

**Wertschöpfung aus Nachwachsenden Rohstoffen:
Untersuchungen zur Wirkung optimierter Enzympräparate auf die
Effizienz der Enzymproduktion**

- Teilvorhaben 2: Gärversuche -

FKZ 22017103

Schlussbericht

INRES-Pflanzenernährung, Universität Bonn

Dr. Sebastian Wulf & Dr. Joachim Clemens

Wertschöpfung aus Nachwachsenden Rohstoffen: Untersuchungen zur Wirkung optimierter Enzympräparate auf die Effizienz der Enzymproduktion

- Teilvorhaben 2: Gärversuche -

I. Einführung

I.1. Aufgabenstellung

Ziel dieses Verbundvorhabens war die Optimierung und Evaluierung neuartiger, hydrolytisch wirksamer Enzympräparate zur Beschleunigung des Biogasprozesses und zur Verbesserung der wirtschaftlichen Betriebsführung landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Schwerpunkt war hierbei die Wirkung der Enzyme bei der Vergärung von Maissilage, Grassilage und Grünroggen-Ganzpflanzensilage.

Das Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES), Abteilung Pflanzenernährung (vormals: Institut für Pflanzenernährung) der Universität Bonn untersuchte hierbei die Wirksamkeit der durch die Kooperationspartner entwickelten Enzymmischungen. Diese Versuche wurden mit ausgewählten Kosubstraten in Batch-Versuchen und quasi-kontinuierlichen Gärversuchen durchgeführt, welche die Abläufe auf Biogasanlagen simulieren sollten.

I.2. Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

Das Institut für Pflanzenernährung (IPE, jetzt: INRES-Pflanzenernährung) beschäftigt sich bereits seit längerem mit der Verwertung organischer Rückstände in der Landwirtschaft. Hierzu gehören Versuche zur Verwendung von Kofermentationsrückständen in der Landwirtschaft sowie Studien zur Vergärung von Nachwachsenden Rohstoffen und der Prozessstabilität in Biogasanlagen.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Vorhaben wurde im Wesentlichen dem im Antrag formulierten Ablauf gefolgt. Zur Absicherung der Ergebnisse der Batchversuche wurde jedoch ein ergänzender Versuch nur mit Maissilage durchgeführt. Bei Bau und Durchführung der semikontinuierlich durchzuführenden Gärtests kam es zu unvorhergesehenen Verzögerungen, die eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung bis zum 31.08.2006 notwendig machten.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Siehe hierzu den Bericht des Projektkoordinators HöFer Bioreact GmbH

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Verbundprojektes arbeitete das Institut für Pflanzenernährung (IPE) mit den Partnern Bioreact GmbH (Troisdorf, Projektkoordinator) und dem Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik (IZMB) der Universität Bonn zusammen. Die Bioreact GmbH arbeitete im Rahmen des Fördervorhabens an der Optimierung der Enzympräparate und der Weiterentwicklung des oben skizzierten Verfahrens zu ihrer Herstellung durch Feststofffermentation und stellte den Projektpartnern Präparatemuster für deren Untersuchungen zur Verfügung. Umgekehrt wurden Analyseresultate und Zwischenergebnisse der Untersuchungen des IPE und IZMB der Bioreact GmbH für deren weitere Versuchsplanung zur Verfügung gestellt. Das IPE führte im Rahmen des Verbundvorhabens eine Validierung der Enzympräparate mit Hilfe von Gärtests durch.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Versuche zum Einsatz von Enzympräparaten in Batchansätzen

II.1.1. Material und Methoden

In Kleinreaktoren (5 Liter) wurden Enzympräparate, die vom IZMB als geeignet eingestuft wurden auf ihre Wirkung im batchversuch in Anlehnung an VDI-Richtlinie 4630 untersucht. Hierzu wurden jeweils ca. 50 g oTS Maissilage (MS), Grünroggen Ganzpflanzensilage (GPS) und Grassilage (GS) in 5 Liter Glasbehälter eingewogen und mit 3 Litern Gärrückstand einer Biogasanlage angeimpft. Das Headspace der Fermenter wurde mit N₂ gespült, um möglichst rasch anaerobe Bedingungen im Fermenter zu garantieren. Die Temperierung der Gefäße auf 36°C erfolgte in einem Raum mit Temperatursteuerung. Das gebildete Gas wurde in Gassammelbeuteln erfasst, die während der ersten Woche täglich, im weiteren Versuchsverlauf mit abnehmender Gasbildung zweimal wöchentlich bzw. wöchentlich gewechselt wurden. Mit einer Gasuhr (Ritter Apparatebau, Bochum) wurde das Gasvolumen und einem Infrarot-Gasmessgerät (Ansyco, Karlsruhe) der CH₄ und CO₂-Gehalt des gebildeten Gases gemessen. Die Versuchsdauer betrug 25-35 Tage. Während dieses Zeitraums wurden die Fermenter täglich geschwenkt, um eine zu starke Schwimmdeckenbildung zu vermeiden, eine Verteilung der Enzyme zu ermöglichen und den Gasaustritt aus dem Gärsubstrat zu erleichtern.

Zusätzlich zu den Versuchsvarianten wurde in allen Versuche 3 Liter Impfmateriale ohne Kosubstrat untersucht. Die Gasbildung aus dieser Kontrollvariante diente zur Korrektur der Gaserträge aus den Versuchsvarianten. Für die Berechnung der Gasqualität wurden die ersten 5 Liter Gas nicht berücksichtigt, da angenommen wurde, dass sich beim Ansetzen des Versuches Luftsauerstoff in der Mischung aus Kosubstrat und Impfmateriale angereichert hatte, was zur verstärkten Bildung von CO₂ in der Anfangsphase der Versuche führte.

Die Zugabe der Enzyme erfolgte in lyophilisierter (gefriergetrocknet) Form und wurde so von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Es wurden jeweils aktive Enzyme mit inaktivierten Enzymen verglichen. Zur Inaktivierung wurden die Enzymmischungen für 30 min bei 120 °C und 1 bar autoklaviert. Die Versuche wurden in jeweils 4-facher Wiederholung angesetzt.

Es wurden 3 Versuche mit unterschiedlichen Strategien der Enzymzugabe durchgeführt. Die Zugabe der Enzyme erfolgte nach Absprache mit den Projektpartnern

- Versuch 1.1: Enzymzugabe 1 g / Fermenter jeweils zu Versuchsbeginn. Die Enzyme wurden unmittelbar beim Ansetzen mit dem Impfmateriail und dem Kosubstrat vermischt.
- Versuch 1.2: Enzymzugabe 0,5 g/ Fermenter täglich über die gesamte Versuchsdauer. Die Enzyme wurden in 10 ml Einwegspritzen eingewogen und in der Kühltruhe gelagert. Für die Zugabe der Enzyme wurden in die Spritzen zusätzlich 5 ml Wasser gefüllt und die Spritzen für 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Dies diente der Vorextraktion der Enzyme und sollte deren Verteilung und Wirksamkeit im Fermenter erhöhen. Der Inhalt der Spritzen wurde anschließend über einen Schlauch im Deckel in die Fermenter gespritzt. Das 2-fache Spülen der Spritzen mit jeweils 5 ml Wasser garantierte, dass alle Enzyme in die Fermenter gelangten.
- Versuch 1.3: Zusätzlich zur Zugabe von autoklavierten und aktiven Enzymen wurde hier eine Variante völlig ohne Enzymzugabe durchgeführt. Für diesen Versuch wurde nur mit Maissilage analog zu Versuch 1.2 verwendet.

II.1.2. Ergebnisse und Diskussion

Versuch 1.1

Die Gasbildung in den Gärversuche bei einmaligem Zudosieren von Enzymen verlief mit nur geringer lag-phase zu Versuchsbeginn (Abbildung 1). Ansonsten war der Abbau ungehemmt

und verlief in der für batch-Versuche typischen Weise. Die Messwiederholungen wiesen nur geringe Abweichungen auf. Lediglich bei einzelnen Fermentern unterschied sich die Gasbildung deutlich von den übrigen Wiederholungen (Abbildung 1.a), was auf Undichtigkeiten im Fermenter zurückgeführt wurde. Lagen diese Messungen mehr als das 3-fache der Standardabweichung über oder unter dem Mittelwert, so wurde dieser Wert für die Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt.

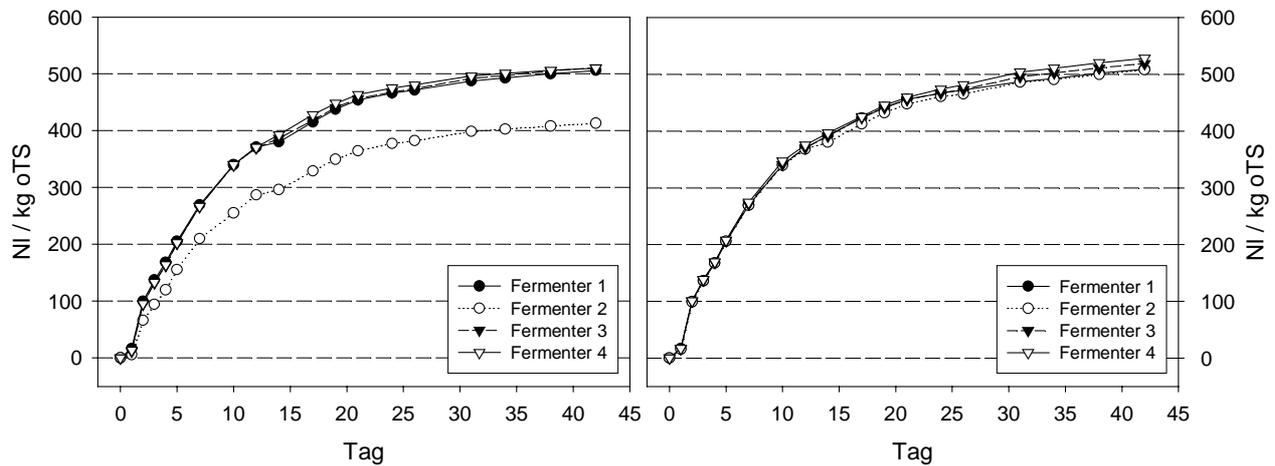


Abbildung 1: kumulativer Verlauf der Gasbildung in den einzelnen Fermentern nach einmaliger Zugabe von autoklavierten Enzymen (a.) und aktiven Enzymen (b.) zu Versuchsbeginn (n=4). Beispielhaft ist hier die Gasbildung mit Grassilage als Kosubstrat dargestellt.

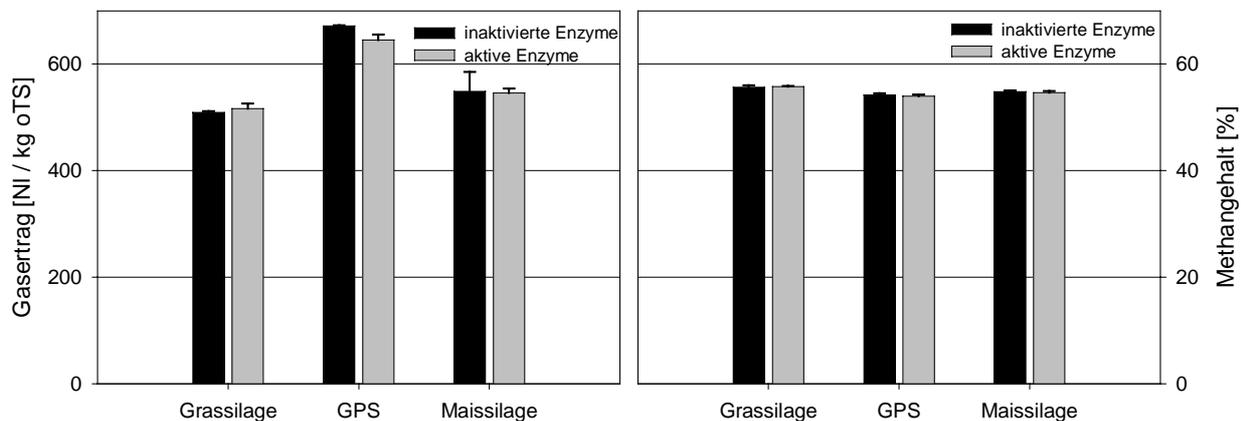
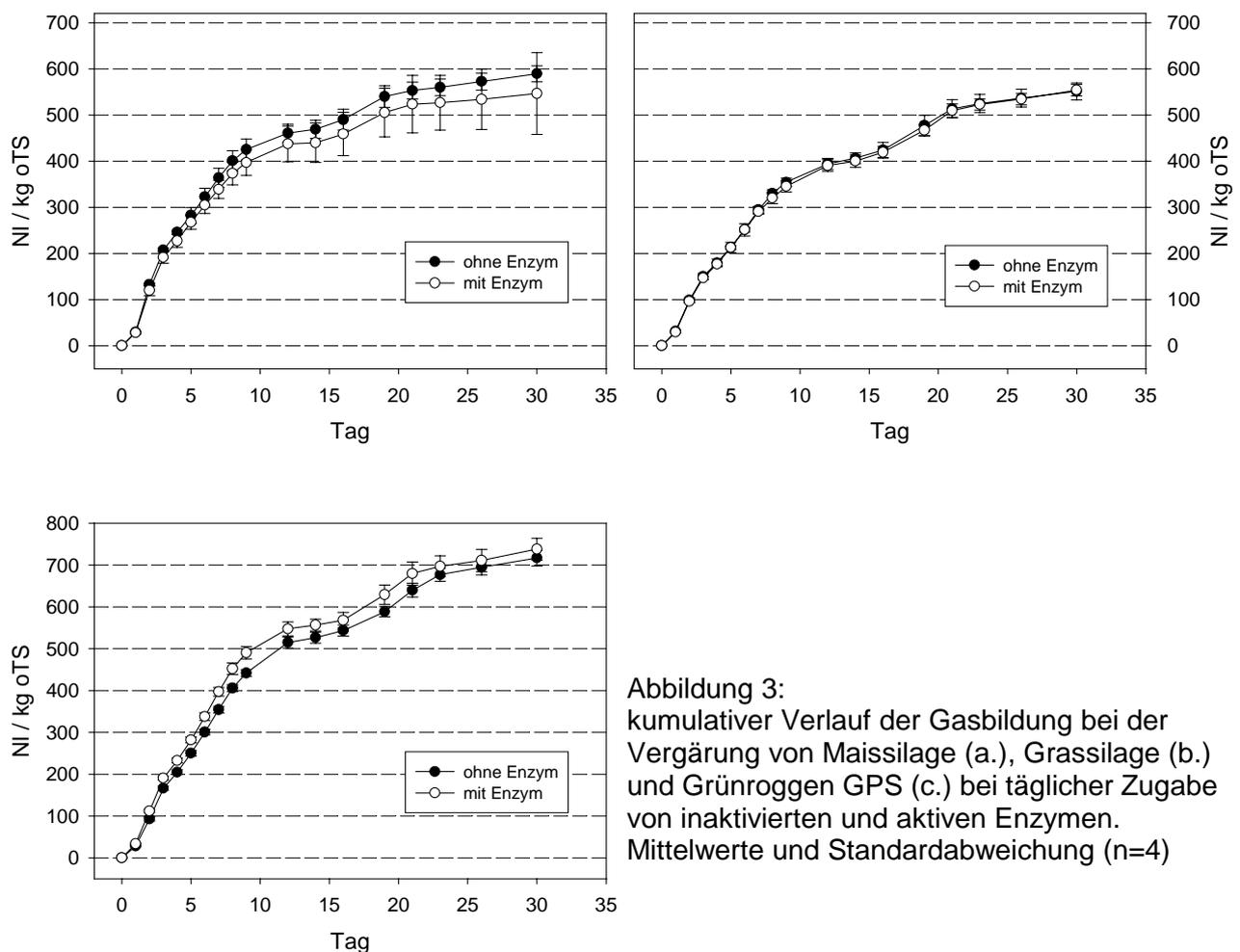


Abbildung 2: Gaserträge nach 42 Tagen Versuchsdauer (a.) und Gasqualität als Mittel über die Versuchsdauer (b.) für die verschiedenen Kosubstrate bei einmaliger Zugabe von inaktivierten und aktiven Enzymen. Mittelwerte und Standardabweichung (n=4).

Die Gaserträge lagen zwischen 546 und 738 NI/kg oTS und waren für Grünroggen-GPS am höchsten, gefolgt von Maissilage und Grassilage (Abbildung 2a). Die CH₄-Gehalte lagen bei etwa 52 % (Abbildung 2b). Weder die Gaserträge, noch die CH₄-Gehalte waren durch die einmalige Enzymzugabe zu Versuchsbeginn erhöht.

Mögliche Ursache für die fehlende Wirkung der Enzyme könnte eine frühzeitige Inaktivierung der Enzyme im Fermenter gewesen sein. Bei 38°C und den in Gülle vorhandenen NH_3 und Salzgehalten ist es möglich, dass die katalytische Wirkung der Enzyme rasch nachlässt (vgl. Bericht Teilprojekt IZMB). Daher wurden die Enzyme in einem weiteren Versuch (1.2) täglich zugegeben.

Versuch 1.2:



Auch der Versuch mit täglicher Zugabe der Enzyme verlief ohne längere lag-phase und ungehemmt. Zwischen dem 12. und 20. Tag des Versuches kam es zu einer leichten Verzögerung der Gasbildung in allen Varianten. Dies ist wahrscheinlich auf eine Vorrübergehende Störung in der Temperatursteuerung der Gärkammer zurückzuführen. Zwischen aktiven und inaktivierten Enzymen konnten keine Unterschiede in der Gesamtgasbildung nach 30 Tagen festgestellt werden. Auch der CH_4 -Gehalt des Biogases unterschied sich nicht zwischen den Varianten mit aktiven und inaktivierten Enzymen (Abbildung 4). Lediglich in der Variante mit Grünroggen-GPS ließ sich bis zum 10. Tag des Versuches eine etwa 10%ige Steigerung des Gasertrags nachweisen ($p < 0,05$) (Abbildung 3 c). Im weiteren Verlauf des Versuches glichen sich die Gasausbeuten mit

Zugabe von aktiven und inaktivierten Enzymen jedoch wieder an. Ursache hierfür könnte sein, dass ein verstärkter Abbau durch die Zugabe von Enzymen sich nur am Anfang des Versuches auswirkt, wenn größere Mengen Substrat zur Hydrolyse bereitstehen. Mit zunehmender Verweilzeit im Fermenter reichen auch die bereits im Impfmateriale selbst vorhandenen Enzyme aus, um einen optimalen Umsatz des Substrates zu ermöglichen.

Für Grassilage und Maissilage war diese vorübergehende Erhöhung der Gasausbeute nicht zu beobachten (Abb. 3a/b). Als möglicher Grund hierfür wurde eine mangelnde Inaktivierung in der Kontrollvariante oder die Beschaffenheit des Impfmateriale in Betracht gezogen. Das Impfmateriale für die Versuche stammte aus dem Gärrückstandsbehälter einer Biogasanlage, die bereits Enzyme einsetzt. Aus Erfahrungen des IZMB war davon ausgegangen worden, dass eine Restenzymaktivität nicht mehr vorhanden war. Um einen Einfluss des Impfmateriale auf den Versuchsverlauf auszuschließen, wurde daher für die nächste Versuchsreihe (1.3) Impfmateriale einer enzymfreien Biogasanlage verwendet. Das Enzymmateriale wurde am IZMB auf seine Aktivität getestet. Die Aktivität der eingesetzten aktiven Enzyme war durch die Lagerung bis zum Versuchseinsatz nicht beeinträchtigt und die Inaktivierung war effektiv. Trotzdem wurde im nächsten Versuch zusätzlich eine Variante ganz ohne Zugabe von Enzymen (werde aktiv noch inaktiv) getestet.

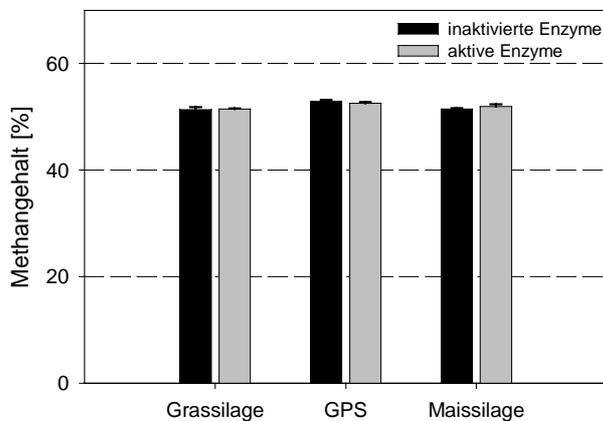


Abbildung 4:
Methanengehalt des gebildeten Biogases als Mittel über die gesamte Versuchsdauer bei der Vergärung von Grassilage, Grünroggen-GPS und Maissilage bei täglicher Dosierung von inaktivierten und aktiven Enzymen. Mittelwerte und Standardabweichung (n=4).

Versuch 1.3:

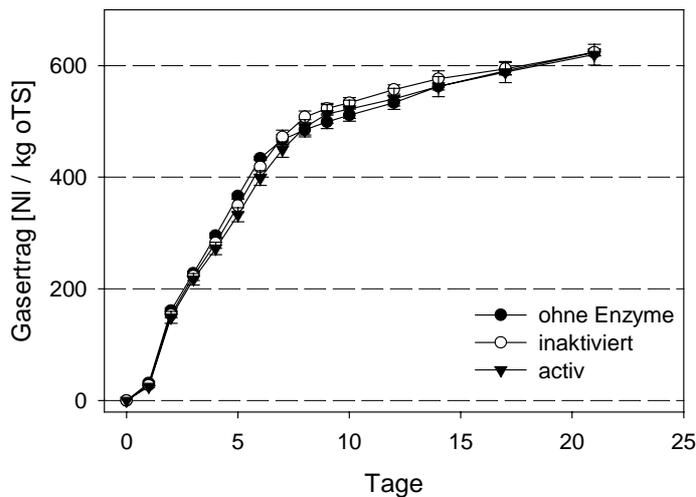


Abbildung 5:
kumulativer Verlauf der Gasbildung bei der Vergärung von Maissilage mit täglicher Zugabe von inaktivierten, aktiven Enzymen und ohne Zugabe. Mittelwerte und Standardabweichung

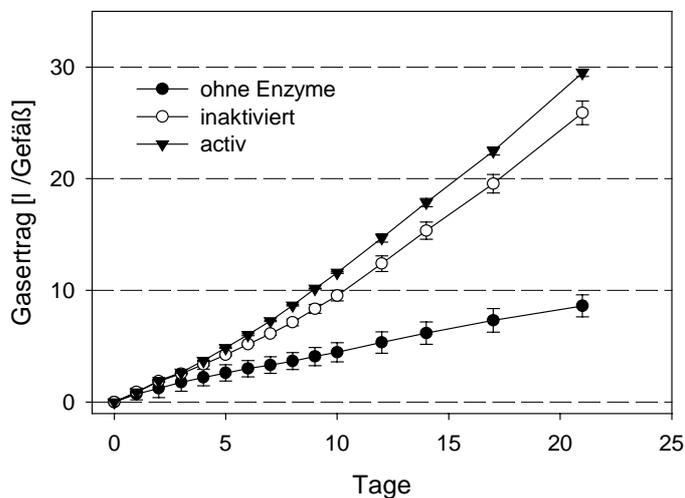


Abbildung 6:
kumulativer Verlauf der Gasbildung je Gefäß in den Kontrollvarianten bei täglicher Zugabe von inaktivierten, aktiven Enzymen und ohne Zugabe. Mittelwerte und Standardabweichung (n=3)

Der Versuch wurde mit täglicher Zugabe von aktiven und inaktivierten Enzymen bzw. ohne jegliche Zugabe nur mit Maissilage durchgeführt. Der Versuch lief über 21 Tage, da aufgrund der Ergebnisse aus dem Versuch 1.2 davon ausgegangen wurde, dass bis zu diesem Zeitpunkt ein Effekt deutlich werden müsste (Abb. 5). Eine Wirkung der Enzyme war jedoch auch hier nicht zu beobachten. Die Gasbildung war ungehemmt, für alle Varianten aber gleich. Nur die Gasbildung der Kontrollvarianten in denen Impfmateriale ohne Maissilage vergoren wurde, zeigte einen Effekt der Enzymzugabe (Abb. 6). Dies ist auf die Zufuhr von organischer Substanz mit den Enzymmischungen zurückzuführen. Hierdurch war die Gasbildung in den Varianten mit Zugabe von aktiven und inaktivierten Enzymen deutlich höher, als in der Kontrollvariante ohne jegliche Zugabe von Enzymen, deren geringe Gasbildung alleine auf den Abbau der noch unvergorenen oTS in dem als Impfmateriale verwendeten Gärrückstand zurückzuführen ist. Der geringere Gasertrag in der Variante mit inaktivierten Enzymen beruhte wahrscheinlich auf dem geringfügig höheren Wassergehalt der inaktivierten Enzyme, der auf das Autoklavieren in Wasserdampf zurückzuführen ist. Es wurden gleiche Mengen der Enzymmischungen zugeführt und somit etwas geringere

Mengen an oTS mit den inaktiven Enzymen. Auf die in Abbildung 5 dargestellten Gaserträge aus der Maissilage wirkte sich der zusätzliche Gasertrag aus der organischen Substanz der Enzyme nicht aus, da die Gaserträge der Versuchsvarianten um die Gaserträge der jeweiligen Kontrollen korrigiert wurden.

II.1.3. Schlussfolgerungen

In den Batch-Versuchen konnte keine Wirkung der Enzyme nachgewiesen werden. Lediglich bei der Vergärung von Grünroggen-GPS konnte bei täglicher Zugabe von Enzymen eine vorübergehende Erhöhung der Gasausbeuten beobachtet werden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Wirkung durch das Impfmateriale oder eine mangelnde Inaktivierung der Enzyme in der Kontrollvariante verursacht wurde.

Allerdings sind Batchversuche nur eingeschränkt auf Biogasanlagen übertragbar, da diese in der Regel im Durchflussverfahren mit voll durchmischten Fermentern betrieben werden. Dies bedeutet, dass sie kontinuierlich, oder zumindest mehrmals täglich mit Substraten beschickt und regelmäßig gerührt werden. Es ist denkbar, dass diese Bedingungen für einen gleichmäßigen und somit effektiven Enzym – Substrat Kontakt notwendig sind.

II.2. Kontinuierliche Versuche

II.2.1. Material und Allgemeine Methoden

Versuchsaufbau

Um die Bedingungen von Biogasanlagen möglichst gut simulieren zu können wurde eine Versuchsanlage mit 12 voll durchmischten Fermentern aus Acrylglas mit einem Volumen von 10 Litern (ATB, Potsdam) in Betrieb genommen. Jeweils drei der doppelwandigen Fermenter wurden zur Temperierung über einen Wasserkreislauf mit einem Heizbad verbunden (Abb. 7). Um Wärmeverluste zu vermeiden und die Lichteinwirkung zu vermindern wurden die Fermenter mit Schaumstoffmatten von außen isoliert. (Abb. 8). Da Wärmeverluste nicht vollständig zu vermeiden waren, wurde in einem Vorversuch die Temperatur im Wasserbad bestimmt, die notwendig war, um die Fermenter konstant bei 38°C zu halten. Um dies zu erreichen musste die Soll-Temperatur des Wasserbades auf 40°C eingestellt werden.

Zur Durchmischung der Fermenter dienten Kreuzbalkenrührer, die jeweils über einen Rührwerksmotor (RW 20, IKA Labortechnik, Staufen bzw. RZR 2020, Heidolph, Schwabach) mit etwa 50 Umdrehungen pro Minute angetrieben wurden. Über eine programmierbare Steuerung wurden die Rührwerke alle 10 Minuten für 30 Sekunden geschaltet.

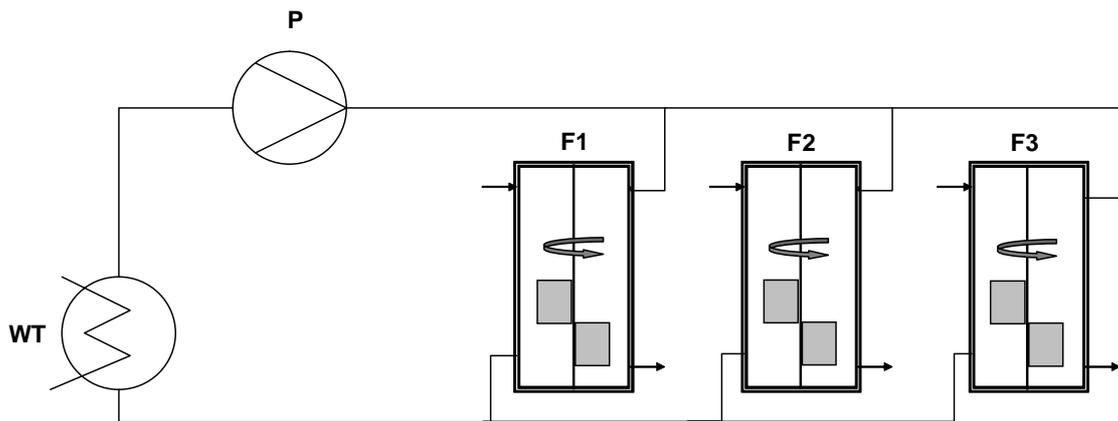


Abbildung 7: Aufbau der Anlage: Mit Hilfe eines Wasserbades wurden jeweils 3 doppelwandige Fermenter auf einer Temperatur von 38°C gehalten. Ein Kreuzbalkenrührer diente der Zerstörung der Schwimm- bzw. Sinkschicht sowie der optimalen Durchmischung der Fermenter.

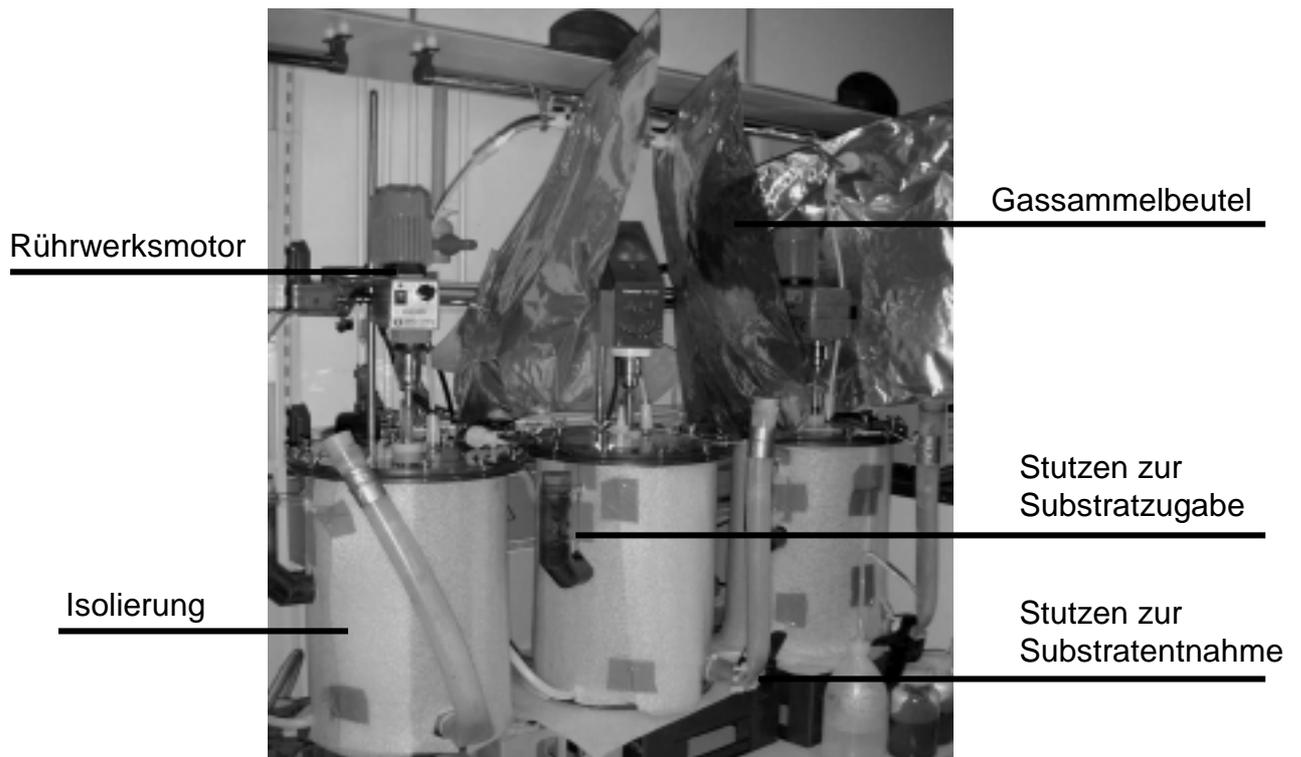


Abbildung 8: Drei der zwölf quasi-kontinuierlich betriebenen Fermenter während des Versuchs.

Substratzugabe und -entnahme

Zu Beginn des jeweiligen Versuchs wurden die Fermenter zunächst mit 8 Litern eines frischen Gärrückstandes einer mit Nachwachsenden Rohstoffen und Rindergülle betriebene Biogasanlage befüllt. Nach 2 Tagen wurde dann mit der Zugabe und Entnahme von Substraten begonnen. Den Fermentern wurden zunächst täglich 320 ml Fermenterinhalt entnommen. Dies entsprach einem 25ten Teil des Fermenterinhalt von 8 Litern und somit einer hydraulischen Verweilzeit des Substrates im Fermenter von 25 Tage. Der entnommene Gärrückstand wurde zu ausgewählten Probenahmeterminen für weiterführende Untersuchungen verwendet. Die Zugabe von Kosubstraten und weiterem Impfmateriale erfolgte täglich über einen seitlichen Stutzen. Hierbei wurde als erstes das Kosubstrat in den entsprechenden Mengen zugeführt und mit einem flexiblen Schlauch bis in den Fermenter geschoben. Dann wurden die aktiven bzw. inaktiven Enzymen zugegeben und mit einem Grundsubstrat, zunächst mit dem Gärrückstand einer mit NawaRo betriebenen Biogasanlage, nachgespült. Es wurde Gärrückstand verwendet, damit die abbaubare organische Substanz möglichst nur aus den zugeführten Kosubstraten stammte. Die Menge des zugegebenen Grundsubstrates wurde so gewählt, dass die Summe aus Grundsubstrat und Kosubstrat der zuvor entnommenen Menge an Fermenterinhalt entsprach. Wöchentlich wurde kontrolliert, ob der Füllstand im Fermenter dem Soll von 8 Litern entsprach. War dies nicht der Fall, wurde dieser mit Grundsubstrat bis zur Soll-Marke aufgefüllt.

Zum Anfahren der Fermenter wurde zunächst $1 \text{ g oTS}/(\text{Liter Fermentervolumen} \times \text{Tag})$ als Maissilage, Grünroggen-GPS bzw. Grassilage zugeführt. Innerhalb von 3 Wochen erfolgte dann die Erhöhung auf die für den Versuchsbeginn notwendige Startbelastung.

Gas- und Substratmessungen

Das gebildete Gas wurde in Gassammelbeuteln (Tecobag; Tesseraux Spezialverpackungen, Bürstadt) aufgefangen und täglich auf Gasvolumen und Gasqualität analog zu den in Abschnitt II.1.1 beschriebenen Methoden bestimmt. Als Substratparameter wurde von ausgewählten Proben der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) analog zu DIN 38409 mit Küvettentests (Fa. Merck, Darmstadt) unter Verwendung eines Thermoreaktors (CR 3000; WTW, Weilheim) und eines Küvettenphotometers (PhotoLab S12; WTW, Weilheim) gemessen.

II.2.2. Versuch zur Erhöhung der Enzymdosierung

Material und Methoden

Für diesen Versuch wurde die Faulraumbelastung für die drei Kosubstrate (Tabelle 1) auf zunächst auf 2 g oTS/lid eingestellt und am 18. Tag nach Versuchsbeginn auf 2,5 g oTS/ lid erhöht. Die höhere Faulraumbelastung führte jedoch in den Fermentern mit Grassilage und Grünroggen-GPS zu massiven Schwierigkeiten beim Durchmischen der Fermenter und Ausfällen der Rührwerke, so dass die Zufuhr von Kosubstraten in diesen Varianten für 6 Tage eingestellt werden musste. Anschließend wurden wieder 2 g oTS/lid zugegeben. Die Belastung von 2,5 g oTS/lid für die Maissilage konnte beibehalten werden.

Die Zugabe von inaktivierten und aktiven Enzymen wurde nach einer Einfahrzeit von 30 Tagen begonnen. Die anfängliche Dosierung betrug 2,5 mg oTS Enzym / g oTS Kosubstrat und wurde schrittweise erhöht (Tabelle 2). Die Enzyme wurden täglich zusammen mit den Kosubstraten wie in Abschnitt II.2.1 beschrieben zugeführt.

Tabelle 1: Trockensubstanz- und Aschegehalt, sowie der daraus berechnete Gehalt an organischer Trockensubstanz an der Frischmasse der verwendeten Kosubstrate

	TS [%]	Aschegehalt [%]	oTS/FS [%]
Maissilage	37,1	3,6	35,8
Grünroggen-GPS	20,0	7,0	18,6
Grassilage	19,2	28,8	13,7

Tabelle 2: Zusammenfassung der Versuchsparmeter:

Dosierung Kosubstrat:

Maissilage	2,5 g oTS / Liter Tag
Grünroggen	2 g oTS / Liter Tag
Grassilage	2 g oTS / Liter Tag

Verweilzeit: 25 Tage
Grundsubstrat: vergorene Gülle

Enzymzugabe:

ab Tag	30	53	72	85	100	116
mg Enzym / g oTS	2,5	5	10	20	40	60 *

* statt gefriergetrockneten Enzyme wurden ab Tag 116 frische Enzymmischungen verwendet mit etwa 50% oTS. Die Angabe bezieht sich auf zugegebene oTS.

Ergebnisse und Diskussion

In allen Varianten wurden innerhalb kurzer Zeit stabile Gaserträge erreicht, so dass nach 30 Tagen mit der Dosierung der Enzyme und dem eigentlichen Versuch begonnen werden konnte. In Abbildung 2.1, 2.2 und 2.3 sind die Verläufe der Gaserträge über den gesamten Versuchszeitraum für die verschiedenen Varianten dargestellt. Es kann festgestellt werden, dass die Gaserträge über den gesamten Versuchszeitraum nahezu stabil blieben. Die leichten Schwankungen der Gaserträge sind durch den Versuchsaufbau bedingt. Da die Substratzufuhr und Gasmessung der Fermenter nicht automatisiert war, konnte diese nur einmal täglich und nicht immer genau zum selben Zeitpunkt erfolgen. Daraus ergeben sich unter Umständen Schwankungen in der Gasbildung, die durch mathematische Korrekturen nicht vollständig zu eliminieren sind. Einzelne größere Ausreißer in der Gasbildung sind auf den vorübergehenden Stillstand von Rührwerken zurückzuführen. Insbesondere bei der Vergärung der Grünroggen-Ganzpflanzensilage kam es häufig zu Schwimmdeckenbildungen, die eine Durchmischung des Substrates schwierig machten. Bei Vergärung der Grassilage musste wegen Problemen bei der Durchmischung der Fermenter und zu starker Anreicherung an Trockensubstanz die Zugabe von Substrat von Tag 117 bis Tag 120 vollständig eingestellt werden. Dies führte zu dem in Abbildung 2.3 erkennbaren Einbruch der Gaserträge.

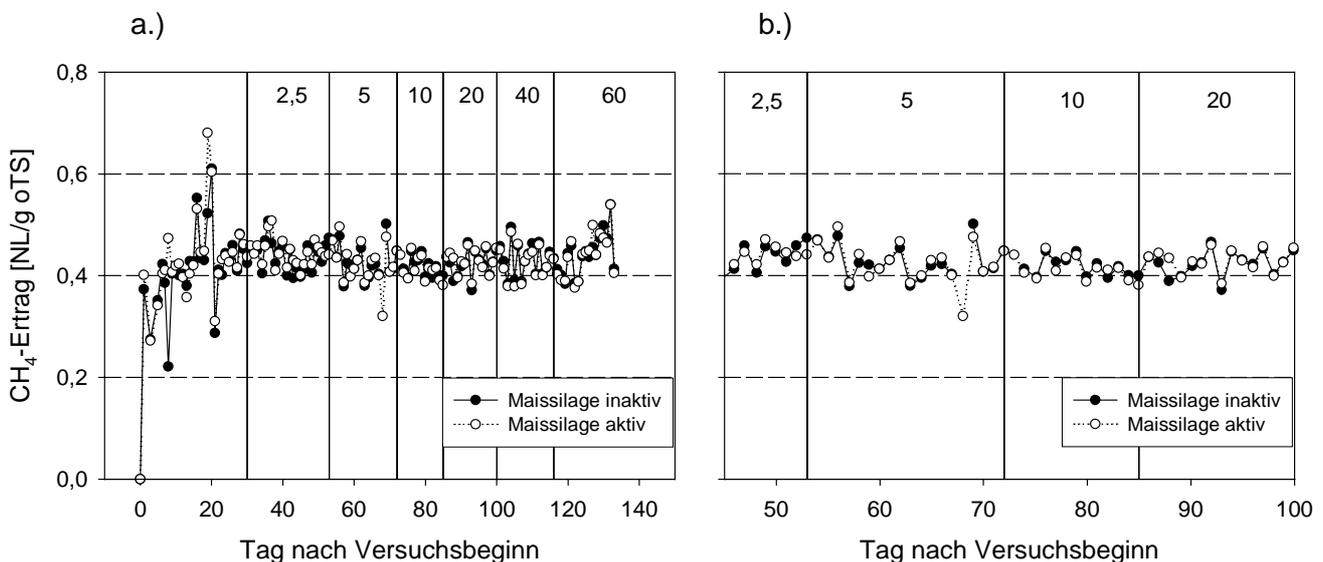


Abbildung 9: Verlauf des CH_4 -Ertrags aus **Maissilage** in Normlitern je g oTS über den Versuchszeitraum. a.) gesamter Zeitraum, b.) Tag 50 – 100. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern je Variante. Senkrechte Linien kennzeichnen Stufen der Enzymdosierung in mg Enzym je g oTS Kosubstrat. .

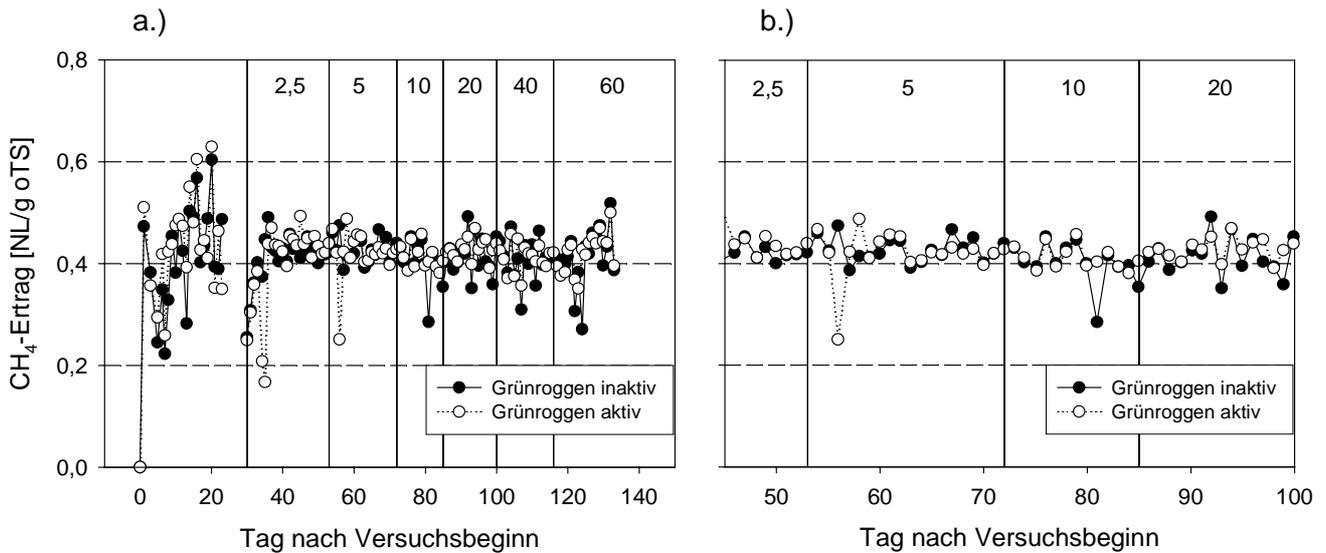


Abbildung 10: Verlauf des CH₄-Ertrags aus **Grünroggen-Ganzpflanzensilage** in Normlitern je g oTS über den Versuchszeitraum. a.) gesamter Zeitraum, b.) Tag 50 – 100. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern je Variante. Senkrechte Linien kennzeichnen Stufen der Enzymdosierung in mg Enzym je g oTS Kosubstrat. .

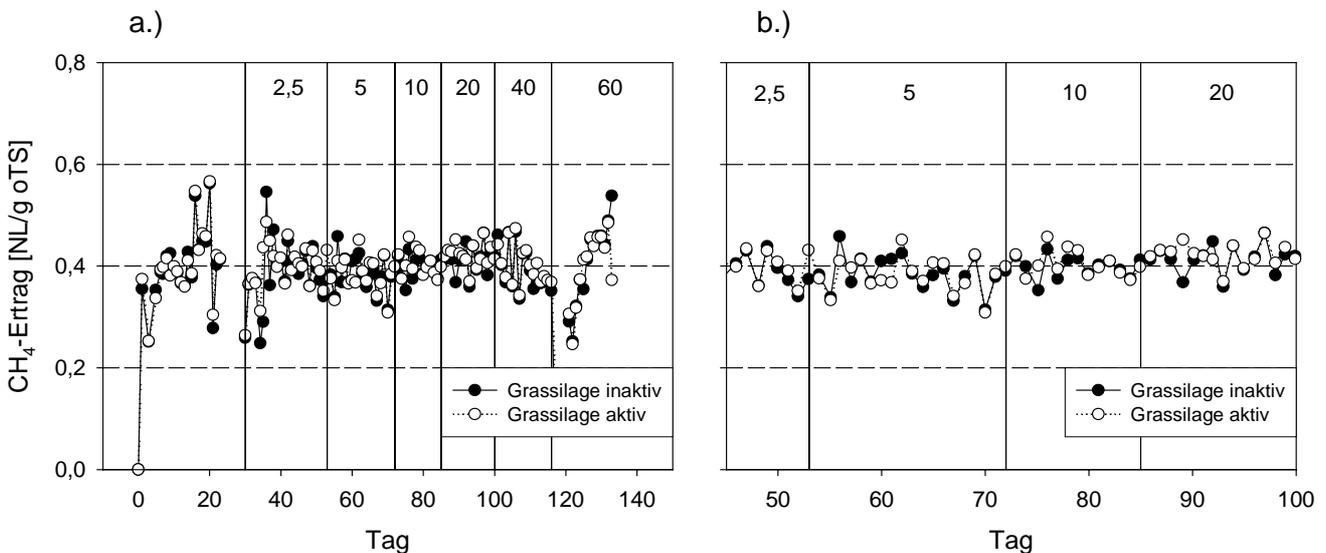


Abbildung 11: Verlauf des CH₄-Ertrags aus **Grassilage** in Normlitern je g oTS über den Versuchszeitraum. a.) gesamter Zeitraum, b.) Tag 50 – 100. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern je Variante. Senkrechte Linien kennzeichnen Stufen der Enzymdosierung in mg Enzym je g oTS Kosubstrat. .

Eine Wirkung der Enzyme auf die Gaserträge war nicht festzustellen. Abbildung 2.1b, 2.2b und 2.3b zeigen den Verlauf der CH₄-Erträge zwischen Tag 50 und 100. Die Mittelwerte der CH₄-Erträge über diesen Zeitraum sind in Abbildung 12 für die jeweils parallel betriebenen Fermenter einer Variante getrennt dargestellt. Es wird deutlich, dass signifikante

Unterschiede zwischen Varianten mit aktivem und inaktivem Enzym weder im CH₄-Ertrag noch im CH₄-Gehalt des Biogases vorlagen. Unterschiede lagen nur zwischen den einzelnen Kosubstraten vor. Hier lagen die CH₄-Erträge bei Grassilage als Kosubstrat mit 0,40 NI / g oTS signifikant unter den Erträgen von Maissilage und Grünroggen-GPS mit jeweils 0,42 NI / g oTS. Die CH₄-Gehalte im Biogas unterschieden sich auch signifikant und waren bei Grassilage mit im Mittel 59,2 % am höchsten, gefolgt von Grünroggen-GPS mit 56,3 %, während bei Vergärung von Maissilage mit 52,9 % die geringsten CH₄-Gehalte im Biogas gemessen wurden.

Auch die Erhöhung der Dosierung auf bis zu 60 mg oTS Enzym / g oTS Kosubstrat hatte keine erkennbare Wirkung auf die CH₄-Erträge (vgl. Abbildung 9, 10, 11).

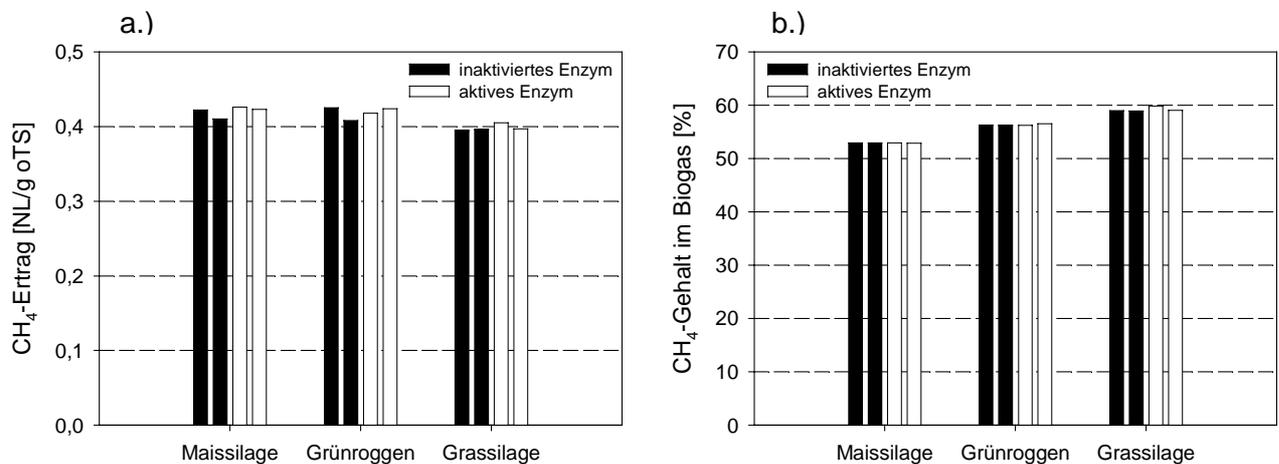


Abbildung 12: Mittelwerte des CH₄-Ertrags (a.) und des CH₄-Gehaltes im Biogas (b.) zwischen Tag 50 und Tag 100 für die einzelnen Fermenter

II.2.3. Versuch zur Erhöhung der Raumbelastung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Enzymwirkung von der Faulraumbelastung abhängt. Hier sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass in den bisherigen Untersuchungen keine Enzymwirkung nachgewiesen werden konnte, da optimalen Gärbedingungen vorlagen, in denen die Hydrolyse nicht, oder nur geringfügig limitierend für den Gärprozess war.

Material und Methoden

Versuchsdurchführung

Dieser Versuch wurde analog zu dem in Abschnitt 2.2 beschriebenen Versuch mit Maissilage, Grünroggen und Grassilage in jeweils 2-facher Wiederholung durchgeführt. Jedoch wurde hier nun nicht bei gleichbleibender Faulraumbelastung die Enzymdosierung erhöht, sondern die Faulraumbelastung schrittweise erhöht und gleichzeitig ein hohes Enzym- / Substrat-Verhältnis aufrechterhalten. Die anfängliche Faulraumbelastung betrug $1 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und wurde schrittweise, jeweils nach Einstellung stabiler Gärbedingungen erhöht (Tabelle 3). Die Enzymdosierung wurde entsprechend erhöht, so dass das Enzym-Substrat-Verhältnis immer $120 \text{ mg g}^{-1} \text{ oTS}$ betrug.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Versuchsparameter

Dosierung Kosubstrat								
	ab Tag	1	29	50	70	100	105	114
g oTS/Liter Mais		1	2	3	4	5	5	6
Grünroggen		1	2	3	3	4	3	3
Grassilage		1	2	3	4	5	3	3

Dosierung Enzyme: 120 mg/g oTS

Verweilzeit: Tag 1-86 25 Tage
ab Tag 86 12 Tage

Grundsubstrat: Tag 1-86 vergorene Gülle
ab Tag 86 separierte Rohgülle

Die Erhöhung der Raumbelastung war nicht in allen Varianten gleichermaßen möglich. Höhere Raumbelastungen an Grünroggen-GPS und Grassilage führten zu Problemen beim Durchmischen der Fermenter. Die Rührwerke blockierten zum Teil und die Gärprodukte konnten nicht repräsentativ entnommen werden. Dies führte zu einer weiteren Anreicherung an Trockensubstanz im Fermenter. Daher war für Grünroggen nur eine Raumbelastung von $3 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ möglich und eine kurzfristige Erhöhung auf $4 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ musste wieder reduziert werden. Für Grassilage konnte kurzfristig bis auf $5 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden. Zusätzlich zu den in den vorangegangenen Versuchen bestimmten Parametern (Gasertrag; Gasqualität) wurden hier auch Titrationsen durchgeführt um die Stabilität des Gärprozesses in den verschiedenen Varianten und unterschiedlichen Belastungen beurteilen zu können.

Titration

Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es aufgrund der zum Teil sehr starke Viskosität und des hohen Trockensubstanzgehaltes der Proben notwendig, diese vor der Titration zu verdünnen (1:1 mit destilliertem Wasser) und zu zentrifugieren (10.000g, 20 Minuten, Beckman Zentrifuge). Die Verdünnung erniedrigt die Viskosität auf einen rühr- und titrierfähigen Zustand. Die Zentrifugation beseitigt störende Feststoffe und zeigt dabei einen nur sehr geringfügigen Einfluss auf den Puffereigenschaften.

Nach der Vorbehandlung wurden die Proben bei einer Dosierrate von 0,3ml/min mit 0,5M Schwefelsäure (H_2SO_4) titriert. Die Titrations werden mit Hilfe automatischer Titratoren durchgeführt (METROHM-Dosimat 665), eine Online-Erfassung der pH-Werte erfolgt mit der ACHAT-Software von WTW.

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der vergleichsweise unproblematischen Zugabe und Entnahme von Kosubstrat und Gärrückstand ist der Verlauf der Ertragskurve für **Maissilage** beispielhaft. Mit jeder Erhöhung der Dosierung erfolgte eine fast unmittelbare Zunahme des Gasertrags je Fermenter (Abbildung 13). Stabile Gaserträge stellten sich zumindest bei geringen Raumbelastungen innerhalb weniger Tage ein. Dies lässt auf einen raschen Abbau der organischen Substanz und einen ungestörten Gärverlauf schließen. Erst bei höheren Gaserträgen begannen die Gaserträge stärker zu schwanken. Jedoch war der Gärprozess selbst bei einer täglichen Raumbelastung von 6 g oTS l^{-1} stabil und zu keinem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Effekt der Enzymzugabe auf den CH_4 -Ertrag.

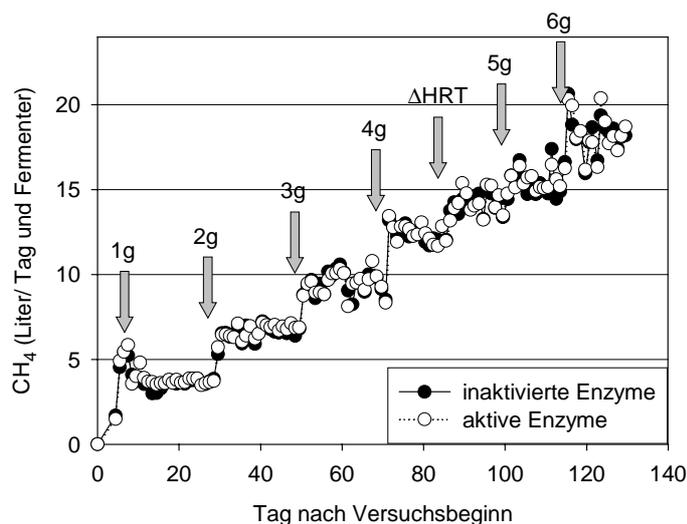


Abbildung 12: Verlauf des CH_4 -Ertrags aus **Maissilage** in Normlitern je Fermenter über den Versuchszeitraum. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern. Pfeile kennzeichnen Stufen der Substratdosierung und Änderung der hydraulischen Verweilzeit (HRT)

Werden die CH_4 -Erträge auf die eingesetzte Menge oTS bezogen, so wird deutlich, dass mit zunehmender Raumbelastung die CH_4 -Ausbeute je kg oTS abnimmt (Abbildung 14). Eine solche Abhängigkeit der Biogasausbeute von der Raumbelastung haben auch Mähnert und Linke (2005) festgestellt und daraus substratspezifische Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten berechnet.

Die vorübergehende Erhöhung der Gasausbeute in Abbildung 14 ist wahrscheinlich auf den Wechsel des Grundsubstrates von vergorener Gülle zu einer unvergorenen Gülle zurückzuführen, der gleichzeitig mit der Verkürzung der Verweilzeit auf 12 Tage stattfand. Die durch das Grundsubstrat zugeführte erhöhte Menge an oTS ist in der Berechnung der Gasausbeuten nicht berücksichtigt, so dass der zusätzliche Gasertrag nur scheinbar zu einer Erhöhung der Gasausbeute führte.

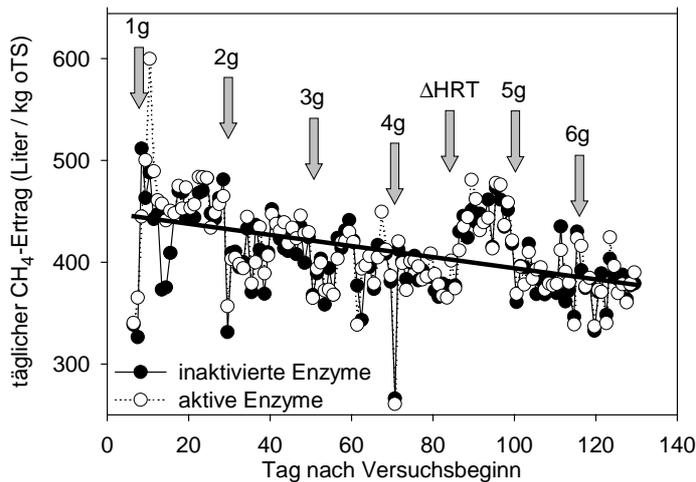


Abbildung 14:
 CH_4 -Ertrag je eingesetzte Menge Substrat in Normlitern je Fermenter über den Versuchszeitraum. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern. Pfeile kennzeichnen Stufen der Substratdosierung und Änderung der hydraulischen Verweilzeit (HRT).

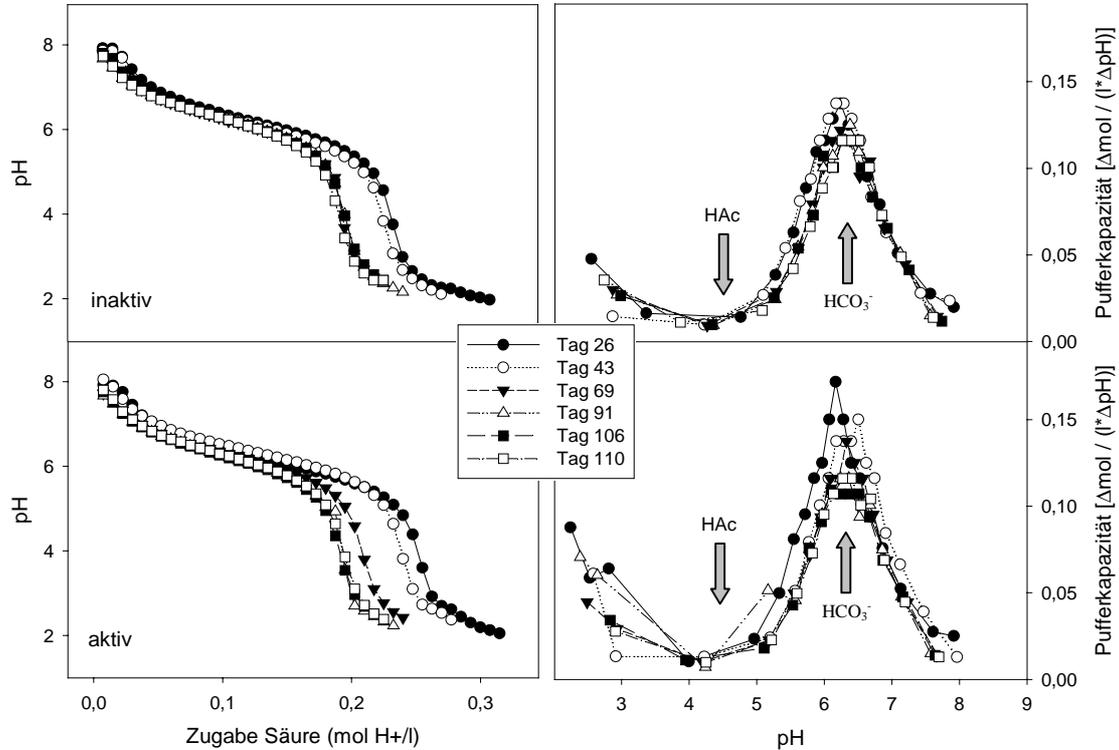


Abbildung 15: Titrationskurven und daraus berechnete Pufferkurven für Gärrückstände während der Vergärung von **Maissilage** mit inaktiven und aktiven Enzymen. Pfeile kennzeichnen den pKa des Hydrogencarbonats (HCO_3^-) und der Essigsäure (HAc) stellvertretend für die flüchtigen Fettsäuren.

Betrachtet man die Puffereigenschaften des Fermenterinhalt, so wird deutlich, dass über den gesamten Versuchszeitraum der Vergärungsprozess bei Einsatz von Maissilage sehr stabil war. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Belastung mit Fettsäuren festgestellt werden und selbst bei hohen Raumbelastungen (Tag 91 bis 110) nahm der Hydrogencarbonatpuffer nur geringfügig ab. Eine Gefahr der Versauerung des Fermenters und der Einschränkung der Biogasproduktion bestand jedoch nicht.

Bei der Vergärung von **Grünroggen-GPS** konnten nur die ersten beiden Belastungsstufen ohne Probleme durchgeführt werden (Abbildung 15). Nach Erhöhung der Raumbelastung auf $3 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ traten Probleme beim Rühren der Fermenter und der Entnahme der Gärrückstände auf. Dies führte zu einer vorübergehenden Abnahme der Gaserträge. Erst durch Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit auf 12 Tage und der damit verbundenen Abnahme des Trockensubstanzgehaltes im Fermenter, konnten sich die Gaserträge wieder etwas stabilisieren. Jedoch unterlagen sie weiterhin starken Schwankungen. Dies war wahrscheinlich auf die anhaltenden Probleme bei der Durchmischung der Fermenter zurückzuführen.

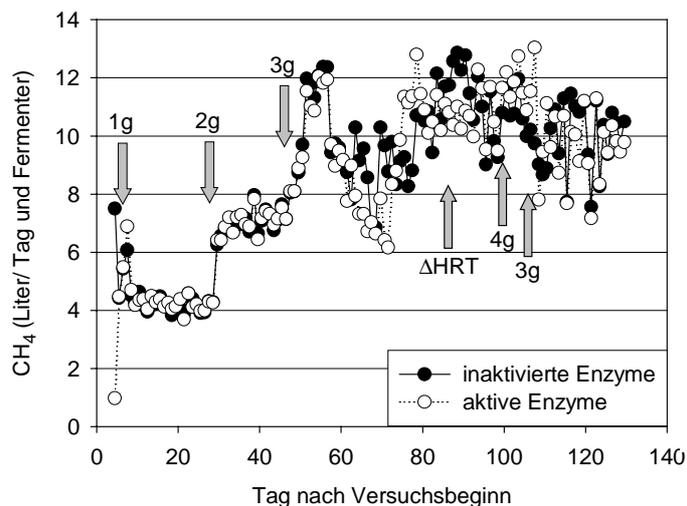


Abbildung 16:
Verlauf des CH_4 -Ertrags aus **Grünroggen-GPS** in Normlitern je Fermenter über den Versuchszeitraum. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern. Pfeile kennzeichnen Stufen der Substratdosierung und Änderung der hydraulischen Verweilzeit (HRT).

Neben physikalischen Einflüssen auf die Gasfreisetzung während der Vergärung, kam es auch zu vorübergehenden Störungen im Gärprozess, die sich in Veränderungen der Puffereigenschaften des Gärrückstandes zeigten (Abbildung 17). Von der ersten zur zweiten Belastungsstufe erhöhte sich die Pufferkapazität im Bereich des Hydrogencarbonatpuffers leicht (Tag 26 und 43). Die weitere Erhöhung der Raumbelastung auf $3 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ führte allerdings zu einer starken Belastung des Hydrogencarbonatpuffers und einer deutlichen Anreicherung an flüchtigen organischen Säuren (FOS) im Gärrückstand beider Varianten. Hiermit korrespondierten die abfallenden CH_4 -Erträge (Abbildung 16). Durch die Reduzierung der Hydraulischen Verweilzeit und der somit verstärkten Zugabe an Gülle als Grundsubstrat, erhöhte sich neben der Durchmischbarkeit des Fermenters auch die Pufferkapazität des Gärrückstandes und der Gehalt an FOS ging stark zurück. Zugleich stabilisierten sich die Gaserträge. Die Zugabe von Enzymen hatte keinen feststellbare Einfluss auf die Gaserträge oder Eigenschaften der Gärrückstände.

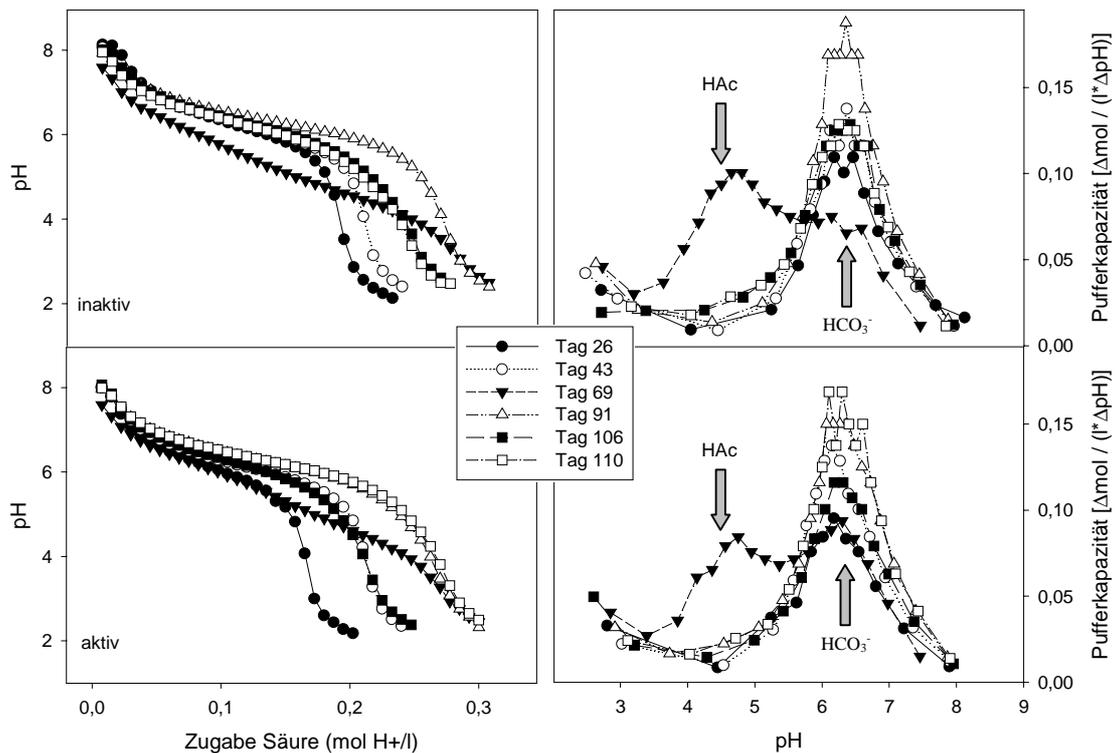


Abbildung 17: Titrationskurven und daraus berechnete Kurven der Pufferkapazität für Gärrückstände während der Vergärung von **Grünroggen-GPS** mit inaktiven und aktiven Enzymen. Pfeile kennzeichnen den pKa des Hydrogencarbonats (HCO_3^-) und der Essigsäure (HAc), stellvertretend für die flüchtigen Fettsäuren.

Ein kurzfristiger Effekt der Enzymzugabe war lediglich bei Vergärung der **Grassilage** zu beobachten (Abbildung 18). Die Vergärung beider Varianten verlief hier deutlich ungestörter, als bei der Vergärung des Grünroggen-GPS, obwohl auch hier z.T. die Durchmischung bei hohen Raumbelastungen erschwert war. Trotzdem konnte die Dosierung bis auf $4 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Gaserträge mit und ohne Enzymzugabe nicht verschieden. Nach Verkürzung der Verweilzeit von 25 auf 12 Tage und dem Wechsel des Grundsubstrates von Gärrückstand auf Gülle, brachen jedoch die Gaserträge bei Zugabe inaktivierter Enzyme stark ein, während die Gaserträge bei Zugabe von aktiven Enzymen konstant blieben. Dies fand in jeweils beiden Parallelen der entsprechende Varianten statt, so dass ausgeschlossen werden kann, dass diese Abnahme auf zufällige Störungen im Gärverlauf zurückzuführen ist.

Ursache hierfür scheint eine verstärkte Säurebildung in den Fermentern ohne Enzymzugabe gewesen zu sein, wie durch die Bestimmung der Pufferkapazität in den Gärrückständen deutlich wurde (Abbildung 18). Während von Tag 26 bis Tag 91 eine stetige Zunahme der Pufferung durch Hydrogencarbonat festzustellen war, war die Pufferkapazität an Tag 106 wieder deutlich reduziert und es konnten Flüchtige Fettsäuren durch die Titration nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die Mengen an Fettsäuren waren in der Variante mit inaktiven Enzymen deutlich höher, als in der Variante mit aktiven Enzymen. Die Erholung der Gasproduktion ging mit einer Abnahme der FOS-Konzentration im Fermenter einher. Die Beeinträchtigung der Gasbildung scheint folglich Ursache oder Wirkung der erhöhten Säurebelastung gewesen zu sein.

Diese Wirkung lässt sich nicht mit einem verbesserten hydrolytischen Aufschluss des Pflanzenmaterials durch die aktiven Enzyme erklären, da dies zu einer verstärkten Bildung flüchtiger organischer Säuren hätte führen müssen und nicht zu deren Verminderung. Es scheint, dass der Effekt der Enzyme hier nicht auf dem Aufschluss des Pflanzenmaterials beruhte, sondern nachgelagerte Schritte des Biogasprozesses durch die Enzyme beeinflusst wurden.

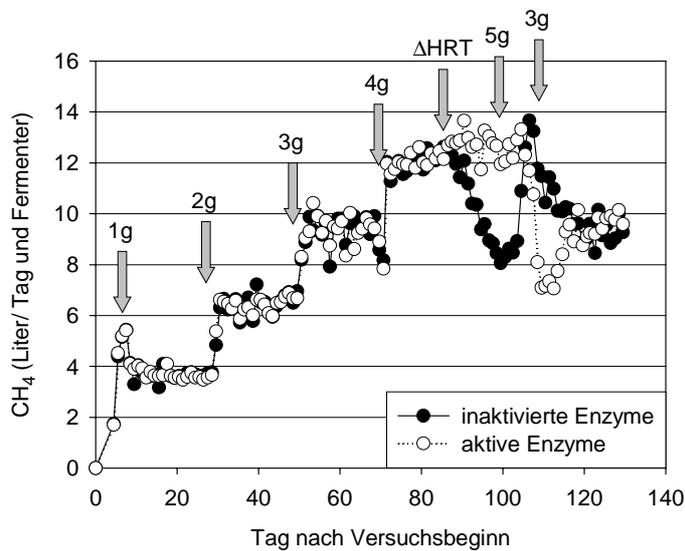


Abbildung 18:
Verlauf des CH_4 -Ertrags aus **Grassilage** in Normlitern je Fermenter über den Versuchszeitraum. Mittelwerte aus jeweils 2 Fermentern. Pfeile kennzeichnen Stufen der Substratdosierung und Änderung der hydraulischen Verweilzeit (HRT).

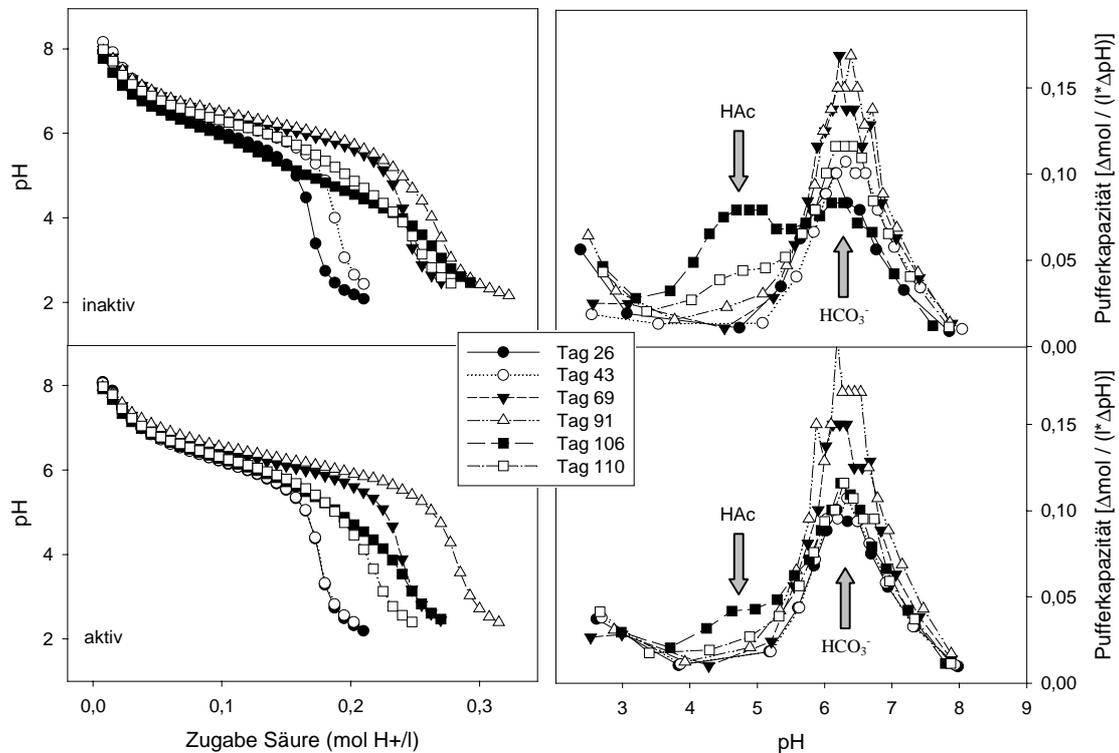


Abbildung 19: Titrationskurven und daraus berechnete Pufferkurven für Gärrückstände während der Vergärung Grassilage mit inaktiven und aktiven Enzymen. Pfeile kennzeichnen den pK_a des Hydrogencarbonats (HCO_3^-) und der Essigsäure (HAc) stellvertretend für die flüchtigen Fettsäuren.

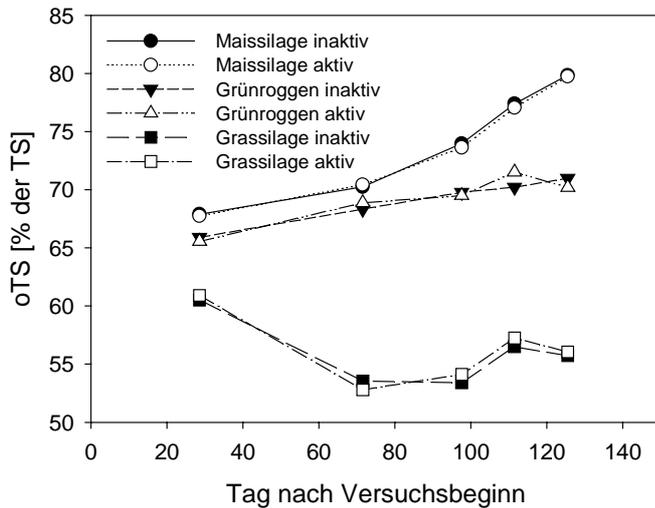


Abbildung 20:
Anteil der organischen Trockensubstanz (oTS) am Gesamt-Trockensubstanzgehalt (TS) der Gärrückstände während des Versuchs.

Der Effizienz des Abbaus organischer Substanz während der Vergärung lässt sich auch durch den Gehalt an organischer Substanz im Gärrückstand beurteilen. Da es je nach verwendetem Substrat und Stufe der Raumbelastung zu Problemen bei der Entnahme des Gärrückstandes kam, ist jedoch der Gesamtgehalt der organischen Trockensubstanz (oTS) nicht aussagekräftig. Als robusterer Parameter kann hier der Anteil von oTS an der Trockensubstanz dienen (Abbildung 20). Für die Grassilagen stieg der Anteil von oTS an TS im Versuchsverlauf, mit Erhöhung der Raumbelastung stetig an. Dies korrespondierte mit den abnehmenden täglichen CH_4 -Erträgen (Abbildung 14). Folglich nahm mit zunehmender Raumbelastung die Effizienz der Vergärung ab. Für die Grünroggen-GPS nahm der Anteil von oTS an TS nicht so stark zu, da hier die Raumbelastung nur bis auf $3 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ statt bis auf $6 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht wurde. Die deutlich höheren Aschegehalte der Grassilage (vgl. Tabelle 1, Seite 11) führten zu einem geringeren Anteil von oTS an TS im Gärrückstand dieser Variante. Hier ist eine Zunahme von oTS im Gärrückstand nicht zu erkennen.

Ein Einfluss der Enzymzugabe auf den oTS-Anteil am TS der Gärrückständen war nicht festzustellen.

II.2.4. Schlussfolgerungen

Die durchgeführten Versuche zeigten nur unter sehr extremen Bedingungen im Fermenter eine Wirkung. Weder in Batchversuchen, noch in den kontinuierlichen Versuchen mit Maissilage und Grünroggen-GPS konnte ein Enzymeffekt nachgewiesen werden. Lediglich unter hohen Raumbelastungen mit Grassilage zeigte sich eine stabilisierende Wirkung der Enzyme auf die Biogasproduktion, die mit einer Vermeidung der Anreicherung von organischen Säuren und einer Aufrechterhaltung der Pufferkapazität im Fermenter einherging. Worauf diese Wirkung zurückzuführen ist, und ob die Anreicherung von Säuren Ursache oder Wirkung der verminderten Gasbildung war, konnte nicht festgestellt werden.

In parallel durchgeführten Versuchen des IZMB wurde in 24 Stunden-Batchversuchen eine Wirkung der Enzyme auf den Biogasertrag von Maissilage, Grassilage und Grünroggen-GPS festgestellt, allerdings war das Verhältnis von Enzymen zur Raumbelastung mit $4 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$

¹ im Substrat extrem hoch. Bei der hier gewählten eher praxisübliche Dosierung von bis zu 120 mg g⁻¹ oTS kam es im Gegensatz dazu zu keiner Steigerung des Biogasertrags.

Ein Grund für den fehlenden Nachweis der Enzymwirkung in den durchgeführten Versuchen könnte sein, dass trotz hohen Raumbelastungen und einer stark verminderten hydraulischen Verweilzeit von nur 15 Tagen die Gärbedingungen hinsichtlich Durchmischung und Temperaturverteilung in den verwendeten Fermentern so gut waren, dass durch die Zugabe von Enzymen keine weitere Verbesserung der Gasausbeuten stattfinden konnte.

Der ungeklärte Wirkungsmechanismus der Enzyme auf die beobachtete Stabilisierung der Gaserträge im kontinuierlichen Versuch mit Grassilage macht deutlich, dass weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der während der Vergärung ablaufenden Prozesse besteht.

II.3. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Bezüglich der Ergebnisverwertung wird auf den Schlussbericht der Bioreact GmbH verwiesen.

II.4. Allgemeiner Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens

Bezüglich des allgemeinen Fortschritts wird auf den Schlussbericht der Bioreact GmbH verwiesen.

II.5. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden bisher nicht veröffentlicht. Eine Veröffentlichung von Teilergebnissen ist nach Abschluss des Gesamtvorhabens in Absprache mit den Projektpartnern geplant.