen von Faserstoff aus Holz, Trockene Siebfraktionierung, 1982   |
| <b>FHIS 256</b>       | Bestimmung der Zellulose nach Kürschner und Hoffer an Vollholz, 1976  |
| <b>LCK 014</b>        | CSB Küvetten-Test Messbereich 1000-10000 mg/l, Dr. Lang 2001-09   |
| <b>WIHS 177</b>       | Bestimmung des Lignins und des Gesamtzuckers; modifizierte Bestimmung nach Savard an Holzwerkstoff, Faserstoff und Spangemischen, 1983      |
| <b>ZM IV/33/57</b>    | Modifiziertes Verfahren (Lehrstuhlmethode) zur Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens in Anlehnung an das angegebene Zellcheming-Merkblatt |
| <b>ZM V/1.4/86</b>    | Holzstoff-Fraktionierung nach Bauer McNett  |