

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

Schlussbericht zu Nr. 8.2 NKBF 98

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

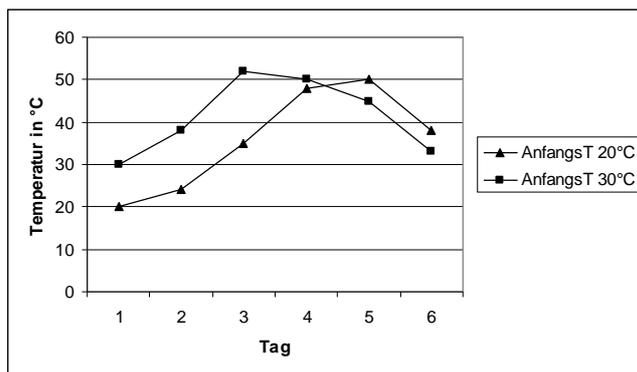


Abb. 1: Temperaturverlauf im Röhrenbioreaktor

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.

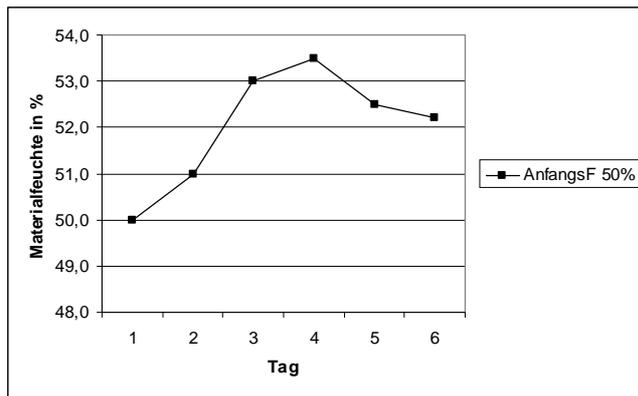


Abb. 2: Feuchteverlauf im Röhrenbioreaktor

Die zeitlichen Profile der Substrattemperatur und der Materialfeuchte sind durch das mikrobielle Wachstum bestimmt. Durch die mit dem Biomassewachstum einhergehende Zunahme der aeroben Stoffwechselaktivität stiegen im Substrat im Laufe der Fermentation sowohl die Wärme-, als auch Wasserproduktion zunächst an. Das Absinken der beiden Parameter am Ende der Fermentation geht mit dem Übergang von der Wachstumsphase der Mikroorganismen in die stationäre Phase sowie einem Übergang des Wachstumsstoffwechsels in den Erhaltungsstoffwechsel einher. Trotz der Komplexität des Systems (komplexe Substrate, Co-Kultivierung mehrerer Pilzarten) spiegeln die Graphen den typischen Verlauf des mikrobiellen Wachstums wieder. Eine direkte Messung der Biomasse ist in der Feststofffermentation zur Zeit noch nicht möglich. Deshalb wurde der Temperaturverlauf generell als Indikator für das Biomassewachstum verwendet.

Hinsichtlich der Anfangsfeuchte erwies sich die Fermentation in den Röhrenbioreaktoren als besonders sensibel. Erfolgreiche Fermentationen waren nur mit Anfangsfeuchten im Bereich zwischen 45-55% Wassergehalt möglich. Bei geringeren Anfangsfeuchten kam es zu einer deutlichen Verlängerung der lag-Phase sowie einer partiellen Austrocknung des Substrats mit insgesamt schlechtem Wachstum. Bei höheren Anfangsfeuchten übermäßigte das Substrat und es kam zu bakteriellem Wachstum mit unangenehmer Geruchsbildung. Eine Abführung der Feuchtigkeit über den Luftstrom war in den weitgehend geschlossenen Röhrenfermentern nur begrenzt möglich. Gleiches galt für die Abführung der Prozesswärme.

Die Ergebnisse der Qualitätsuntersuchung der Fermentationen in den Röhrenbioreaktoren sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst. Die Bewertung der Fermentationen wurde dabei über die Messung der Verzuckerungsleistung vorgenommen. Dazu wurden 0.8 g TS Enzympräparat mit jeweils 1.8 g TS MS oder 1.75 g TS GS vermischt und in 50 ml H₂O suspendiert. Ferner wurde eine geringe Menge Na-Azid zugegeben um mikrobielles Wachstum in den Verzuckerungsansätzen zu verhindern. Die Suspensionen wurden anschließend 24 h auf einem Schüttler bei 30°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden Proben entnommen und diese gegenüber einer Kontrolle mit hitzeinaktiviertem Enzympräparat nach der Dinitrosalicylsäure-Methode (DNS-Test) auf ihren Gehalt an reduzierenden, endständigen Zuckern untersucht. Die Methode wurde mit Glucose kalibriert. Wegen der starken Streuung der Ergebnisse innerhalb der Stichproben sind die Ergebnisse der Verzuckerung in Tabelle 1 in qualitativer Form wiedergegeben.

Tab. 1: Ergebnisse der Fermentation in Röhrenfermentern

Umgebungstemperatur	20°C	30°C	
Verzuckerungsleistung	++	+++	
Anfangsfeuchte	45%	50%	55%
Verzuckerungsleistung	++	+++	+
Röhrenlänge	100 cm	150 cm	200 cm
Verzuckerungsleistung	+++	+++	++
Prozessdauer	4 d	5 d	6 d
Verzuckerungsleistung	++	+++	+++
Inokulumsmenge	wenig	mittel	viel
Verzuckerungsleistung	+	+++	+++
Schichthöhe	2 cm	3 cm	4 cm
Verzuckerungsleistung	+++	+++	+
Belüftungsrate	niedrig	mittel	hoch
Verzuckerungsleistung	++	+++	++

Für die Untersuchung der Wirkung eines der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter wurden alle anderen Parameter auf die jeweils mittlere Ausprägung (die Temperatur auf 30°C) gesetzt. Für die Herstellung aller Enzympräparate erwies sich eine Umgebungstemperatur von 30°C als vorteilhaft, da hier die lag-Phase gegenüber 20°C Umgebungstemperatur deutlich verkürzt war (siehe auch die Abbildung 1). Die kurzzeitig erreichte hohe Temperatur während der Wachstumsphase hatte keinen messbaren Einfluss auf die Produktqualität. Bei der Feuchte erwies sich ein Feuchtegehalt von 50% als generell am besten geeignet. Die Röhrenlänge hatte bis zu einer Länge von 150 cm keinen negativen Einfluss auf den Prozess. Als Prozessdauer erwiesen sich 5 d als ausreichend. Danach nahm die Produktqualität nur noch unwesentlich zu. Die Steigerung der Menge des Inokulums zeigte ein sättigendes Verhalten. Die Menge des Inokulums hatte demnach keinen beschleunigenden Einfluss auf den Prozess. Bezüglich der Schichtdicke nahm die Produktqualität ab einer Schichtdicke von 3 cm deutlich ab. Hinsichtlich der Belüftungsrate schließlich zeigte eine mittlere Belüftungsrate die besten Ergebnisse. Bei zu hoher Belüftungsrate trocknete die Oberfläche des Substrats frühzeitig aus. Bei niedriger Belüftungsrate konnte die entstehende Wärme nicht ausreichend abgeführt werden. Eine Skalierung im Sinne einer möglichen Verlängerung der Röhrenlänge bei gleichzeitiger und proportionaler Steigerung der Belüftungsrate erwies sich als nicht durchführbar.

Auf der Basis der in Tabelle 1 gezeigten Resultate ergaben sich zunächst die folgenden Parameter für eine optimierte Prozessführung: Umgebungstemperatur 30°C, Anfangsfeuchte 50%, Röhrenlänge 150 cm, Prozessdauer 5 d, eine mittlere Inokulumsmenge, Schichthöhe 3 cm und eine mittlere Belüftungsrate. Diese Parameter erwiesen sich für die Herstellung aller 4 Enzympräparate E1-E4 als geeignet. Mit dem so hergestellten Präparat E1 konnte mit Hilfe des beschriebenen Verzuckerungstests an Maissilage innerhalb von 24 h ein Verzuckerungsgrad von ca. 80% erzielt werden. Mit dem Präparat E3 konnte an Grassilage ein Verzuckerungsgrad von 60% erreicht werden.

Oberflächenverfahren O2: Wannengermentation

Das zweite Oberflächenverfahren wurde in Wannen und zunächst in provisorischen Behältern durchgeführt. Dazu wurden pro Behälter 2-5 Holzwannen (45 x 95 cm) eingesetzt, die mit einem Drahtnetz als Boden versehen waren (siehe Abbildung 3).



Abb. 3: Fermentation in Wannen

Die Wannen wurden bis zu einer Schichtdicke von 30 mm mit inokuliertem Substrat befüllt und anschließend in dem geschlossenen Behälter von unten belüftet (dazu waren die Wannen an ihrer kurzen Seite mit einem Durchbruch versehen und wurden hinsichtlich dieser Öffnung alternierend übereinander geschichtet). Die Fermentationen wurden wie zuvor unsteril durchgeführt. Bezüglich der Einstellung der Prozessparameter wurde auf die Erfahrungen aus der Fermentation in Röhrenfermentern zurückgegriffen. Die Belüftungsrate wurde variiert.

Der Bioreaktor wurde zunächst mit 2 Wannen beschickt. Die Substrattemperatur wurde mittels eines Sensors gemessen.

Generell ist bei der Feststofffermentation in geschlossenen Behältnissen die Abführung der Prozesswärme problematisch. In den provisorischen Fermentern kam es zunächst regelmäßig zu einem Wärmestau mit der Entwicklung hoher Luftfeuchtigkeit. Deshalb wurde versucht, die Temperatur über die Belüftungsrate zu kontrollieren. Über eine Steigerung der Belüftungsrate war es – wenn in dem provisorischen System auch nur begrenzt – möglich, die maximale Temperatur zu kontrollieren und den Prozess zu beschleunigen.

Das qualitative Verhalten des Fermentationsprozesses ließ sich durch Computersimulationen auf der Basis eines mathematischen Modells, dessen Einzelheiten hier nicht wiedergegeben werden können, zufrieden stellend nachbilden.

Die für den Prozess vorteilhafte Erhöhung der Belüftungsrate führte aber bei weiterer Steigerung zum Austrocknen der unteren Wanne. Zudem kam es zu einem vertikalen Gradienten, das heißt zu einem unterschiedlichen Verhalten der oberen und unteren Wanne. Dieser Gradient wurde durch die Veränderung der Konditionierung der Zuluft bei der Durchströmung des Behälters sowie die vertikale Konvektion verursacht und ließ sich nicht beseitigen.

Insgesamt konnte mit dem aus der Fermentation in Wannen gewonnen Präparat E3 nach der Optimierung der Belüftungsrate eine Verzuckerungsleistung erreicht werden, die 40% derjenigen entsprach, die durch Fermentation in den Röhrenbioreaktoren erzielt wurde.

Zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse in Wannen wurden Versuche in einem kostenlos zur Verfügung gestellten Konvektionstrockner durchgeführt. In diesem Gerät war eine horizontale Belüftung, ein Umluftbetrieb sowie eine Steuerung der Prozessparameter Temperatur und Feuchte mittels PC möglich. Abbildung 4 zeigt das optimierte Prozessprotokoll einer Fermentation zur Herstellung des Präparats E3 über 4 Tage.

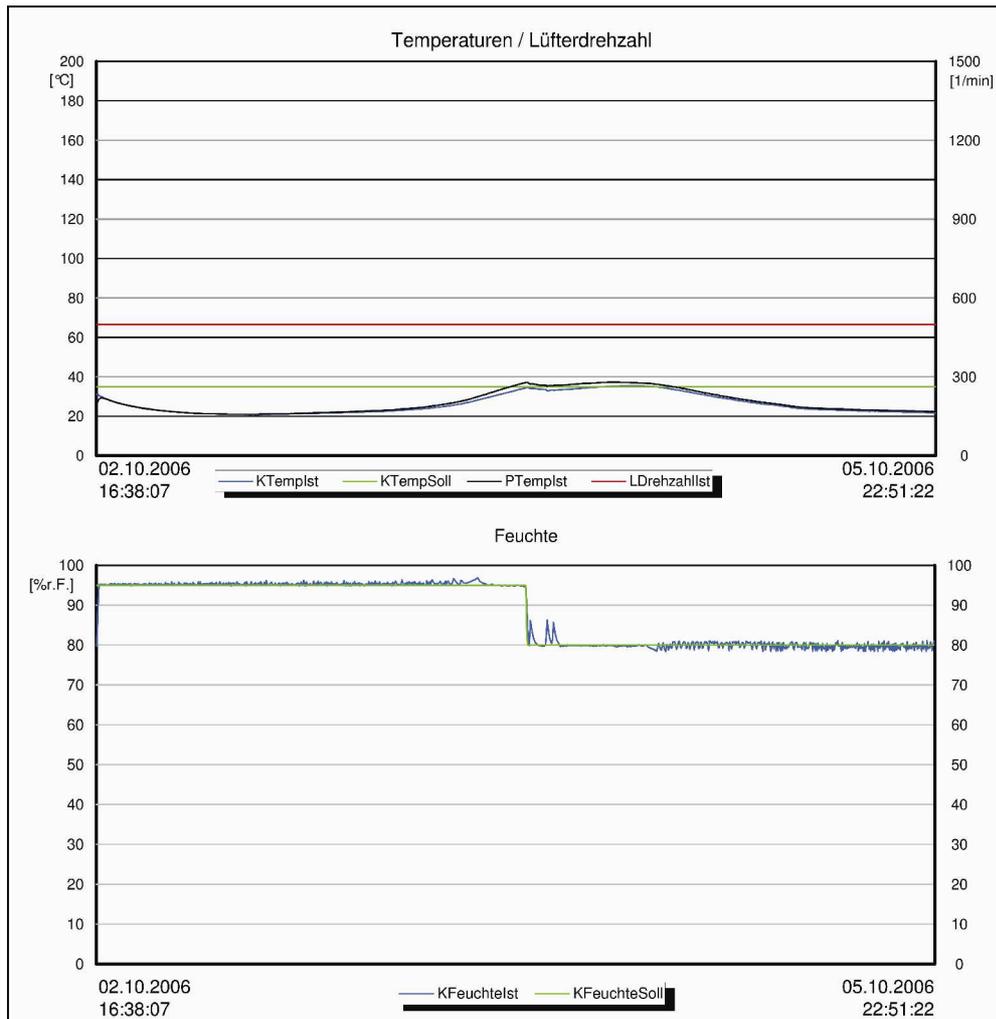


Abb. 4: Optimierte Fermentation im Konvektionstrockner

Unter den optimierten Bedingungen (hinsichtlich des Temperatur- und Feuchteprofils) im Konvektionstrockner ließ sich bei der Herstellung des Präparats E3 eine 85%ige Produktqualität gegenüber der gleichartigen Fermentation in Röhrenfermentern erreichen. Die Fermentationszeit betrug hierbei 4 Tage. Eine bessere Produktqualität ließ sich durch eine Verlängerung der Fermentationszeit nicht erreichen.

Dreidimensionales Verfahren D1: Schneckenförderer

Für das erste der vier untersuchten dreidimensionalen Verfahren zur Herstellung der Enzympräparate wurde der Prototyp eines horizontalen Schneckenförderers aus Glas eingesetzt. Das Gerät ist in Abbildung 5 gezeigt.



Abb. 5: Schneckenförderer aus Glas

Der in der Abbildung gezeigte Bioreaktor hatte eine Länge von 1000 mm und einen Durchmesser von 110 mm und besaß mehrere Stutzen zur Zugabe von Flüssigkeiten oder festem Material oder zur Entnahme von Proben. Die Förderschnecke bestand aus Kunststoff und wurde über einen Elektromotor mit Frequenzumrichter betrieben. Das inokulierte Rohsubstrat wurde (siehe die Abbildung) links dem Fermenter zugegeben und mittels der Schnecke in Form einer Pfropfenströmung nach rechts (siehe die Abbildung) bewegt. Der Prozess wurde semi-kontinuierlich geführt, das heißt die Förderschnecke wurde an jedem Tag um eine Länge bewegt, die der Gesamtlänge geteilt durch die Anzahl der Fermentationstage entsprach. Entsprechend wurde nach einer Anfangsphase jeden Tag Produkt entnommen und inokuliertes Substrat zugeführt.

In dem Schneckenförderer konnten innerhalb des Berichtszeitraums keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, weil es regelmäßig zu Kontaminationen kam.

Dreidimensionales Verfahren D2: Statisches Festbett

Das zweite dreidimensionale Verfahren wurde in einem zylindrischen Laborbioreaktor aus Edelstahl durchgeführt. Das Gerät ist in Abbildung 6 dargestellt. Oberhalb des konusförmigen Moduls am unteren Ende des Bioreaktors war innerhalb des Behälters eine Siebaufgabe angebracht auf der das Substrat gelagert wurde. Das Substratbett wurde von unten belüftet. Die Temperatur wurde über die Begasungsrate auf 28°C reguliert (über ein angesteuertes Ventil). Gleichzeitig verfügte der Laborbioreaktor über einen Doppelmantel zur Kühlung. Das Kühlwasser wurde auf 22 °C temperiert.

Abbildung 7 zeigt das gemessene Temperaturprofil einer Fermentation zur Herstellung des Präparats E3. Die Substratmenge betrug 1,5 kg (Frischgewicht). Nach der zweitägigen Anwuchsphase stieg die Wärmeproduktion rasch an, anschließend fluktuierte die Temperatur aufgrund der Regelung um den Sollwert von 28°C. Nach 5 Fermentationstagen sank die Temperatur wieder ab.



Abb. 6: Zyl. Bioreaktor

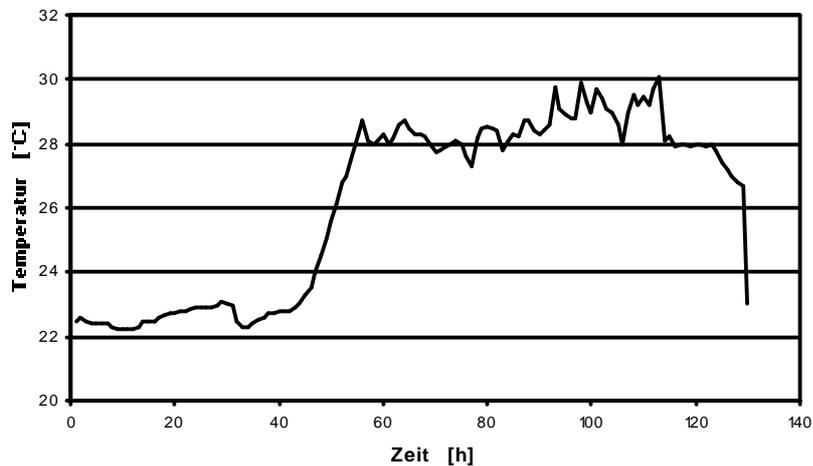


Abb. 7: Temperaturverlauf der Fermentation im Festbett

Die Fermentation im Festbett ergab für die Herstellung des Präparats E3 eine Verzuckerungsleistung von 30% des durch Fermentation im Röhrenbioreaktor erzielten Referenzwerts. Ursache für die geringen Produktqualitäten war eine durch die Belüftung bewirkte Austrocknung. Die eingesetzten Belüftungsraten waren aber notwendig, um die entstehende Wärme abzuführen, die Kühlung über den Doppelmantel reichte aufgrund fehlender Durchmischung des Substratbetts alleine nicht aus. Deshalb wurden in der Folge Versuche mit durchmischten Substratbetten durchgeführt.

Dreidimensionales Verfahren D3: Paddelmixer

Um die Wirkung einer Durchmischung des Substratbetts auf das Pilzwachstum und die Produktqualität zu untersuchen, wurde ein Bioreaktor mit Mischschaufeln (Paddelmixer) konstruiert. Der tonnenförmige Behälter ist in Abbildung 8 gezeigt. Das Gerät besaß einen Durchmesser von 200 mm und 12 Liter Volumen. Für die Fermentation wurde der

Innenraum des Behälters mit 1,8 kg inokuliertem Substrat befüllt. Die Durchmischung erfolgte periodisch und wurde in den Versuchen variiert. Durch die regelmäßige Durchmischung konnten Inhomogenitäten im Substrat vermieden und zusätzlich die Sporenbildung reduziert werden.



Abb. 8: Paddelmixer

Abbildung 9 zeigt den Temperaturverlauf einer Fermentation zur Herstellung des Präparats E3. Die Versuche konnten aus technischen Gründen nur bei einer Umgebungstemperatur von 20°C durchgeführt werden. Eine Regulation der Substrattemperatur erfolgte nicht. Zur Temperaturmessung wurde ein einfaches Thermometer verwendet. In dem in der Abbildung gezeigten Beispiel wurde während der Anwachsphase alle 4 h für 2 min das Substratbett durchmischt. Während der Wachstumsphase mit erhöhter Wärmeproduktion wurde alle 2 h für 2 min durchmischt. Die Versuche wurden wie vorher unsteril durchgeführt. Die Anfangsfeuchte betrug 50%.

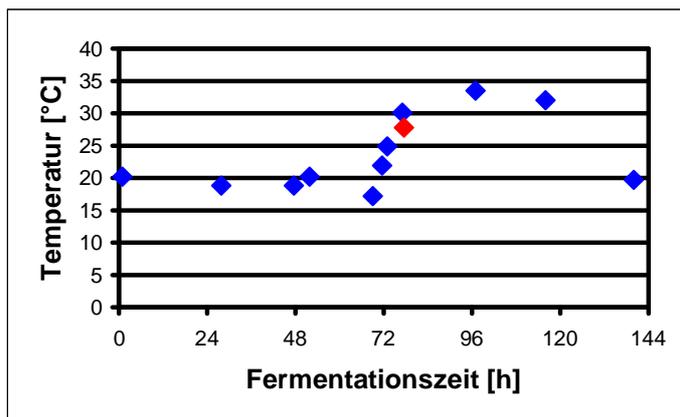


Abb. 9: Temperaturverlauf im Paddelmixer

Nach der lag-Phase mit einer Dauer von 3 Tagen ist in der Abbildung der Übergang zur Wachstumsphase deutlich erkennbar. Diese Verlängerung der Anwachsphase gegenüber früheren Beobachtungen erklärt sich aus der niedrigen Umgebungstemperatur.

Durch Vergleich mit einem ruhenden Substratbett in demselben Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass durch den Mischvorgang die Kerntemperatur im Substrat um 2.3 °C gesenkt wurde (siehe Abbildung 9, roter Punkt). Die Temperaturregulation erfolgte dabei vor allem über einen Transport wärmerer Bereiche des Substrats im Kern des Festbetts hin zur Oberfläche und den kühleren Randbereichen. Die Kühlung über die Glaswand selbst war dabei gering.

Mit unter den beschriebenen Bedingungen hergestelltem Präparat E3 konnte an Grassilage eine Verzuckerungsleistung von ca. 70% der Referenz gemessen werden.

Dreidimensionales Verfahren D4: Konischer Mischer

Die Versuche zur Fermentation mit durchmischtem Festbett wurden in dem in Abbildung 6 gezeigten Gerät fortgesetzt, wobei der Behälter zusätzlich mit einer Rührwendel und einem Elektromotor ausgestattet wurde (siehe Abbildung 10).



Abb. 10: Rührwendel im Behälter des zylindrischen Bioreaktors

Für die Versuche wurden 1,8 kg inokuliertes Substrat mit einer Feuchte von 50% eingesetzt. Der Behälter wurde von unten begast wobei die Begasungsrate variiert wurde. Die Art und Intensität der Durchmischung wurde ebenfalls variiert.

In diesem Bioreaktorsystem konnte in einer Fermentationszeit von 6 Tagen bei einer Belüftungsrate von 1 l/min und einer Durchmischung alle 4 h für 2 min mit einer Umdrehungszahl von 27 rpm Präparat E3 hergestellt werden, dass in seiner Verzuckerungsleistung bei 55% der in den Röhrenfermentern erzielten Qualität lag.

Zum besseren Verständnis der Energie- und Materialströme im konischen Mischer sowie zur Konzeptionierung einer geeigneten Steuerung wurden Computersimulationen auf der Basis eines weiteren mathematischen Modells durchgeführt. Auch diesbezüglich ist die Darstellung von Einzelheiten aus Platzgründen hier nicht möglich. Die Struktur des Modells ist in Abbildung 11 dargestellt. Dabei stehen die Indices R und K für die beiden Kompartimente Rand- und Kernbereich, der Index W steht die Behälterdoppelwand und der Index i für die Konditionierung der Zuluft. Ferner sind X = Biomassekonzentration, S = Substratkonzentration, T = Temperatur, M = Materialfeuchte, J = Begasungsrate, J_{misch}

= Materialaustausch zwischen Kern- und Randbereich, J_w = Kühlmittelfluss und H = Enthalpie.

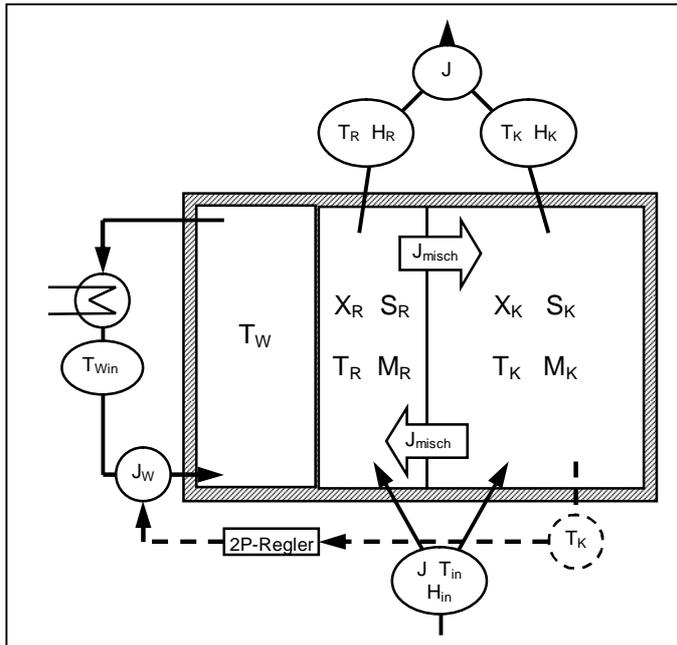


Abb. 11: Modell des konischen Mischers

Für die Bestimmung der Modellparameter wurden umfangreiche Nebenversuche durchgeführt. Beispielsweise wurde der Druckverlust über der Substratschüttung mit Hilfe des in Abbildung 12 gezeigten Versuchsaufbaus gemessen. Dazu wurde experimentell eine Schüttung des Substrats mit unterschiedlichen Luftmengen durchströmt. Die Druckdifferenz über der Schüttung wurde mit Hilfe einer Wassersäule gemessen.



Abb. 12: Versuchsaufbau zur Messung der Druckdifferenz

Die gemessenen Druckdifferenzen wurden anschließend für die untersuchten Strömungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Schütthöhe in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abbildung 13).

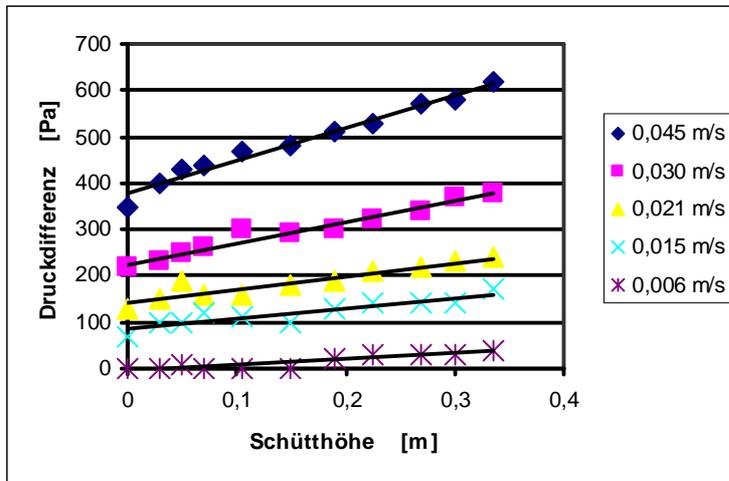


Abb. 13: Druckdifferenzen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit und der Schütthöhe

Daraus wurde ein spezifischer Druckverlust von 600 Pa/m ermittelt, der in das Modell übernommen wurde.

Desweiteren wurde mit der in Abbildung 14 gezeigten Apparatur die spezifische mikrobiologische Wärmeproduktion bestimmt. Dazu wurde ein zylindrischer, isolierter Behälter mit Substrat befüllt und beimpft und anschließend mit einem Luftstrom belüftet. Der Temperaturverlauf in dem Festbett wurde an zwei Stellen registriert. Anhand der aufgezeichneten Temperaturprofile konnte eine Energiebilanz über das Behältervolumen aufgestellt werden. Dabei wurden die Wärmeströme über Zu- und Abluft sowie die evaporative Kühlung berücksichtigt. Der Saldo dieser Bilanzierung stellte die biologische Wärmeproduktion dar. Der gefundene spezifische Wert betrug ca. 4/L.



Abb. 14: Apparatur zur Messung der spezifischen biol. Wärmeproduktion

Mit Hilfe dieser und zahlreicher weiterer Parameterwerte konnten Simulationen der Fermentation im konischen Mischer simuliert werden

Die durchgeführten Simulationen geben Hinweise darauf, unter welchen Bedingungen eine erfolgreiche Fermentation im konischen Mischer durchgeführt werden kann. Eine Realisierung durch Implementierung einer geeigneten Prozesssteuerung konnte aber im Rahmen dieses Fördervorhabens nicht durchgeführt werden.

Vergleich der Fermentation in den verschiedenen Fermenter-Bautypen

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Ergebnisse des scale-up des Verfahrens zur Herstellung der Enzympräparate in den Labormaßstab.

Tab. 2: Ergebnisse des scale-up in den Labormaßstab

Verfahren	O1	O2	D1	D2	D3	D4
Verzuckerungsleistung (%)	100	85	0	30	70	55

Die besten Ergebnisse wurden demnach in den Oberflächenverfahren erzielt. Dies entspricht der allgemeinen Erfahrung. Einer parallelen Produktion in Oberflächenverfahren steht aber der hohe Arbeitsaufwand in der Praxis entgegen. Umgekehrt lassen sich dreidimensionale Verfahren mit durchmischem Festbett besser steuern und standardisieren. Hier steht jedoch die Lösung des scale-up in den technischen Maßstab noch aus und ist erwartungsgemäß schwierig. Auch ist beim Einsatz solcher Verfahren mit einem hohen und zeitlich konzentrierten Investitionsaufwand zu rechnen.

2. Allgemeiner Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens

International konzentrieren sich die Forschungsarbeiten im Bereich der Enzymentwicklung für den Aufschluss von pflanzlichem Material vor allem auf eine Verbesserung der katalytischen Eigenschaften der Cellulase und verwandter Enzyme mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (protein engineering) sowie auf eine gleichzeitige Herabsetzung der Produktionskosten vor allem der Cellulase. Hieran arbeiten die Unternehmen Novozymes und Genencor mit dem Schwerpunkt bei der Bioethanolherstellung. Novozymes arbeitet zudem an einer Verbesserung des Aufschlusses von Pflanzengewebe durch ein optimales Verschneiden seiner bisherigen Produkte.

Hinsichtlich der Verfahrenstechnik wurden im Förderzeitraum keine nennenswerten Bioreaktorkonstruktionen für die Feststofffermentation veröffentlicht.

III. Bewertung der Projektergebnisse aus Sicht des Projektkoordinators

Das Verbundvorhaben zur Optimierung und Validierung von Enzympräparaten für den Einsatz in landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurde aus Sicht der Bioreact GmbH als Projektkoordinator und Verwerter der Projektergebnisse erfolgreich abgeschlossen. Dies gilt auch vor dem Hintergrund der weitgehend fehlenden Effekte in den Batch- und kontinuierlichen Gärversuchen des Projektpartners IPE.

So konnte durch das IZMB die Wirksamkeit der in Rahmen des Projekts optimierten Enzympräparate sowohl hinsichtlich des Aufschlusses der Zielsubstrate Maissilage, Grassilage und Roggenganzpflanzensilage in Verzuckerungstests als auch bei der Biogasproduktion in Gärtests gezeigt werden (siehe den Schlussbericht des IZMB). Der Bioreact GmbH gelang es innerhalb des Projektzeitraums das Herstellungsverfahren erfolgreich in den Labormaßstab zu übertragen. Die im Labormaßstab hergestellten Enzympräparate sind hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit kommerziell einsetzbar.

Mit dem IPE zur Verfügung gestellten Musterpräparaten konnten dort in Batch- und in kontinuierlichen Gärversuchen im wesentlichen keine positiven Effekte auf die Biogasproduktion beobachtet werden (siehe den Schlussbericht des IPE). Dort wurde im Verhältnis zu den vom IZMB durchgeführten Versuchen und nach Absprache mit geringeren Enzymkonzentrationen gearbeitet. Allerdings zeigte sich auch in einem der Experimente des IPE, in dem der Einfluss einer Steigerung der Raumbelastung auf die Stabilität des Biogasprozesses unter kontinuierlichen Bedingungen untersucht wurde, ein prozessstabilisierender Effekt bei der Verwendung von Grassilage als Substrat. Dieser Effekt trat spontan und unerwartet bei einer bestimmten Raumbelastung und gleichzeitig mit einer Veränderung der Verweilzeit auf. Dieses Ergebnis deutet auf ein Schwellenverhalten der Enzymwirkung im Biogasprozess hin. Ein solches Schwellenverhalten wurde auch bei den Gärtests des IZMB beobachtet, ebenso bei durch das Tochterunternehmen Bioreact Enzyme GmbH durchgeführten Testversuchen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Eine Erklärung hierfür konnte bisher noch nicht gefunden werden, denn das Verhalten zeigte sich nicht bei den im Rahmen des Fördervorhabens durch das IZMB durchgeführten Verzuckerungstests (siehe dazu den Schlussbericht des IZMB). Dort verhielten sich die Enzympräparate gemäß einer klassischen Monod-Kinetik. Die Ursache scheint deshalb nicht im Bereich des Primäreffekts der Enzymwirkung, das heißt im Bereich des Aufschlusses und der enzymatischen Hydrolyse des Pflanzenmaterials, zu liegen, sondern ein Sekundäreffekt innerhalb der nachfolgenden Schritte des Biogasprozesses zu sein. Offensichtlich hängt die Wirksamkeitsschwelle der Enzympräparate auch von der Skalierung ab, denn diejenigen relativen Enzymkonzentrationen (im Verhältnis zur eingesetzten Substratmenge), die einen Effekt auslösen, sind im Labormaßstab und im technischen Maßstab sehr unterschiedlich. Generell sinkt die Wirksamkeitsschwelle mit zunehmender Größe des Systems deutlich. Auch hierfür gibt es bislang keine Erklärung.