

Anca Vintiloiu, Mathieu Brulé, Andreas Lemmer, Hans Oechsner und Thomas Jungbluth, sowie Stefana Jurcoane und Florentina Israel-Roming

Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Aktivität von Enzymen im Biogasprozess

In landwirtschaftlichen Biogasanlagen werden oft Enzymzusätze eingesetzt, um den Abbau der pflanzlichen Fasern (z.B. Zellulose und Hemi-Zellulose) zu beschleunigen und dadurch den Biogasertrag zu erhöhen. Die Wirkung dieser Enzymzusätze wurde jedoch unter Laborbedingungen nur unausreichend getestet. Um die Faktoren, die die Enzymaktivität beeinflussen, systematisch zu untersuchen wurden an der Universität Hohenheim Versuche zur enzymatischen Hydrolyse von Maisstroh durchgeführt. Dadurch sollte die Wirkung kommerzieller Enzymzusätze unter kontrollierten Bedingungen außerhalb des Biogasverfahrens überprüft werden.

Schlüsselwörter

Biogas, Enzyme, Energiepflanzen, Hydrolyse

Key words

Biogas, enzymes, energy crops, hydrolysis

Abstract

Vintiloiu, A.; Brulé, M.; Lemmer, A.; Oechsner, H.; Jungbluth, T.; Jurcoane, S.; Israel-Roming, F.

Influence of temperature and pH value on enzyme activity in the biogas process

Landtechnik 64(2009), no. 1, pp. 22 – 24, 2 figures, 2 tables, 13 references

Enzyme additions are often used in biogas plants, to increase the degradation of polysaccharides and the biogas yield. So far, the effect of these commercial enzymes was only insufficiently tested. The University of Hohenheim conducted enzymatic hydrolyses on Maize straw to test their activity and the factors which influence it.

In Deutschland werden zahlreiche landwirtschaftliche Biogasanlagen mit einer Kofermentation aus Energiepflanzen und Gülle betrieben. Die in Energiepflanzen enthaltenen Fasern werden von den anaeroben Bakterien nur schwer bzw. langsam abgebaut. Der verbesserte Aufschluss dieser Substratfraktionen könnte den Abbaugrad und damit den Methanertrag erhöhen. Deshalb wird oft der Einsatz faserspaltender Enzympräparate im Biogasprozess empfohlen. Diese Enzyme sollen den Abbau der pflanzlichen Faserbestandteile beschleunigen und dadurch den Biogasertrag aus Energiepflanzen erhöhen, indem sie Polysaccharide zu löslichen Zuckern abbauen. Die tatsächliche Wirkung dieser Enzymzusätze auf das pflanzliche Substrat wurde von verschiedenen Forschergruppen in Gärversuchen mit widersprüchlichen Ergebnissen getestet [1, 2, 3]. Im Biogasprozess

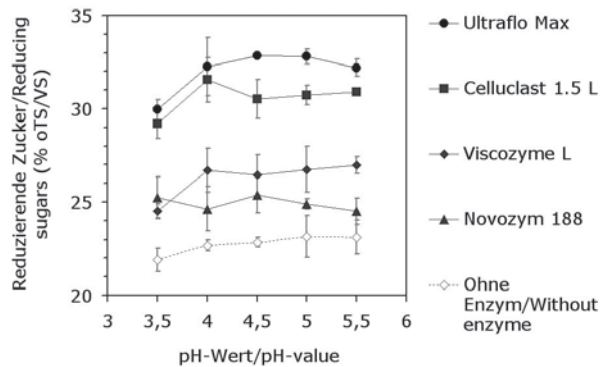
laufen viele biochemische Vorgänge ab, die das Überprüfen der Wirksamkeit der Enzyme erschwert.

Tab. 1

Enzymname Enzyme name	Hauptaktivität Main activity	Mikroorganismen Microorganisms	Anwendung Application	Temperatur- optimum (°C) Temperature optimum (°C)	pH- Optimum bzw. pH- Bereich pH optimum / pH area
Celluclast 1.5L	Zellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	Lebensmittel	65	5
Novozym 188	Zellobiase	<i>Aspergillus niger</i>	Lebensmittel	55	5,5
Novozym 342	Zellulase	<i>Humicola sp.</i>	Textil	40 - 65	7,5
UltrafloMax	β – Glucanase, Xylanase	keine Angabe	Bierfiltrierung	55°C	4,5 - 6,5
Viscozyme L	Arabinase, Zellulase, Hemizellulase, Xylanase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Lebensmittel	25 - 55	3,3 – 5,5

Aktivitäten und Eigenschaften der getesteten Enzyme (Quelle: Novozymes – Product Sheet)
Table 1: Activities and properties of the tested enzymes (Source: Novozymes – Product Sheet)

Bild 1



Reduzierende Zucker nach 24-stündiger Hydrolyse von Maisstroh bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 3,5 und 5,5; Untersuchung im Wasserbad bei 50 °C

Fig. 1: Reducing sugar release after 24 hours of maize straw hydrolysis at different pH values between 3,5 and 5,5; trial in water bath at 50 °C

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurde die Wirkung kommerzieller Enzympräparate auf den Abbau von Zellulose und Hemi-Zellulose aus Maisstroh unter definierten Bedingungen außerhalb des Biogasverfahrens überprüft. Dabei wurde in zwei Versuchsreihen der Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die enzymatische Hydrolyse untersucht. Als Indikator der Enzymwirkung wurde die Freisetzung von löslichen Zuckern während der enzymatischen Hydrolyse im Wassermilchmedium anhand einer photometrischen Methode erfasst.

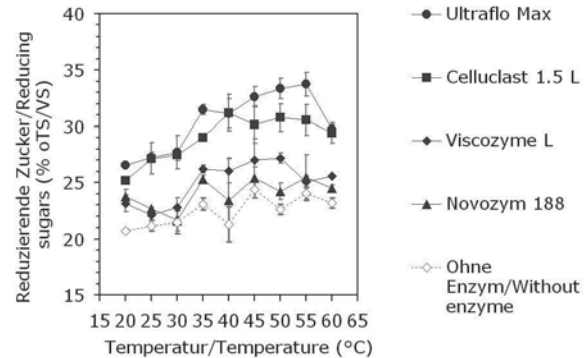
Material und Methoden

Als Substrat für die Untersuchungen diente Mais der Sorte Gavott, der nach der Ernte im Stadium der Milchreife in zwei Fraktionen (Maiskolben und Maisstroh) aufgeteilt wurde. Die Kolbenfraktion wies einen hohen Gehalt an Stärke und löslichen Zuckern auf. Im Gegensatz dazu war der Anteil der schwer abbaubaren Fraktionen (vor allem Zellulose und Hemi-Zellulose) in der Maisrestpflanze (Maisstroh) relativ hoch. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden ausschließlich mit den faserreichen Restpflanzen durchgeführt.

Die Maisrestpflanze wurde gemörsert (Faserlänge < 3 mm) und bis zum Versuchseinsatz eingefroren. Die eingesetzten Enzyme wurden von der Firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark bereitgestellt. Die Enzyme, sowie ihre Eigenschaften und die Herstellerangaben, sind in der **Tabelle 1** dargestellt. Die Zugabemenge der Enzympräparate war bei allen Versuchen auf 3 % Enzymlösung bezogen und auf die zugeführte organische Trockenmasse (oTS) des Substrates eingestellt.

Die enzymatische Hydrolyse wurde in einem Schüttel-Wasserbad bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 60 rpm durchgeführt. Dabei wurden 1,8 g frisches, gemörsertes Maisstroh in Glasflaschen mit 10 mL Citratpuffer 0,1 M (pH-Bereich 3,5 bis 6) bzw. Phosphatpuffer 0,1 M (pH 7) eingebracht. Die Dauer der enzymatischen Hydrolyse wurde auf 24 Stunden eingestellt. Die Temperaturen wurden zwischen 20 und 60 °C, die pH-Werte zwischen 3,5 und 8 variiert.

Bild 2



Einfluss der Temperatur auf dem Gehalt an reduzierenden Zucker nach 24 Stunden Hydrolyse von Maisstroh bei einem pH-Wert von 4,5

Fig. 2: Effect of temperature on reducing sugars content after 24 hours hydrolysis of maize straw at pH 4,5

Während der enzymatischen Hydrolyse wurden die im Maisstroh enthaltenen Zellulose und Hemi-Zellulose Zuckerketten durch die Enzymwirkung zu löslichen Zuckern gespalten. Die gebildeten löslichen Zucker, die eine reduzierende Eigenschaft haben (reduzierende Zucker), wurden mit dem Farbreagenz 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) nach der von MILLER 1959 entwickelten Methode nachgewiesen, mit der vereinfachten Zusammensetzung der Reagenzlösung von WOOD et al. 1988. Dazu wurden die Proben nach dem Abschluss der enzymatischen Hydrolyse filtriert und in Messkolben 50-fach verdünnt. 2 mL aus dem filtrierten Probenmaterial wurden zusammen mit 3 mL DNS-Präparat in Reagenzglasern eingebracht, für genau 15 min auf einer Kochplatte bei ca. 95 °C erhitzt und sofort nach dem Kochen abgekühlt. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten zur Stabilisierung der Farbbildung erfolgte die Absorbanzmessung der Proben bei einer Wellenlänge von 640 nm im Photometer (SHIMADZU UV Mini 1240 UV-VIS-Spectrophotometer).

Eine Glukose-Kalibrationskurve, mit steigenden Glukosekonzentrationen zwischen 0 und 1 g/L in 0,1 g/L Abstand, wurde zur Ermittlung der Menge an reduzierenden Zuckern mitgeführt. Die Extinktion der Glukoselösung schwankte im Bereich von 0,0 bis 0,5 und die der Messergebnisse im Bereich von 0,1 bis 0,3. In einem Vorversuch wurde der Gehalt der Enzyme an reduzierenden Zuckern analysiert. Dieser war geringer als 0,5 % bezogen auf der oTS und konnte deshalb in den Ergebnissen vernachlässigt werden.

Ergebnisse der Laborversuche

In einer ersten Versuchsreihe wurde der pH-Wert der Proben vor der Enzymzugabe durch den Citratpuffer auf einen Bereich zwischen 3,5 und 5,5 eingestellt. Entsprechend der Herstellerangaben sollte das Aktivitätsoptimum der meisten der untersuchten Enzyme in diesem Bereich liegen. Die Versuchstemperatur betrug 50 °C. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der **Abbildung 1** dargestellt.

Bei einer weiteren Steigerung des pH-Wertes in der enzyma-

tischen Hydrolyse kam es ab einem pH-Wert von 6 zu einer massiven Säurebildung, die den pH nach 24 Stunden um bis zu drei Einheiten senkte. Die Akkumulation von bis zu 1000 ppm Essigsäure, die bei pH 7 anhand der Analyse des Hydrolysates nachgewiesen wurde, deutete auf eine bei den höheren pH-Werten (6 und 7) verstärkte bakterielle Aktivität hin, bei der die gebildeten Zucker zu Carbonsäuren verstoffwechselt werden. Da die labortechnischen Maßnahmen zur Unterdrückung mikrobieller Aktivität (Vorerhitzung von Substrat und Medium, Tyndallisierung) keinen Erfolg zeigten, muss von einer geringen mikrobiellen Verunreinigung der Enzyme ausgegangen werden, da ausschließlich diese von der Behandlung ausgenommen waren. Für die Versuche mit dem Enzym Novozym 342 bei einem höheren pH-Wert von 7 wurde die Zugabe des toxischen Natriumazids (in einer Konzentration von 1 % bezogen auf Substrat-oTS) getestet, um die bakterielle Entwicklung zu unterdrücken. Schon in geringeren Konzentrationen bewirkt das Natriumazid das Blockieren der Atmungskette und somit das Absterben der Mikroorganismen [4]. Als Folge der Zugabe im Versuch wurde der pH-Wert stabilisiert und der Gehalt an reduzierenden Zuckern stieg von 20,85 auf 28,05% bezogen auf den Substrat-oTS an.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der pH-Wert auf 4,5 eingestellt und die Temperatur zwischen 20 und 60 °C variiert und damit der gesamte Temperaturbereich heutiger Biogasanlagen abgedeckt. Die Menge der gebildeten reduzierenden Zucker ist in der **Abbildung 2** dargestellt.

Diskussion

Der Gehalt an löslichen Zuckern des untersuchten Substrates „Maisrestpflanze“ vor dem Enzymeinsatz betrug ca. 22-23 % der oTS. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Werten [5, 6]. Die Gesamtmenge an löslichen Zuckern und Polysacchariden im Substrat betrug mehr als 80 % der organischen Trockensubstanz. Durch die enzymatische Hydrolyse konnten in allen untersuchten Varianten die Konzentrationen an löslichen Zuckerverbindungen gesteigert werden. Maximal wurden bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Prozesstemperatur von 55 °C jedoch nur 33 % der oTS in reduzierende Zucker überführt, obwohl die Kohlenhydratfraktion des Ausgangswertes wesentlich höhere Konzentrationen erwarten ließ. Gegenüber der unbehandelten Variante konnte damit der relative Anteil der reduzierenden Zucker nur um bis zu 40 % gestiegen werden, obwohl die eingesetzte Enzymkonzentration ca. 100-fach höher war, als in der Praxis [2]. Die bereits hohe Zuckerkonzentration im Medium am Anfang der enzymatischen Hydrolyse könnte eine Inhibierung der Enzymwirkung bewirkt haben [7]. Um solche Inhibierung zu vermeiden, sollten in weiteren Versuchen die im Ursprungssubstrat enthaltenen löslichen Zucker vor der enzymatischen Hydrolyse ausgewaschen werden [8].

Die optimalen pH-Werte der gängigen Enzyme pilzlichen Ursprungs liegen zwischen 4,0 und 6,0 [9]. Die Biogasgärung findet jedoch in der Praxis bei pH-Werten von 7,0 bis 8,5 statt. Es stellt sich daher die Frage, ob pilzliche Enzyme auch bei höheren pH-Werten ihre Wirkung behalten. In weiteren Untersuchungen soll

daher durch den Zusatz von Natriumazid die Aktivität von zuckerabbauenden Mikroorganismen verhindert werden, um die Versuche auch bei höheren pH-Werten durchführen zu können.

Die getesteten Enzyme waren auch bei den üblichen Temperaturen des Biogasverfahrens von 30 bis 40°C wirksam. Jedoch wurde eine bessere Wirkung bei einer höheren Temperatur von 50°C erreicht, die mit den Herstellerempfehlungen übereinstimmt. Bei 60°C sank die Enzymaktivität. Es ist bekannt, dass Enzyme bei höheren Temperaturen eine höhere Effizienz aufweisen, jedoch bei zu hoher Temperatur inaktiviert werden [9].

Zur Steigerung der Effizienz der enzymatischen Hydrolyse sollte das pflanzliche Substrat eventuell durch eine vorgeschaltete physiko-chemischen Vorbehandlung (z.B. Vorerhitzung und Zugabe von Säure bzw. Alkali) aufbereitet werden, um die Faserstruktur zu zerstören [8]. Positive bzw. negative Interaktionen, die zwischen den zugefügten Enzymen und lebenden Mikroorganismen stattfinden und die Enzymwirkung im Biogasprozess beeinflussen, können eine große Rolle spielen und sollten daher weiterführend untersucht werden.

Literatur

- [1] Amon, T., Hopfner-Sixt, K., Amon, B., Kryvoruchko, V. und V. Bodiroza: Biogaserzeugung aus Energiepflanzen: Einfluss der Sorte, des Erntezeitpunktes, der Vorbehandlung, der Konservierung und von Zusätzen auf den Methanertrag, 2005, Mitteldeutscher Bioenergieatg, Leipzig
- [2] Kaiser, F.: Untersuchung der Wirkung von MethaPlus S100 auf die Vergärung von Maissilage im Laborfermenter, 2004, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
- [3] Telschow, D., Mielke, A.: Enzyme beschleunigen Vergärung - Einsatz von Vergärungsverfahren zur Energiegewinnung in der Abfallbehandlung, 2007, WLB Wasser Luft Boden 10 S. 72-74
- [4] Forget, A., Fredette, V., Sodium Azide Selective Medium for the Primary Isolation of Anaerobic Bacteria, 1962, J. Bacteriol 89, S. 1217-1223
- [5] Chen, S-F., Mowery, R.A., Scarlata, C.J., Chambliss, C.K.: Compositional Analysis of Water Soluble Materials in Corn Stover, 2007, Journal of Agricultural and Food Chemistry (55) S. 5912-5918
- [6] Sun, Y., Cheng, J.: Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review, 2002, Bioresource Technology 83(1) S.1-11
- [7] Zhang, Y-HP., Lynd, L.R.: Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed cellulase systems, 2004, Biotechnology and Bioengineering 88(7) S. 797-824.
- [8] Lu, Y., Mosier, N.S.: Biomimetic Catalysis for Hemicellulose Hydrolysis in Corn Stover, 2007, Biotechnol. Prog. 23(1) S. 116-123
- [9] Durand, H., Soucaille, P., Tiraby, G.: Comparative Study of Cellulases and Hemicellulases from four Fungi: Mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and Thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*, 1984, Enzyme and Microbial Technology 6(4) S. 175-180
- [10] Miller, G.L.: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, 1959, Anal. Chem. 31(3) S. 426-428
- [11] Wood, T.M., Bhat, K.M., Willis, A., Wa, S.T.K.: Methods for Measuring Cellulase Activities. Methods in Enzymology, 1988, Academic Press S. 87-112

Autoren

Anca Vintiloiu und **Mathieu Brulé** sind Doktoranden, **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. **Prof. Dr. Thomas Jungbluth** ist Leiter des Fachgebietes Verfahrenstechnik der Tierhaltungssysteme des Instituts für Agrartechnik der Universität Hohenheim. E-Mail: a.vintiloiu@uni-hohenheim.de

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit **Prof. Dr. Stefana Jurcoane**, Leiterin des Microbial Biotechnological Centers an der Universität Bucharest, und mit **Dr. Florentina Israel-Roming** vom Center of Research for Applied Biochemistry and Biotechnology, Bucharest durchgeführt.