

# Wertschöpfung aus Nachwachsenden Rohstoffen: Untersuchungen zur Wirkung optimierter Enzympräparate auf die Effizienzsteigerung der Biogasproduktion

## Schlussbericht zu Nr. 8.2 NKBF 98

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| ZE:<br>Bioreact GmbH<br>Mülheimer Straße 26<br>D-53840 Troisdorf   | Förderkennzeichen:<br>22012503 |
| Vorhabensbezeichnung:<br>Wertschöpfung aus Nachwachsenden Rohstoffen: Untersuchungen zur Wirkung optimierter Enzympräparate auf die Effizienzsteigerung der Biogasproduktion |                                |
| Laufzeit des Vorhabens:<br>01.04.2005-31.03.2006   |                                |
| Berichtszeitraum:<br>01.04.2005-31.03.2006   |                                |

## I. Einführung

### 1. Aufgabenstellung

Ziel des von der Bioreact GmbH koordinierten Verbundvorhabens war die Optimierung und Evaluierung neuartiger, hydrolytisch wirksamer Enzympräparate zur Beschleunigung des Biogasprozesses und zur Verbesserung der wirtschaftlichen Betriebsführung landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Fokussiert wurde dabei auf die Substrate Maissilage (MS), Grassilage (GS) und Roggenganzpflanzensilage (GPS).

Die Bioreact GmbH führte im Rahmen des Förderprojekts Arbeiten zur Verbesserung der Enzympräparate über eine Optimierung des Herstellungsverfahrens sowie zum scale-up des Verfahrens in den Labormaßstab durch. Zudem stellte das Unternehmen den Projektpartnern, dem Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik der Universität Bonn (kurz IZMB) und dem Institut für Pflanzenernährung der Universität Bonn (kurz IPE), Musterpräparate für deren Untersuchungen zur Verfügung.

### 2. Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

Grundlage für das Fördervorhaben war ein von der Bioreact GmbH bereits früher entwickeltes und zum Patent angemeldetes Verfahren zur Herstellung von Enzympräparaten durch Co-Kultivierung filamentöser Pilze auf pflanzlichen Substraten (durch Feststofffermentation). Das Unternehmen hatte bereits vor Projektbeginn umfangreiche Erfahrung in der Kultivierung pilzlicher Mikroorganismen und der Bioverfahrenstechnik der Feststofffermentation.

### 3. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Bei der Gewinnung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen werden verschiedene kommerzielle Enzympräparate bereits seit längerer Zeit eingesetzt und mehrere Unternehmen stellen solche Präparate zur Verfügung oder arbeiten an deren Entwicklung (Cowatec, Schmack AG, ASA Spezialenzyme GmbH, Novozymes, Genencor). Diese Präparate zielen vornehmlich auf eine Beschleunigung der Hydrolyse (Verzuckerung) von Nicht-Stärke-Polysacchariden (Cellulose, Xylane) als Bestandteil pflanzlicher Substrate, welche durch die bakterielle Flora unter anaeroben Bedingungen nur ungenügend erfolgt. Aufgrund der durch die Herstellungsmethode (Submersfermentation) bedingten hohen Kosten dieser Präparate können sie aber kaum wirtschaftlich eingesetzt werden. Zudem fehlen solche Enzymaktivitäten, die für die Auflösung des strukturellen molekularen Gefüges pflanzlicher Zellgewebe essentiell sind (z. B. Esterasen). Ohne diese 'Nebenaktivitäten' können die Zielmoleküle Cellulose und Xylan nicht ausreichend für ihre Schlüsselenzyme Cellulase und Xylanase (die wesentlicher Bestandteil der bisher kommerziell erhältlichen Präparate sind) bioverfügbar gemacht werden. Andere Hydrolasen könnten den genannten Produkten prinzipiell beigemischt werden, jedoch würden dadurch die Kosten vermutlich noch weiter steigen.

Die Bioreact GmbH hat ein Verfahren entdeckt, mit dem sich hydrolasereiche, komplex zusammengesetzte Enzympräparate kostengünstig und umweltfreundlich herstellen lassen. Bei diesem Verfahren werden mehrere Pilzarten auf pflanzlichen Reststoffen aus der Agrarindustrie in Abwesenheit einer freien wässrigen Phase co-kultiviert (Feststofffermentation). Die dabei entstehenden Enzympräparate sind aufgrund von Synergien zwischen den kultivierten Pilzarten besonders reichhaltig an verschiedensten Hydrolasen. Dadurch wirken sie nicht nur verzuckernd sondern schließen insgesamt das pflanzliche Gewebe auf molekularer Ebene effizient auf und machen die Polysaccharide so besser bioverfügbar.

Ähnliche Verfahren zur Herstellung pilzlicher Enzyme werden in Europa bisher kaum eingesetzt, weil im Produktionsmaßstab erhebliche technische Schwierigkeiten auftreten. In Frankreich produziert noch die Firma Lyven Enzyme durch Feststofffermentation. Die deutsche Prophyta GmbH arbeitet im Bereich der Entwicklung geeigneter Bioreaktoren für die Feststofffermentation und stellt Pflanzenschutzmittel kommerziell her. In asiatischen Ländern ist die Feststofffermentation dagegen schon seit langer Zeit Stand der Technik. Es existieren eine Reihe von Patentanmeldungen und Patenten zu Feststoffbioreaktoren. Das Besondere an dem neuen Verfahren der Bioreact GmbH ist die Nutzung von stabilen, synergistischen Mischkulturen, wofür eine spezielle Kultivierungstechnik benötigt wird.

Die Bioreact GmbH hat das beschriebene Verfahren zur Herstellung von Enzympräparaten im Juni 2003 zum Patent angemeldet (DPMA-10328552.07). Eine Erweiterung des Verfahrens durch die Verwendung von bereits vorkonditionierten Mikroorganismen wurde im Februar 2004 angemeldet (DPMA-102004 009161.7). Die PCT-Anmeldung EP-2004-051234 erfolgte im Juni 2004. Diese Patentanmeldungen bilden die Grundlage für die hier vorgestellten Arbeiten.

Die Bioreact GmbH führte im Rahmen des Fördervorhabens ständig eine stichwortbasierte Patentrecherche zu den Themen 'Feststofffermentation', 'Enzyme' und 'Biogas' durch. Dabei nutzte sie das Suchsystem Depatisnet des Deutschen Patent- und Markenamts.

Zudem führte die Bioreact GmbH regelmäßig eine Internetrecherche über bekannte Suchmaschinen sowie über Suchmaschinen für Fachartikel (beispielsweise Pubmed) durch. Desweiteren wurden die Webseiten von mit dem Themen 'Biogas' und 'Bioethanol' befassten Unternehmen, Organisationen und Verbänden häufig frequentiert.

#### 4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Verbundprojekts arbeitete die Bioreact GmbH als Projektkoordinator mit den Partnern IZMB und IPE eng zusammen. Die Bioreact GmbH arbeitete im Rahmen des Fördervorhabens an der Optimierung der Enzymprodukte vor allem durch eine Weiterentwicklung und Verbesserung der Kultivierungsmethode. Überwiegend arbeitete das Unternehmen am scale-up des Verfahrens in den Labormaßstab und stellte den Projektpartnern Musterpräparate für deren Untersuchungen zur Verfügung. Umgekehrt wurden die Analyseresultate und Zwischenergebnisse der Untersuchungen des IZMB und des IPE der Bioreact GmbH für deren weitere Versuchsplanung zur Verfügung gestellt. Der vierte Projektpartner, die Gewitra mbH, führte im Rahmen dieses Fördervorhabens keine Arbeiten durch.

## II. Ergebnisdarstellung und Ergebnisverwertung

### 1. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens

#### *Vorarbeiten und Identifikation erfolgversprechender Enzympräparate*

Die im Rahmen des Fördervorhabens von der Bioreact GmbH erzielten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Zunächst wurden in enger Zusammenarbeit mit dem IZMB Vorversuche zum Wachstum und zur Enzymbildung von insgesamt 15 zur Verfügung stehenden Pilzstämmen auf jeweils einer Auswahl aus 15 pflanzlichen Substraten sowie verschiedenen binären Substratkombinationen durchgeführt. Dazu wurden die Mikroorganismen in Glaskolben (100-500ml) bei Raumtemperatur und bei 30°C und je nach Substrat bei verschiedenen Materialfeuchten über mehrere Tage angezogen und hinsichtlich ihres Wachstums (optisch, Bioreact GmbH) sowie der gebildeten Enzymspektren (IZMB) charakterisiert. Auf der Basis dieser Vorversuche wurden 5 Pilzarten (*Ni*, *An*, *At*, *Ao* und *Tj*) sowie 7 Substrate (RES, RPS, RB, KP, MS, GS und GPS) für die weiteren Arbeiten im Rahmen des Projekts ausgewählt. MS, GS und GPS waren, wie beschrieben, gleichzeitig die Zielsubstrate für die Validierung der Leistungsfähigkeit der Enzympräparate.

Insgesamt 7 Kombinationen für erfolgversprechende Enzympräparate wurden auf der Basis dieser Versuche identifiziert:

E1: *Ni+An+At* als Mischkultur auf RES+RPS

E2: *Ao* auf RB

E3: *An+At* auf RES+GS

E4: *Ni* auf RES+RPS

E5: *Ni+At+Tj* als Blend von Einzelkulturen auf RES+GPS (*Ni*, *At*) und RES (*Tj*)

E6: Blend

E7: Blend

Die Präparate E1-E4 zeigten optisch ein gutes Pilzwachstum und gute Verzuckerungsleistungen an den Zielsubstraten (siehe den Schlussbericht des IZMB). Die Blends E7 und E8 waren Blends der Präparate E1-E4 und ergaben sich aus Überlegungen zum Design eines für die jeweiligen Zielsubstrate optimierten Enzymspektrums. Hierbei wurde mit dem IZMB intensiv zusammengearbeitet und neben dessen Versuchsergebnissen auch die chemische Zusammensetzung der Substrate und ihre Struktur berücksichtigt. E6 zeigte gemäß der Resultate des IZMB die beste Verzuckerungsleistung an MS und ist als universell anwendbares Präparat anzusehen, E7 zeigte die beste Verzuckerungsleistung an GS.

### *Scale-up in den Labormaßstab*

Im Anschluss an die Vorarbeiten im Kolbenmaßstab wurden Experimente durchgeführt mit dem Ziel, die Herstellungsmethode für die Enzympräparate E1-E4 in den Labormaßstab zu übertragen. Die Kultivierung von *T7* wurde aufgrund der langen Wachstumszeit nicht in den Labormaßstab vergrößert.

Das scale-up ist unter kommerziellen Gesichtspunkten bedeutend, da eine Produktion der Enzympräparate im Kolbenmaßstab bei den in der Praxis benötigten Mengen wirtschaftlich nicht durchführbar wäre. Für die Versuche der Projektpartner wurden deshalb auch überwiegend im Labormaßstab hergestellte Präparatmuster zur Verfügung gestellt. Wesentlich für die Arbeiten im Rahmen des scale-up war die Charakterisierung verschiedener Fermentationssysteme.

Generell werden bei der Feststofffermentation Oberflächenverfahren und Verfahren unterschieden, bei denen das Kultursubstrat ein dreidimensionales Substratbett bildet. Für die Übertragung des Verfahrens zur Herstellung der Enzympräparate in den Labormaßstab wurden zwei Oberflächenverfahren (O1, O2) sowie vier Verfahren mit dreidimensionalem Substratbett (D1-D4) untersucht. In den beiden Oberflächenverfahren konnten gute Resultate erzielt werden und entsprechendes Material aus diesen Ansätzen wurde dem IZMB und dem IPE für deren Arbeiten zur Verfügung gestellt. Generell lagen die ermittelten Verzuckerungsleistungen etwa um den Faktor 2 unterhalb derjenigen, die in Kolbenkulturen erreicht werden konnten. Eine direkte Übertragung der Verhältnisse vom Kolben- in den Labormaßstab war folglich nicht möglich. Schon bei den Kolbenversuchen war aufgefallen, dass eine Abhängigkeit des Prozessverlaufs und der Produktqualität von der Kolbengröße besteht.

Die in den dreidimensionalen Verfahren erreichten Produktqualitäten wiederum lagen unterhalb derjenigen, die in der Oberflächenfermentation erzielten wurden.

Das scale-up des Herstellungsverfahrens für die Enzympräparate in den Labormaßstab wurde von Computersimulationen auf der Basis zweier mathematischer Modelle begleitet, deren Ergebnisse im folgenden ebenfalls dargestellt werden

## Oberflächenverfahren 01: Röhrenfermenter

Für das erste der beiden untersuchten Oberflächenverfahren wurden röhrenförmige Bioreaktoren aus PE-Kunststoff eingesetzt. Die Röhren hatten einen Durchmesser von 15 cm, eine Dicke von 3 mm und variable Längen. Zur Inokulation wurde eine vorab hergestellte Sporensuspension mit dem Rohsubstrat vermischt und mit Leitungswasser (die Verwendung von Leitungswasser anstelle von VE-Wasser hatte keinen negativen Effekt auf die Produktqualität) auf den gewünschten Feuchtegehalt eingestellt. Das Material wurde anschließend in den Röhren in flacher Schicht verteilt und die Röhren auf beiden Seiten mit einem Deckel (mit einem dünnem Silikonschlauchstück zur Be- und Entlüftung) versehen. Die Bioreaktoren wurden dann auf einer Unterlage mehrere Tage in einem temperierten Raum bei Raumtemperatur bzw. bei 30°C gelagert und aktiv (mit Druckluft) über ein Rotameter belüftet. Die Fermentationen erfolgten unsteril.

Die Einstellung der relevanten Prozessparameter (Temperatur, Feuchte, Sauerstoffgehalt) war in diesem einfachen Fermentationssystem schwierig durchführbar. Entsprechend variierten die Parameterwerte und auch die Ergebnisse in Parallelansätzen erheblich. Für die Qualitätsberurteilung (Verzuckerungsleistung) wurde deshalb eine Mischung der Fermentationsprodukte aus jeweils 5 parallelen Ansätzen verwendet. Folgende Prozessparameter wurden untersucht: Umgebungstemperatur, Anfangsfeuchte, Länge der Röhren, Prozessdauer, Menge des Inokulums, Schichthöhe und Belüftungsrate.

Die Parameter Temperatur und Feuchte variierten erwartungsgemäß über die Zeit. Abbildung 1 zeigt die Substrattemperatur in Abhängigkeit von der Fermentationszeit als Mittelwert aus jeweils 5 Parallelansätzen bei der Herstellung des Präparats E1 über insgesamt 6 Fermentationstage. Die Temperatur wurde mit einem gewöhnlichen Thermometer gemessen. Um den Fermentationsprozess so wenig wie möglich zu stören, wurde nur eine Messung pro Tag durchgeführt.

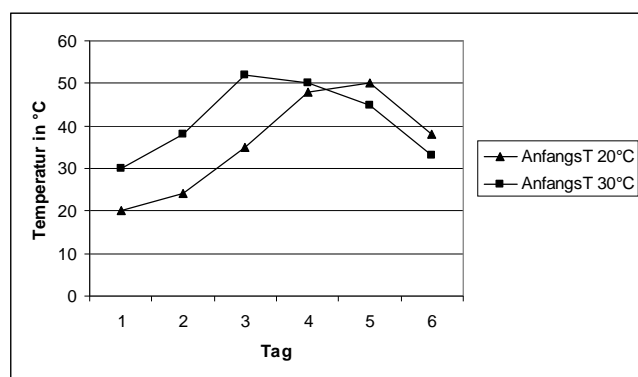


Abb. 1: Temperaturverlauf im Röhrenbioreaktor

Bei einer Umgebungstemperatur von 20°C (Raumtemperatur) stieg die Substrattemperatur innerhalb von 5 Tagen auf 50°C an und sank dann am 6. Tag wieder ab. Bei einer Umgebungstemperatur von 30 °C erfolgte der Temperaturanstieg deutlich schneller (innerhalb von 2 Tagen) auf etwas über 50°C. Anschließend sank die Temperatur auch hier langsam wieder ab. Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die Temperatur zeigte die Materialfeuchte (siehe Abbildung 2). Sie wurde durch Probenahme und anschließendes Trocknen der Proben im Trockenschrank (100°C, 24 h) bestimmt.