

Mathieu Brulé, Andreas Lemmer, Hans Oechsner und Thomas Jungbluth, Hohenheim, sowie Ulrike Schimpf, Berlin

# Einfluss der Zugabe von faserspaltenden Enzymen auf die Methanausbeute von Roggensilage

*Enzymzusätze werden in der Praxis als Hilfsmittel eingesetzt, um den Methanertrag von faserreichen Energiepflanzen durch eine verbesserte Umsetzung schwer abbaubarer Fraktionen zu erhöhen. Zur Beurteilung des Einflusses von faserspaltenden Enzymen auf den anaeroben Abbau von Roggensilage wurden diskontinuierliche Gärtests im Biogaslabor der Universität Hohenheim durchgeführt. Im Rahmen der Versuche konnte durch die Zugabe von Enzymen in praxisnahen Konzentrationen keine wesentliche Steigerung der Methanerträge bei den Testsubstraten erzielt werden.*

Mathieu Brulé ist Doktorand, Dr. Andreas Lemmer ist wissenschaftlicher Mitarbeiter und Dr. Hans Oechsner ist Leiter der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim, Garbenstraße 9, 70599 Stuttgart; e-mail: [mathieu.brule@uni-hohenheim.de](mailto:mathieu.brule@uni-hohenheim.de). Die Promotion von Mathieu Brulé betreut Prof. Dr. Thomas Jungbluth am Institut für Agrartechnik der Universität Hohenheim. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Ulrike Schimpf durchgeführt. Sie ist Doktorandin am Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte (IASP) an der Humboldt-Universität zu Berlin; e-mail: [ulrike.schimpf@agr.ar.hu-berlin.de](mailto:ulrike.schimpf@agr.ar.hu-berlin.de)

## Schlüsselwörter

Biogas, Enzyme, Methanertrag, Fasern, Lignozellulose

## Keywords

Biogas, enzymes, methane yield, fibres, lignocellulose

## Literatur

Literaturhinweise finden sich unter LT 08320 über Internet [www.landtechnik-net.de/literatur.htm](http://www.landtechnik-net.de/literatur.htm)

In Deutschland setzt sich bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen zunehmend die Kofermentation von Gülle mit nachwachsenden Rohstoffen durch. Die als Rohstoff dienenden Energiepflanzen enthalten schwer abbaubare Fasern. Diese bestehen hauptsächlich aus Zellulose, Hemizellulose und Lignin, welche durch anaerobe Bakterien nur langsam oder nur partiell abgebaut werden können. Faserspaltende Enzymzusätze werden in einigen landwirtschaftlichen Biogasanlagen eingesetzt, um höhere Methanausbeuten aus Energiepflanzen zu erzielen oder deren Abbau zu beschleunigen.

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde die Wirkung kommerzieller zellulose-, xylan- und ligninspaltender Enzympräparate auf den Methanertrag bei der anaeroben Vergärung von Roggensilage durch diskontinuierliche Gärversuche in Laborfermentern überprüft.

## Material und Methoden

Roggen der Sorte Vitalis wurde am 28. Juni 2006 in Dolgeln geerntet. Die auf eine Häcksellänge von ~ 8 mm geschnittenen Pflanzen wurden am IASP in Weckgläser einsiliert und für 450 Tage bei Raumtemperatur gelagert.

Diskontinuierliche Gärversuche zur Bestimmung des Methanertragspotenzials von Roggensilage wurden nach den Vorschriften der VDI Richtlinie 4630 und DIN 38414, Teil 8 [1, 2] durchgeführt. Für jede Variante wurden drei Wiederholungen angesetzt. Die

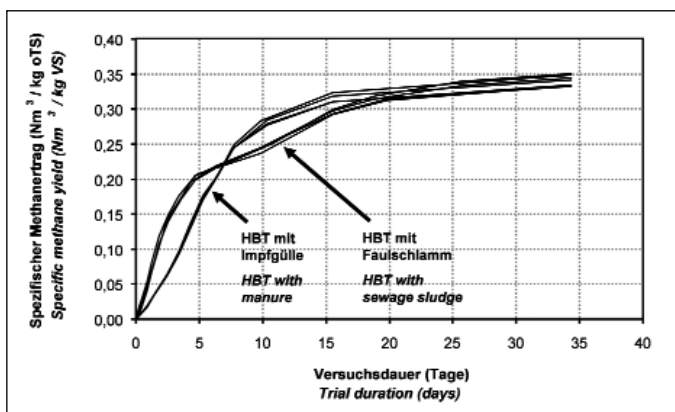
Vergärung erfolgte bei 37°C über eine Verweildauer von 35 Tagen.

Als Batchverfahren wurde der Hohenheimer Biogasertragstest (HBT) [3] angewandt. Um die Entnahme von repräsentativen Proben aus dem Testsubstrat zu gewährleisten, wurde die Roggensilage vor dem Einsatz im HBT-Verfahren auf 2 mm zerkleinert. Die Fermenter wurden beim Start des Gärversuches mit 1 g frischer, zerkleinerter Roggensilage und 30 g flüssigem Impfmateriale befüllt.

Um den Einfluss des Inokulums auf die Gasbildung bestimmen zu können, wurde im Rahmen der hier vorgestellten Versuche neben dem Standardinokulum der Landesanstalt („Impfgülle“) bei allen Varianten zum Vergleich Faulschlamm als Ausgangssubstrat verwendet. Der Faulschlamm (Kläranlage Wansdorf) wurde durch das IASP zur Verfügung gestellt und vor dem Versuchsansatz neun Tage bei Raumtemperatur ausgefault, um die Eigengasbildung zu reduzieren. Das Standardinokulum der Landesanstalt wird in einem Fermenter im Biogaslabor der Universität Hohenheim eigens für die Batch-Versuche kultiviert. Eine tägliche Fütterung mit einer Mischung aus Rindergülle, Mais-silage, Getreide, Rapsöl und Sojaextraktions-schrot (C:N - Verhältnis der Mischung 27:1) und eine Raumbelastung von 0,5 kg oTS/m<sup>3</sup>·d gewährleisten eine ausreichend aktive und breit adaptierte Bakterienpopulation bei gleichzeitig geringer Eigengasbildung.

*Bild 1: Verlauf der aufsummierten Methanbildung aller Varianten von Roggensilage mit und ohne Enzymzugabe – jeweils Mittelwerte aus drei Wiederholungen*

*Fig. 1: Curves of cumulated methane production of all rye silage variants with and without enzyme additives – average values from three repetitions*



Beschreibung der Variante Sample description	Spezifische Methanerträge (Nm <sup>3</sup> / kg oTS) Specific methane yields (Nm <sup>3</sup> / kg VS)		Standardabweichung der Wiederholungen (%) Standard deviation of the replicates (%)	
	HBT mit Impfgülle HBT with manure inoculums	HBT mit Impfschlamm HBT with sewage sludge inoculums	HBT mit Impfgülle HBT with manure inoculums	HBT mit Impfschlamm HBT with sewage sludge inoculums
Impfgülle / Inoculums	0,020	0,087	0,4	1,8
RS Kontrolle / control	0,341	0,332	0,6	1,2
RS + P	0,333	0,344	2,4	3,4
RS + P + L	0,334	0,339	3,1	0,6
RS + C + P + L	0,335	0,334	2,1	2,4
RS + C + P + L 100-fache Dosierung 100-fold concentration	0,349	0,350	2,0	3,1

Tab. 1: Spezifische Methanerträge von Roggensilage mit und ohne Enzymzusatz; Endwerte nach 35 Tagen der Vergärung bei 37 °C; Mittelwerte aus drei Wiederholungen; RS = Roggensilage, C = Cellulase, P = Pektinase, L = Laccase

Table 1: Specific methane yields of rye silage; final values after 35 days of digestion at 37°C; average values of three repetitions; RS = rye silage, C = cellulase, P = pectinase, L = laccase

### Eingesetzte Enzympräparate

Im Rahmen der Versuche wurden drei kommerzielle, aus Pilzen extrahierte Enzympräparate (C, P und L) auf Roggensilage (RS) getestet. Präparat C ist eine Cellulase aus *Trichoderma reesei*. Präparat P ist eine Pektinase aus *Aspergillus niger* und *Trichoderma longibrachiatum*. Präparat L ist eine Laccase aus *Trametes sp.*, welche Ligninverbindungen aufschließen soll.

Die Enzympräparate wurden in verschiedenen Kombinationen untersucht: Pektinase (P), Pektinase mit Laccase (P+L), Cellulase mit Pektinase und Laccase (C+P+L). Jedes Präparat wurde mit einer Dosierung von 0,07 g/kg Frischmasse Roggensilage (0,16 g/kg Trockenmasse) zugesetzt. Dies entspricht der von Enzymanbietern empfohlenen Dosierung. Zusätzlich wurde eine Variante mit 100-facher Dosierung untersucht (7 g/kg Frischmasse). Die Zugabe der Enzymmischungen erfolgte einmalig beim Start der Batchversuche jeweils vor dem Schließen der Fermenter. Dazu wurde 1 ml des verdünnten Enzympräparates der Mischung aus Roggensilage und Inokulum zugesetzt.

### Substratzusammensetzung

Die biochemische Zusammensetzung der Roggensilage wurde nach der Weender- und Van Soest-Analyse [4] bestimmt. Die Gehalte betragen in Bezug auf die Trockenmasse: NfE 44,14 %, Rohprotein (RP) 9,29 %, Rohfett (RL) 2,36 %, NDF (Zellulose + Hemicellulose + Lignin) 61,37 %, ADF (Zellulose + Lignin) 37,59 %, ADL (Lignin) 5,63 %.

Die flüchtigen Inhaltsstoffe der Silage wurden anhand von HPLC-Untersuchungen ermittelt [5]. Es wurden in der Trockensubstanz 3,9 % Milchsäure und 0,8 % Essigsäure gemessen.

Den Verlust der flüchtigen Inhaltsstoffe bei der Erfassung des organischen Trockensubstanzgehaltes (oTS) könnte je nach Substrat zu einer wesentlichen Verfälschung der oTS-Bezugsgröße der spezifischen Methanerträge führen [6]. Um dies zu vermeiden, wurde bei diesem Versuch zur Korrektur des Trockensubstanzgehaltes die Formel von Weißbach und Kuhla [7] angewendet. Wegen des sehr trockenen Zustands der Silage (TS-Gehalt 43 %) sowie der geringen Anteile an flüchtigen Substanzen, ergab sich nach der Schätzformel ein oTS-Verlust während der Trocknung von lediglich 2,2 %.

### Ergebnisse der Gärversuche

Die Verläufe der aufsummierten Methanbildung aller Varianten der Roggensilage beim HBT-Verfahren mit den zwei unterschiedlichen Impfmateriale sind in *Bild 1* dargestellt (Mittelwerte der Wiederholungen). Die Methanbildungskurven beim HBT-Verfahren zeigen je nach Art des verwendeten Inokulums (Impfgülle oder Impfschlamm) unterschiedliche Verläufe. Jedoch sind nach rund 20 Tagen keine wesentlichen Differenzen mehr zu erkennen.

In *Tabelle 1* sind die Norm-Methanerträge von Roggensilage nach einer Verweilzeit von 35 Tagen dargestellt. Durch einen Student-Test (T-test) der Methanausbeuten konnte bei keiner Variante ein signifikanter Unterschied ( $P < 0,01$ ) gegenüber der en-

zymfreien Variante festgestellt werden. Die Standardabweichungen der Methanerträge der Wiederholungen lagen bei der Roggensilage mit dem HBT-Verfahren zwischen 0,6 und 3,4 %.

### Diskussion

Im Rahmen der Untersuchungen konnte durch die Enzymzugabe weder eine signifikante Ertragssteigerung noch eine deutliche Auswirkung auf die Gasbildungsgeschwindigkeit gemessen werden. Diese Ergebnisse bestätigen damit frühere Untersuchungen der Universität Hohenheim, bei denen lediglich eine geringe Wirkung von faserspaltenden Enzymzusätzen bei der Vergärung von fein gehäckseltem Mais beim Einsatz im HBT-Verfahren nachgewiesen wurde [8].

Auch von der Wahl des Impfmateriale gingen nur geringe Einflüsse auf die Ergebnisse der Versuche aus. Obwohl nicht nur der pH-Wert der Impfgülle höher war als der des Faulschlammes (8,3 statt 7,8), sondern auch der Ligningehalt (~ 15 % statt ~ 5 % der TS), beschrieben als ADL, wurde lediglich die Kinetik der Gasbildung durch die unterschiedlichen Inokula beeinflusst. Nach Literaturangaben können höhere pH-Werte [9] und höhere Ligningehalte [10] die Enzymwirkung negativ beeinflussen. Dies konnte in den Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Es ist daher davon auszugehen, dass die bei den aktuellen Versuchen verwendeten Inokula beim Versuchsstart eine zum Abbau der zugeführten organischen Masse ausreichende Enzymaktivität aufwiesen. Durch die Enzymzugabe zu Beginn der Versuche konnte daher keine Ertragssteigerung erreicht werden. Der schwer vergärbare Anteil des Substrates wird im Batchverfahren jedoch erst am Ende des Gärverlaufes abgebaut; Mikroorganismen bevorzugen zunächst leicht abbaubare Rohstoffe (Säure, Stärke, Eiweiß, Fett). Da Enzyme als biologisch abbaubare Proteine eine begrenzte Lebensdauer im Fermenter aufweisen [11], könnte statt der frühen Enzymzugabe am Anfang des Gärprozesses eine spätere Zugabe (während der Vergärung) effizienter wirken. Diese Hypothese wird derzeit in weiteren Versuchen überprüft.

Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen wurden in früheren Publikationen des IASP vergleichbare Gärversuche unter Einsatz des Eudiometerverfahrens beschrieben. Bei gleichem Substrat und unter ähnlichen Gärbedingungen wurden bei diesen früheren Versuchen Methanertragssteigerungen von 1,0 bis zu 12,2 % erzielt [12]. Mit den derzeit vorliegenden Daten kann die Ursache dieser Ergebnisdivergenz nicht hinreichend gesichert erklärt werden.

## Literatur

- [1] VDI-Gesellschaft Energietechnik, Düsseldorf:  
VDI-Richtlinie 4630: Vergärung organischer  
Stoffe, ICS 13.030; 27.220, 2006
- [2] Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-,  
Abwasser- und Schlammuntersuchung, Gruppe  
S - Schlamm und Sedimente: Bestimmung des  
Faulverhaltens, DIN 38414, Teil 8, 1985
- [3] Helffrich, D., und H. Oechsner: Hohenheimer  
Biogasertragstest - Vergleich verschiedener  
Laborverfahren zur Vergärung von Biomasse.  
Landtechnik 58 (2003), H.3, S. 148 – 149 und  
Agrartechnische Forschung 9 (2003), H. 1,  
S. 27-30
- [4] Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis :  
Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent  
Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in  
Relation to Animal Nutrition. Journal of Dairy  
Science 74 (1991), pp. 3583-3597
- [5] Siegfried, R., H. Rückemann und G. Stumpf: Eine  
HPLC Methode zur Bestimmung organischer  
Säuren in Silagen. Landwirtschaftliche For-  
schung 37 (1984), S. 298-303
- [6] Mukengele, M., und H. Oechsner: Einfluss der  
Silierung auf den spezifischen Methanertrag bei  
Mais. Landtechnik 62 (2007), H. 1, S. 20-21
- [7] Weißbach, F., und S. Kuhla: Stoffverluste bei der  
Bestimmung des Trockenmassegehaltes von  
Silagen und Grünfütter: entstehende Fehler und  
Möglichkeiten der Korrektur. Übersichten zur  
Tierernährung 23 (1995), H. 2, S. 189-214
- [8] Brulé, M., H. Oechsner, L. Fischer, A. Lemmer und T.  
Jungbluth: Einfluss der enzymatischen Sub-  
strataufbereitung auf den Biogasertrag von  
Energiepflanzen. Landtechnik 62 (2007), H. 6,  
S. 414-415
- [9] Adney, W.S., C.J. Rivard, S.A. Ming and M.E. Himmel :  
Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass  
and wastes. Cellulases and related enzymes.  
Applied Biochemistry and Biotechnology - Part  
A. Enzyme Engineering and Biotechnology 30  
(1991), pp. 165-183
- [10] Berlin, A., M. Balakshin, N. Gilkes, J. Kadla, V.  
Maximenko, S. Kubo and J. Saddler: Inhibition of  
cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities  
by softwood lignin preparations. Journal of  
Biotechnology 125 (2006), pp. 198-209
- [11] Morgavi, D.P., K.A. Beauchemin, V.L. Nsereko, L.M.  
Rode, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, Y. Wang and W.Z.  
Yang: Resistance of feed enzymes to proteolytic  
inactivation by rumen microorganisms and  
gastrointestinal proteases. J. Anim Sci. 79 (2001),  
pp. 1621-1630
- [12] Schimpf, U.: Interner Zwischenbericht des  
Forschungsvorhabens „Untersuchungen zum  
Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung von  
Biogas Crops auf die Prozesskette der Methan-  
gasgewinnung“, Bericht Juli - November 2007