

**Innovationsfonds
Klima- und Wasserschutz der badenova AG & Co. KG**

Schlußbericht zum Forschungsvorhaben:

**Unterstützung der Hydrolyse durch aerobe Produktion von
Enzymen unter Verwendung von Gärresten in einer Biogasanlage**

Projektlaufzeit 01.05.2011 – 30.04.2013

Projektnummer: 2011-11

Durchführende Forschungsstelle:



Projektleiter:

Dr.-Ing. Andreas Wilke

Projektmitarbeiterin:

Anna Sandhaas B.Sc.

Motivation:

Grundlage des durchgeführten Forschungsprojekts ist die Verbesserung der Hydrolyse durch den Einsatz cellulolytischer Enzyme. Im Gegensatz zu etablierten Verfahren, bei denen man Biogasreaktoren extern produzierte Enzyme zusetzt, werden in diesem Forschungsprojekt die Enzyme mittels einer aeroben Fermentation vor Ort hergestellt und dem Biogasprozeß direkt zugeführt. Zur effektiven Enzymproduktion und zur Kostenreduzierung besteht das Kultivierungsmedium der Cellulaseproduktion aus dem Biogasgärrest gemischt mit einem stärke- und cellulosehaltigen Substratanteilstrom (z.B. Maissilage). Die zur Cellulaseproduktion notwendigen Pilze und/oder Bakterien werden inklusive der gebildeten Enzyme aus einem kontinuierlich betriebenen, aeroben Fermentationsprozeß dem Biogasreaktor zugeführt. Im Biogasreaktor wird hierdurch eine verbesserte Hydrolyse der schwer abbaubaren, langkettigen Cellulose bewirkt. Hierdurch kann eine erhöhte Biogasbildung verbunden mit einer verbesserten Biogasbildungskinetik erwartet werden. Aus cellulosehaltigem Substrat kann demnach mehr Biogas erzeugt werden. Zudem könnte das Spektrum der einsetzbaren Biogassubstrate deutlich erweitert und einer „Tank und Teller“-Diskussion damit begegnet werden.

Vorgehensweise:

Zur Herstellung der Enzyme werden zwei Teilströme innerhalb der Biogasanlage genutzt. Die grundlegende mineralische Versorgung der Enzymproduzenten kann durch eine Beimischung von Biogasgärresten gewährleistet werden. Diese enthalten ausreichend hohe Konzentrationen an Phosphat, Sulfat, Chlorid, Natrium, Kalium, Magnesium und Ammonium, um eine Versorgung der Enzymproduzenten zu gewährleisten. Eine zusätzliche und kostenaufwendige Supplementierung von essentiellen Nährstoffkomponenten kann damit entfallen.

Zusätzlich werden dem Fermentationsmedium geeignete Kohlenstoffquellen zugemischt. Diese bestehen zum einen aus einem leicht verstoffwechselbaren Kohlenhydrat (z.B. Stärke) und zum anderen aus einem sogenannten Induktor (z. B. Cellulose). Die leicht metabolisierbare Stärke dient dazu, ein schnelles Anwachsen der mikrobiellen Biomasse zu erzielen. Der Celluloseanteil als zweiter Kohlenhydratbestandteil sorgt anschließend dafür, daß die hydrolytischen Enzyme, wie Cellulasen, von den Enzymproduzenten überhaupt erst induziert und gebildet werden können. Hier können auch andere nachwachsenden Rohstoffe, die der gesamten Biogasanlage als Substrat dienen, eingesetzt werden. Maissilage, als Beispiel eines häufig eingesetzten Substrats, erfüllt diese Bedingung, da es neben den cellulolytischen Anteilen gleichfalls leicht verstoffwechselbare Kohlenhydrate wie Stärke enthält. Nur durch eine gezielte Nährstoffzusammensetzung beider Teilströme kann eine effektive Enzymproduktion in der aeroben Fermentation erreicht werden.

Ein weiterer wesentlicher Teilaspekt zum Erreichen des Projektziels ist die Entwicklung eines Enzymreaktors im Labormaßstab. Hierzu zählen Konstruktion, Ausstattung mit notwendiger Meß- und Regelungstechnik, die verfahrenstechnische Charakterisierung, die Inbetriebnahme sowie der kontinuierliche Betrieb des Enzymproduktionsreaktors.

Entsprechend der beschriebenen Zielstellung gliederte sich das bearbeitete Forschungsprojekt in die folgenden Arbeitspakete, deren Ergebnisse in den bezeichneten Unterkapiteln a) bis d) beschrieben sind.

Ergebnisse:

a) Screening von potentiellen Enzymbildnern

Das Screening auf potentielle Cellulasebildner ist dreigeteilt, um möglichst viele Stämme in einem überschaubaren Zeitrahmen zu untersuchen. Im qualitativen Screening wird die grundsätzliche Fähigkeit der Teststämme überprüft, Cellulasen zu bilden. Dazu wurde den einzelnen Stämmen eine definierte Menge an Cellulose in das Kultivierungsmedium gegeben und über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen kultiviert. Bei vollständig abgebauter Cellulose (qualitatives Screening) wurde der Stamm in die zweite Phase des Screenings (quantitatives Screening) überführt. Im Ergebnis konnten im qualitativen Screening 12 potentielle Produktionsstämme untersucht werden. Fünf Stämme wurden in die zweite Screeningphase (quantitatives Screening) überführt, in der zusätzlich die Cellulasaktivität, die Induktorwirkung (Art des Induktors und Konzentration) überprüft wurden (Ergebnisse vgl. Tabelle1).

Tabelle 1: Ergebnisse der zweiten Screeningphase (quantitatives Screening)

Mikroorganismus	Bester Induktor	Optimale Konzentration	Maximal erreichte Cellulaseaktivität
<i>Thermobifida cellulositytica</i>	Filterpapier + Glucose	Je 0,5 g/L	0,11 units/mL
<i>Thermobifida fusca</i>	Hamsterwolle	0,5 g/L	0,11 units/mL
<i>Trichoderma reesei</i> DSM 769	Maissilage trocken	0,3 g/L	1,44 units/mL
<i>Trichoderma reesei</i> DSM M18.2b	Avicel + Glucose	Je 0,5 g/L	0,71 units/mL
<i>Trichoderma reesei</i> DSM M18.2-C	Avicel + Glucose	Je 0,5 g/L	0,24 units/mL

In der dritten Screeningphase wurden die geeignetsten Stämme im Biogasbatchteststand untersucht. Hier sollte demonstriert werden, ob die hohe cellulolytische Aktivität auch zwangsläufig eine gesteigerte Biogasbildung zur Folge hat. Zunächst wurden Cellulasen unter optimalen Kultivierungsbedingungen gebildet. Diese wurden im Anschluß geerntet und dem Biogasbatchteststand unter vergleichbaren Bedingungen zugeführt. Nach VDI Richtlinie 4630 wurden nach 28-tägiger Versuchszeit die Biogasausbeuten verglichen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse von *Thermobifida cellulositytica* unter Verwendung verschiedener Substrate beispielhaft dargestellt (die vollständigen Ergebnisse sind dem ausführlichen Abschlußbericht zu entnehmen).

Am Ende der Projektlaufzeit ergaben sich Hinweise, daß die Steigerung der Biogasmenge bei Hirse als Substrat durch Zugabe von *Thermobifida*-Kulturüberstand nicht alleinig auf die Enzymzugabe zurückzuführen ist. Die genaue Ursache konnte während der Projektlaufzeit noch nicht ausreichend geklärt werden und ist deshalb Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Tabelle 2: Biogasertragssteigerung durch Zugabe von Kulturüberstand aus *Thermobifida cellulosilytica* Kultivierungen (dritte Phase des Screenings) im Biogasbatchteststand durchgeführt nach Richtlinie VDI 4630).

Substrat	Mehrertrag an Biogas durch Enzyme
Maissilage	+15%
Tabak	+11%
Weizenstroh	+22%
Grassilage	+6%
Hirse	+21%

b) Optimierung des Kultivierungssubstrats zur effektiven Enzymproduktion

Zielstellung dieses Arbeitspaketes war die Herstellung eines Kultivierungsmediums aus vorhandenen Substrateilströmen einer Biogasanlage. Als Kohlenstoffquelle und Mineralsalzquelle wurden wäßrige Extrakte der Maissilage und des Biogasgärrests verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass das optimale Kohlenstoff zu Stickstoffverhältnis (C/N-Verhältnis) eines effektiven Kultursubstrats zwischen C/N=5-30 liegt. Mit Maissilageextrakt (C/N=15) und Gärrest (C/N=3,8) wurden im Anschluß Kultursubstrate mit unterschiedlichen Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnissen durchgeführt und die gebildete Proteinkonzentration, die Konzentration reduzierender Zucker sowie die Cellulaseaktivität gemessen.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, daß ein Kohlenstoff zu Stickstoff Verhältnis von C/N=12 die höchste cellulolytische Aktivität aufweist, die durch die Kultivierung von *Thermobifida cellulosilytica* erzielt werden kann.

Eine zusätzliche Addition von Phosphat zeigte keine signifikante Erhöhung der enzymatischen Aktivität bei diesem Verhältnis von C/N=12 und läßt darauf schließen, daß eine ausreichende Versorgung von Phosphaten vorliegt.

c) Auslegung, Entwicklung und Charakterisierung des Enzymreaktors

Ein zu entwickelnder Enzymproduktionsreaktor (Labormaßstab), der an eine Biogasanlage gekoppelt ist, sollte folgende Kriterien erfüllen:

- kontinuierlicher Betrieb und Messung von Sauerstoffpartialdruck, Temperatur, pH-Wert
- transparentes Reaktorgehäuse (sollte mit Festbettmaterial betrieben werden können)
- Volumen ausgelegt auf vorhandene Biogasanlage im Technikum
- sterilisierbar und temperierbar (monoseptische Betriebsweise)
- keine bewegten Teile (z.B. Rührer)

Es wurde ein doppelwandiger (thermostatisierbarer) Festbettreaktor entwickelt, der in Abbildung 1 dargestellt ist und die genannten Vorgaben erfüllt.

Zu erkennen ist ein doppelwandiger Rohrreaktor aus Borsilikaglas. Die Reaktorköpfe enthalten die notwendigen Anschlüsse zur Belüftung, Zu- und Ablaufanschluß, Temperaturmessung sowie Anschluß für einen Bypass zur pH-Messung und zur Probe-nahme. Das Arbeitsvolumen des Reaktors beträgt 0,74 L. Der Reaktor ist auf einem Metallprofil montiert und kann mit einer herkömmlichen Fermentersteuer- und Regeleinheit hinsichtlich Temperatur und pH-Wert geregelt werden (Modell Biostat MD Fa. Braun, Melsungen).

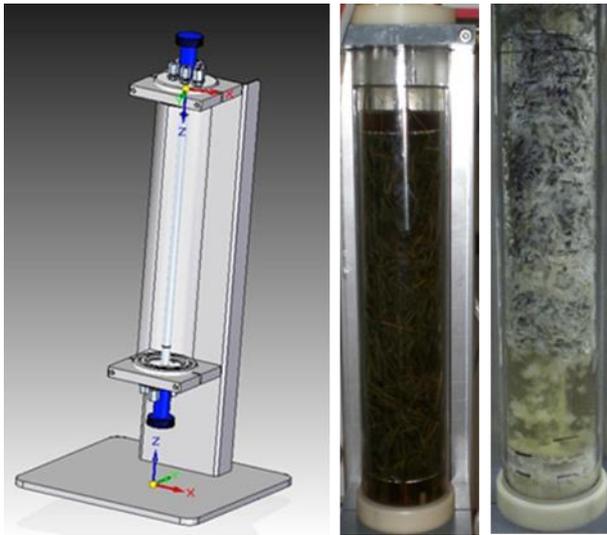


Abbildung 1: Bioreaktor zur Produktion von Cellulasen (Bild links: CAD-Zeichnung; Bild mittig: Reaktor gefüllt mit Induktor (Heu) zu Versuchsbeginn; Bild rechts: Reaktor bewachsen mit *Thermobifida cellulositytica* (auf Induktor Heu) zu Versuchsende)

Heu und Watte aus Cellulose. Gearbeitet wurde mit dem Produktionsstamm *Thermobifida cellulositytica*. In Schüttelkolbenversuchen konnte gezeigt werden, daß sich herkömmliches Heu als Induktor genauso gut eignet wie reine Cellulose (Avicel), aber im Gegensatz dazu kostengünstig zu beschaffen ist (gemessen: resultierende spezifische Cellulaseaktivität und Proteinproduktion).

Für den kontinuierlichen Betrieb im Enzymreaktor wurden zunächst die kinetischen Koeffizienten von *Thermobifida cellulositytica* ermittelt. Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} und Biomasseausbeute $Y_{X/S}$ wurden mit $\mu_{\max}=1,01 \text{ d}^{-1}$ und $Y_{X/S}= 0,612$ Gramm Biomasse pro Gramm Substrat bestimmt.

Nach verschiedenen Optimierungen hinsichtlich der Auswahl des Reaktorwerkstoffs konnte der Reaktor sterilisiert werden und nach einer Batchphase von 4 Tagen über weitere 16 Tage kontinuierlich zur Enzymproduktion betrieben werden.

Ausblick:

Im ersten Arbeitspaket hat sich gezeigt, daß ein strukturiertes Screening eine wesentliche Grundlage darstellt, die Umwandlung von cellulosehaltigem Material in Biogas zu unterstützen. Im Verlauf des Projekts wurde deutlich, daß die unterschiedlichen Mikroorganismen auch unterschiedliche Arten Cellulasen bilden. Es werden in verschiedener Ausprägung Exoglucanasen (Spaltung vom Ende der Cellulosekette), Endoglucanasen (Spaltung im Zentrum des Cellulosekette) oder Cellobiasen (Spaltung der Disaccharide) gebildet. Aus diesem Grund kann es ein erfolversprechender Ansatz sein, in künftigen Untersuchungen Cokultivierungen verschiedener Cellulaseproduzenten durchzuführen. Dies könnte zu einer besseren Spaltung der Cellulose mit anschließender Biogasbildung führen als die Summe einzelner Cellulaseproduktionen aus monoseptischer Kultivierung (kooperativer Effekt der Cellulaseproduktion).

Da für das beschriebene Projekt im Arbeitspaket Analytik nur eine Gesamtcellulaseaktivitätsanalytik (Filter Paper Assay) etabliert wurde, sollte eine Differenzierung der Cellulasen in Exo-, Endoglucanase und Cellobiase etabliert werden.

Zur verfahrenstechnischen Charakterisierung des Reaktors wurde das reale Verweilzeitverhalten bestimmt. Hierzu wurde die Tracer Methode bei verschiedenen Volumenströmen angewendet. Das reale Verhalten des Bioreaktors kann durch eine Verschaltung idealer Reaktoren mit folgender prozentualer Verteilung beschrieben werden: Ideal durchmischter Reaktor (75%), idealer Rohrreaktor (8%). Zudem weist der Reaktor ein Totvolumen von 17% auf (Compartment-Modell).

d) Inbetriebnahme des Enzymreaktors

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde der entwickelte Enzymbioreaktor sterilisiert und in Betrieb genommen. In einer ersten Phase wurden geeignete Induktoren (Cellulosepartikel) gesucht, mit denen der Bioreaktor gefüllt werden konnte. Getestet wurden die Celluloseinduktoren: Avicel® PH-101, Whatman® Filter Papier, zerkleinertes

Der entwickelte Enzymreaktor zur Cellulaseproduktion zeigt seine grundsätzliche Eignung zur kontinuierlichen Enzymproduktion. In der ersten Version wurden noch eine Vielzahl an Meß- und Regeltechnik in den Bioreaktor eingebaut, die eine Sterilisation und monoseptische Betriebsweise deutlich erschwert haben. Aus diesem Grund sollen künftige Modifikationen im Labor- aber vor allem im Pilotmaßstab das Ziel verfolgen, zunächst das Reaktorsystem zu vereinfachen. Hierzu zählen beispielsweise die Entfernung der p_{O_2} -Meßtechnik, keine Thermostatisierung über den Doppelmantel, geringere Bauhöhe des Reaktors, Dichtung über O-Ringe anstelle von Flachdichtungen.

Zudem hat sich gezeigt, daß eine kontinuierliche Nachführung des Induktors (im konkreten Fall: sterile Zuführung des Heus) ungeeignet ist und sich nur unter hohem technischen Aufwand realisieren läßt. Ein zu entwickelnder Pilotreaktor sollte demnach ohne Induktornachführung und unter einfachen Bedingungen zu betreiben sein.

Im Bereich der Enzymdosierung in einem potentiellen Biogasreaktor sind künftig folgende Einflußgrößen auf die Enzymdosierung (Volumen/Dauer) näher zu untersuchen:

- Art der Substratzusammensetzung im Biogasreaktor (z.B. Anteil Cellulose)
- Gesamtaktivität und Einzelaktivitäten der gebildeten Cellulasen des Enzymproduktionsstamms
- Halbwertszeit der Cellulaseaktivität in einem Biogasreaktor (bei Anwesenheit von Proteasen)
- Art der Enzymdosierung (täglich/stündlich/kontinuierlich)
- Durchmischungsverhalten im Biogasreaktor

Diese Parameter könnten die Basis bilden, um die Enzymdosierung besser nachvollziehbar und im besten Fall sogar mathematisch beschreibbar zu machen.

Ein ausführlicher Abschlußbericht liegt als Druck- und PDF-Version vor und kann bei Bedarf vom Projektleiter angefordert werden.