

Mathieu Brulé, Hans Oechsner, Lutz Fischer, Andreas Lemmer und Thomas Jungbluth, Hohenheim

Einfluss der enzymatischen Substrataufbereitung auf den Biogasertrag von Energiepflanzen

Enzymzusätze werden in der Praxis bei einigen landwirtschaftlichen Biogasanlagen eingesetzt, um den Methanertrag der eingesetzten Biomasse durch einen verbesserten Abbau des Faseranteils (Zellulose und Hemi-Zellulose) zu erhöhen. Zur Beurteilung des Enzymeinflusses auf den anaeroben Abbau der Biomasse wurden umfangreiche Gärtests mit dem Verfahren des Hohenheimer Biogasertragstest (HBT) durchgeführt. Durch die Enzymzugabe konnte in den bisher durchgeführten Batchversuchen kein deutlich positiver Einfluss auf den Methanertrag der Testsubstrate nachgewiesen werden.

Mathieu Brulé ist Doktorand, Dr. Andreas Lemmer ist wissenschaftlicher Mitarbeiter und Dr. Hans Oechsner leitet die Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim, Garbenstrasse 9, 70599 Stuttgart; e-mail: mathieu.brule@uni-hohenheim.de Die Promotion von Mathieu Brulé betreut Prof. Dr. Thomas Jungbluth, Institut für Agrartechnik, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie (Leitung: Prof. Dr. Lutz Fischer) der Universität Hohenheim.

Schlüsselwörter

Biogas, Enzyme, Methanertrag, Fasern

Keywords

Biogas, enzymes, methane yield, fibres

Literatur

Literaturhinweise sind unter LT 07612 über Internet <http://www.landwirtschaftsverlag.com/landtech/local/fliteratur.htm> abrufbar.

In Deutschland setzt sich aufgrund der seit Mitte 2004 veränderten Rahmenbedingungen (EEG) bei einer zunehmenden Anzahl landwirtschaftlicher Biogasanlagen die Kofermentation von Gülle mit nachwachsenden Rohstoffen durch.

Problematisch bei der Verwendung von faserreichen Energiepflanzen oder Pflanzenbestandteilen (Maisstroh) ist, dass ein wesentlicher Teil des Substrats (vor allem Zellulose, Hemi-Zellulose und Lignin) durch anaerobe Bakterien nur langsam oder lediglich in geringem Umfang abgebaut werden kann. Faserspaltende Enzymzusätze werden in einigen landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit dem Ziel eingesetzt, höhere Biogasausbeuten aus Energiepflanzen zu erzielen und deren Abbau zu beschleunigen.

Enzyme sind spezielle Proteine, die bei allen Lebewesen als Biokatalysatoren fungieren. Enzyme werden je nach Reaktion, die sie katalysieren, in verschiedene Enzymklassen eingeteilt. Um die langen Zuckerketten von schwer abbaubaren Fasern (Zellulose und Hemi-Zellulose) zu kleineren Molekülen und löslichen Zuckern zu spalten, kommen Hydrolasen (hier: Glykosidasen) zum Einsatz. Als natürliche, organische Substanz unterliegen sie jedoch auch dem Abbau in Biogasanlagen. Bisher liegen keine Erkenntnisse darüber vor, in welchem Zeitraum die Hydrolasen durch die proteolytische Abbauwirkung der anaeroben Mikroorganismen inaktiviert werden.

Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war es, die Wirkung kommerzieller zellulose- und xylanspaltender Enzym-

präparate beim anaeroben Substratabbau durch diskontinuierliche Gärversuche in Laborfermentern zu überprüfen.

Material und Methoden

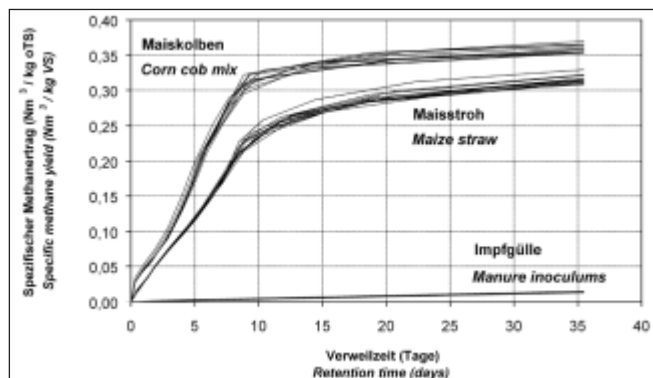
Maispflanzen der Sorte Gavott wurden am 8. September 2006 im Stadium der beginnenden Milchreife (Kolbenanteil der Frischmasse: 39 %) auf einem Versuchsfeld der Universität Hohenheim geerntet. Das Erntegut wurde in zwei Fraktionen (Maiskolben und Maisstroh) aufgeteilt. Die Substrate wurden mit einem Labormixer klein gehäckselt (Häcksellänge ~ 4 mm) und bis zum Versuchsansatz eingefroren.

Das Methanertragspotenzial des pflanzlichen Substrats wurde mit dem Hohenheimer Biogasertragstest (HBT) bestimmt [1]. Die standardisierten Durchführungsbedingungen des Gärtests entsprechen den Vorschriften der VDI Richtlinie 4630 und DIN 38414, Teil 8 [2, 3].

Bei dem angewandten Batchverfahren wurden zu Beginn des Gärprozesses rund 400 mg organische Trockenmasse (oTS) aus den pflanzlichen Substraten, also 900 mg frisch gehäckselter Maiskolben oder 1800 mg gehäckselttes Maisstroh zusammen mit 30 g flüssigem Inokulum in 100 ml Kolbenprober eingebracht. Als Impfgülle wurde das kultivierte Standardinokulum der Landesanstalt mit einer geringen Eigengasbildung verwendet, so dass der größte Teil des beim Versuch entstehenden Gases aus dem pflanzlichen Testsubstrat stammte.

Bild 1: Verlauf der Methanbildung aller Varianten von Maiskolben, Maisstroh und Impfgülle; jeweils Mittelwerte aus drei Wiederholungen

Fig. 1: Curves of cumulated methane production from all variants of maize cobs, maize straw and liquid manure inoculums; average values from three repetitions



Im Rahmen der Versuche wurden vier kommerzielle Laborenzymmischungen getestet (A, B, C, D). Die Enzympräparate wurden beim Start des Batch-Gärversuchs in zwei verschiedenen Dosierungen zugesetzt: 0,1 g/kg oTS und 1 g/kg oTS. Für jedes Enzym wurde eine inaktivierte Variante (Inaktivierung der katalytisch aktiven Proteinstruktur durch Erhitzung auf 95° C für 15 min) in der höchsten Dosierstufe von 1 g/kg oTS eingesetzt.

Die Vergärung dauerte 35 Tage bei 37 °C. Über die gesamte Versuchsdauer wurden sowohl die gebildete Gasmenge als auch der Methanengehalt regelmäßig ermittelt. Die Methanerträge aus dem Impfmateriale wurden jeweils von den Methanerträgen der Proben mit Maiskolben und Maisstroh abgezogen.

Für jede Variante wurden drei Wiederholungen angesetzt. Die Substrate wurden auch ohne Zugabe von Enzymen vergoren. Diese „Nullvarianten“ wurden als Basis für die Berechnungen der Methanertragssteigerungen durch den Enzymeinsatz verwendet.

Beschreibung der eingesetzten Enzympräparate

Zwei der eingesetzten Präparate (A und B) wurden von den Herstellerfirmen speziell für die Anwendung in Biogasanlagen entwickelt. Die anderen Präparate (C und D) werden zur Bioethanolherstellung oder für technische Anwendungen der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Präparate A und C sind Enzymgemische (Zellulasen und Xylanasen), die vom Fadenpilz *Trichoderma reesei* gebildet werden. Präparat D ist eine β -Glucosidase aus dem Pilz *Aspergillus niger*. Präparat B ist ein Mikroorganismen/Enzymgemisch, welches ohne Enzymabtrennungsschritt hergestellt wurde und daher neben den Enzymen auch kultivierbare Mikroorganismen enthält.

Substratzusammensetzung

Die biochemische Zusammensetzung der Fraktionen „Maiskolben“ und „Maisstroh“ wurde nach der Weender- und Van Soest-Analyse [4] bestimmt. Die Gehalte betragen in Bezug auf die organische Trockenmasse für Maisstroh: NfE 27 %, ADF 37 %, NDF 64 %, ADL 4%, Rohprotein (RP) 7 %, Rohfett (RL) 2 %. Für Maiskolben wurden folgende Werte ermittelt: NfE 63 %, ADF 9 %, NDF 24 %, ADL 1 %, RP 9 %, RL 4 %.

Ergebnisse der Gärversuche

Der Verlauf der Methanbildung innerhalb der verschiedenen Varianten von Maiskolben, Maisstroh und Impfgülle über die Ver-

Zudosierung von Enzyme <i>Enzyme dosage</i>	Zugesetzte Enzyme <i>Enzyme added</i>	Spezifischer Methanertrag ($\text{Nm}^3 / \text{kg oTS}$) <i>Specific methane yield ($\text{Nm}^3 / \text{kg VS}$)</i>	
		Maiskolben <i>corn cob mix</i>	Maisstroh <i>Maize straw</i>
ohne Enzyme <i>Without Enzyme</i>	keine <i>none</i>	0,354	0,314
1 g/kg TS inaktiviert <i>inactivated</i>	A (Cellulase ; Xylanase)	n. E. / nd.	0,322
	B (Gemisch ⁽¹⁾ - <i>Mixture</i> ⁽¹⁾)	0,366	0,315
	C (Cellulase ; Xylanase)	0,362	0,322
	D (β -Glucosidase)	0,365 *	0,309
0,1 g / kg TS aktiv <i>active</i>	A (Cellulase ; Xylanase)	0,359	0,314
	B (Gemisch ⁽¹⁾ - <i>Mixture</i> ⁽¹⁾)	0,355	0,311
	C (Cellulase ; Xylanase)	0,357	0,318
	D (β -Glucosidase)	0,355	0,313
1 g / kg TS aktiv <i>active</i>	A (Cellulase ; Xylanase)	0,360	0,309
	B (Gemisch ⁽¹⁾ - <i>Mixture</i> ⁽¹⁾)	0,369 *	0,330 *
	C (Cellulase ; Xylanase)	0,354	0,318
	D (β -Glucosidase)	0,357	0,316

Tab. 1: Spezifische Methanerträge von Maisstroh und Maiskolben mit und ohne Enzymzusatz; Endwerte nach 35 Tagen Vergärung bei 37 °C; Mittelwerte aus drei Wiederholungen; n. e. = nicht erfasst; (1) = Enzym-Mikroorganismen Mischpräparat; * signifikanter Unterschied zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$) bezogen auf die Variante ohne Enzymzugabe

Table 1: Specific methane yields of maize straw and maize cobs with and without enzymes added; final values after 35 days digestion at 37°C; average values from three repetitions; n.d. = not determined; (1) = enzymes + microorganisms mixture; * significant difference at a probability of error of 5 % ($P < 0,05$) towards the variant without enzyme additive

weildauer von 35 Tagen ist in *Bild 1* dargestellt. In keiner der Versuchsvarianten war eine Störung oder Verzögerung des Gärverlaufs zu beobachten.

Der spezifische Methanertrag pro Einheit organischer Trockenmasse nach 35 Tagen Vergärung betrug bei Maisstroh ohne Enzymzugabe $0,314 \text{ Nm}^3 / \text{kg oTS}$ und bei Maiskolben $0,353 \text{ Nm}^3 / \text{kg oTS}$.

In *Tabelle 1* sind die Norm-Methanerträge von Maisstroh und Maiskolben nach einer Verweilzeit von 35 Tage dargestellt. Durch Zugabe von Enzymen wurde keine eindeutige Ertragssteigerung gegenüber den Kontrollvarianten festgestellt.

Bei Maisstroh wurde eine maximale Steigerung des Methanertrages um 5,0 %, bei Maiskolben um 4,6 % erzielt. Erstaunlicherweise wurde bei einigen Enzymen ein positiver Effekt auch bei Zusatz des inaktivierten Enzyms („Null-Probe“) erzielt.

Durch einen Student-Test (t-Test) der Werte der Methanausbeute konnte bei einigen Varianten ein signifikanter ($P < 0,01$), jedoch kein sehr signifikanter ($P < 0,001$) Unterschied gegenüber den enzymfreien Varianten festgestellt werden.

Die Standardabweichungen der Methanerträge lagen bei Maiskolben und Maisstroh zwischen 0,2 und 3,6 %.

Diskussion

Der Einsatz von Enzymen (Hydrolasen) brachte im Gegensatz zu veröffentlichten Ergebnissen anderer Forschergruppen bei der hier dargestellten Untersuchung nur eine be-

scheidene Ertragssteigerung von maximal 5,0 %. Es zeigte sich auch keine Auswirkung auf die Gasbildungsgeschwindigkeit. Bei Maisstroh wäre bei Enzymzusatz ein deutlicher Effekt zu erwarten als bei Maiskolben, was durch die Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte.

Die geringe Wirkung der Enzymzusätze kann durch verschiedene Hypothesen erklärt werden:

- die Milieubedingungen bei der anaeroben Vergärung (Temperatur und pH) sind für die verwendeten Enzyme pilzlichen Ursprungs suboptimal [5],
- die Enzymzusätze verfügen nicht über das entsprechende Substratspektrum, um die Fasern der ausgewählten Substrate in vergärbare Zucker zu hydrolysieren [6],
- die zugesetzten Enzyme werden durch Proteasen lebender anaerober Mikroorganismen abgebaut [7]
- die zugesetzten Enzyme werden durch hohe Ligningehalte im Medium gehemmt [8]. Eine weitere Erklärung für die hier geringe Wirkung der Enzymzusätze wäre, dass im optimal ausgelegten Laborversuch bereits beste Abbaubedingungen vorherrschen, wodurch die zusätzlich zugesetzten Enzyme keine Ertragssteigerung mehr bewirken können. In Praxisanlagen hingegen, die im suboptimalem Zustand (hohe Raumbelastung) betrieben werden, könnte der Enzymzusatz die Prozessbiologie entlasten und eine gewisse Ertragssteigerung bringen. Dies müsste allerdings erst durch systematisch durchgeführte Versuche belegt werden.