

# Kohlenhydratanalyse beim Gärprozess mit einer angepassten Anthron-Methode

Manfred Greger, Markus Schlienz, Patricia C. Benito Martin

Zur Bestimmung des Abbaus von Kohlenhydraten bei der anaeroben Fermentation wurde die photometrische Anthron-Methode angepasst und für die Modellsubstrate Glucose (wasserlöslich), Mais-Stärke und mikrokristalline Cellulose (beide wasserunlöslich) in mesophilen Batch-Versuchen überprüft. Für die Bestimmung des Gehalts an löslichen Kohlenhydraten wurde die Probe mit einem Spritzenaufsatzfilter (Material PTFE) auf  $< 0,45 \mu\text{m}$  filtriert, um alle Partikel inklusive der partikulären Kohlenhydrate abzutrennen. Die erhaltene Lösung reagierte dann während 8 Minuten mit der Anthronlösung in einem zuvor auf  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  temperierten Heizblock. Eine rasche Abkühlung im Eiswasser auf ca.  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  Proben temperatur (Zeitdauer fünf Minuten) erwies sich als sinnvoll, um die Farbreaktion zu stoppen und insbesondere bei größerem Probenumfang mit bedingt höherem Zeitaufwand wiederholbare Ergebnisse zu erzielen. Vor der Messung der Extinktion am Photometer wurde die Probe bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten temperiert. Eine Verdünnung der Probe war notwendig, einerseits zur Reduzierung des Farbhintergrunds, andererseits um den vorgegebenen Messbereich ( $\lambda = 625 \text{ nm}$ ) von 10 bis 100 mg Glucoseäquivalent/l einzustellen.

Der Gesamtkohlenhydratanteil, der sich aus der Gesamtheit der gelösten sowie auch partikulären Fraktion zusammensetzt, wurde über eine zusätzliche, vor der Anthron-Reaktion durchgeführte Vorhydrolyse mit circa 50%igem Säureanteil an  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  und 8 Minuten Reaktionsdauer bestimmt. Dieser separate Bestimmungsschritt, nachfolgend indirekte Methode genannt, ist notwendig, um den Anteil unlöslicher bzw. polymerer Kohlenhydrate einer Probe zu bestimmen. Die Berechnung erfolgt über Differenzbildung aus dem Gesamt- zum löslichen Kohlenhydratanteil (= partikulärer Kohlenhydratanteil).

## Schlüsselwörter

Kohlenhydratbestimmung, Biogasreaktoren, Anthron-Methode, Vorhydrolyse

Die organischen Bestandteile der in Biogasanlagen verwendeten Substrate bestehen hauptsächlich aus Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten (DEUBLEIN und STEINHAUSER 2008). Bei Biomassen dominieren die Kohlenhydrate. Die Gesamtheit der Kohlenhydrate besteht aus den wasserlöslichen Monosacchariden (z. B. Glucose) und den wasserunlöslichen Polysacchariden (z. B. Stärke, Zellulose). Für die Untersuchung des Substratabbaus in Biogasreaktoren ist es wichtig, die Geschwindigkeit der Umsetzung der einzelnen Kohlenhydratfraktionen zu kennen. Eigene unveröffentlichte Untersuchungen zeigten, dass die Methode der Futtermittelanalyse nicht für die Bestimmung des Kohlenhydratabbaus während des Fermentationsprozesses geeignet war. In einer Literaturrecherche (GRANDY et al. 2000, LOEWUS 1952, MASUKO et al. 2005, SLUITER et al. 2010, VILES und SILVERMAN 1949, YAN 2014, YEMM und WILLIS 1954) wurden mehrere Methoden zur Kohlenhydratbestimmung, jedoch für andere Anwendungen, gefunden.

eingereicht 21. Dezember 2017 | akzeptiert 19. Juni 2018 | veröffentlicht 25. Juli 2018

© 2018 bei den Autoren. Dieser Open-Access-Artikel steht unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Eine Anpassung der photometrischen Anthron-Methode auf die Untersuchung des Abbaus von Kohlenhydraten in Bioreaktoren erschien vielversprechend und wird im Folgenden vorgestellt. Darin werden die im Wasser gelösten Saccharide mit der sogenannten Anthron-Methode (mit Glucose als Standard und destilliertem Wasser als Referenz) bestimmt. Dies geschieht mit den löslichen Monosacchariden (sCH) ohne Zwischenschritt nach geeigneter Verdünnung der Lösung. Liegen in der Probe unlösliche Polysaccharide vor (partikuläre Kohlenhydrate), werden diese einer Vorhydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure unterzogen.

Durch Hydrolyse werden diese gelöst und können analog der gelösten Fraktion bestimmt werden. Der über diesen separaten Schritt erhaltene Kohlenhydratanteil entspricht somit der Gesamtkohlenhydratkonzentration (tCH), da die löslichen Bestandteile miterfasst werden. Über Differenzbildung mit der gelösten Fraktion (sCH) kann der partikulär gebundene Kohlenhydratanteil einer Probe ( $pCH = tCH - sCH$ ) ermittelt werden.

### Anthron-Methode, Eichkurve mit wässriger Glucoselösung

Wässrige Glucoselösungen (Glucosereinheit > 99,5 %, Sigma Aldrich, USA) unterschiedlicher Verdünnung wurden mit der Anthron-Lösung (0,1 g Anthron, Reinheitsgrad > 97 %, Sigma Aldrich, USA; in 100 g konzentrierter Schwefelsäure) vermischt (0,5 ml Probelösung mit 1 ml Anthron-Lösung) und während 8 Minuten in einen auf 100 °C temperierten Thermoblock gestellt. Anschließend wurden die Proben im Eiswasserbad auf 4 °C abgekühlt. Nach einer Equilibrierungsdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Lösung bei 625 nm mit einem Spektrophotometer (DR 3900, Hach-Lange) gemessen. Mit den Glucoselösungen unterschiedlicher Konzentrationen und destilliertem Wasser als Referenz (Blindwert) wurde eine Eichkurve erstellt (Abbildung 1). Die so erhaltene Eichkurve zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration im Bereich 10 bis 100 mg/l und der bei 625 nm gemessenen Extinktion.

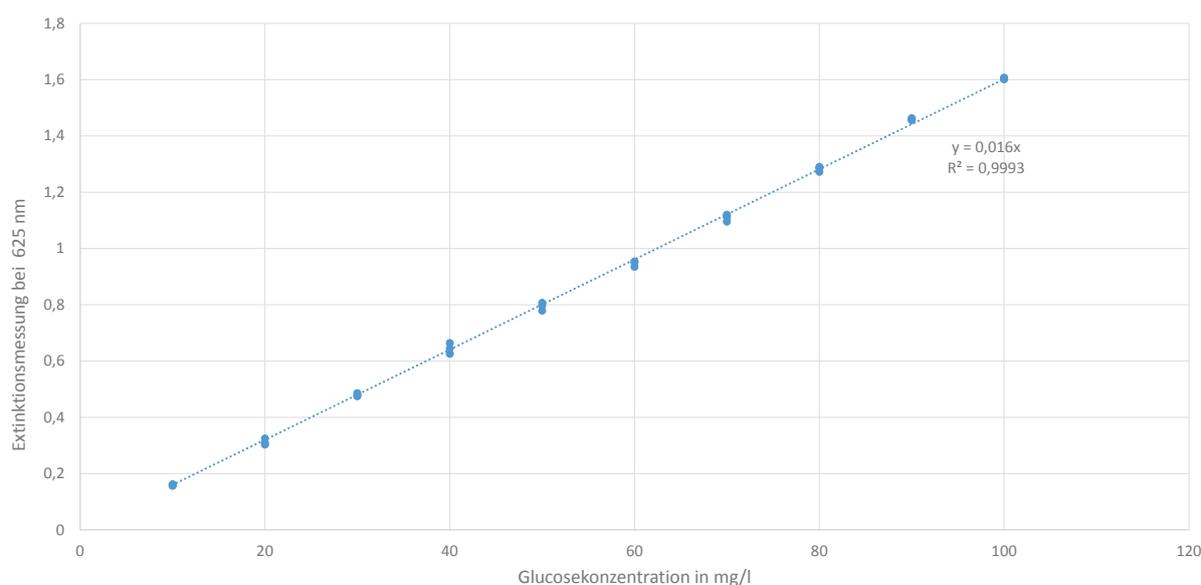


Abbildung 1: Extinktionsmessung der Glucosekonzentration im wässrigen System bei 625 nm (Eichkurve), Glucose-Ausgangskonzentration 0,1 g/l, Anthronlösung 0,1 % (w/w), Reaktionszeit 8 min bei 100 °C

### **Extinktionsmessung von Proben aus Bioreaktoren mit und ohne Anthron-Reaktion zur Bereinigung des Hintergrundes (Matrixeffekt)**

Bei der Anwendung der Methode auf Proben, die aus Biogasreaktoren stammen, ist eine Signalkorrektur aufgrund des Farbhintergrundes des Inokulums vorzunehmen. Die zumeist bräunlich ausgeprägte Farbe der Startmasse stammt zum überwiegenden Teil aus gelösten Bestandteilen bzw. Derivaten des Lignins und hat im vermessenen Wellenlängenbereich der Anthron-Methode, je nach gewählter Probenverdünnung, eine unterschiedlich ausgeprägte Extinktion. Damit Überbestimmungen von Proben vermieden werden, ist eine entsprechende Korrektur der Extinktion notwendig. Als Grundlage der Signalkorrektur dient der bei 625 nm spektrometrische Farbwert der Startmasse (Inokulum, in ursprünglichem Zustand) ohne Anthron-Reaktionsschritt und somit vor Beginn einer Fütterung unter Versuchsbedingungen. Dieser keiner Hydrolysereaktion unterliegende Farbwert wird anschließend der aus der Anthron-Reaktion gemessenen Extinktion gegenübergestellt, um die Korrelation beider Werte abzubilden.

Hierbei kann die gelöste oder die Gesamtphase des Inokulums verwendet werden, ganz in Abhängigkeit davon, welcher Substrattyp (fest/gelöst) für die Fütterung verwendet wird (Messung der partikulären oder löslichen Kohlenhydrate) bzw. von welcher Probenfraktion der Kohlenhydratgehalt ermittelt werden soll. Entsprechend dieser vorliegenden Bedingung wird für die gelöste Phase die direkte und für die partikulären Gärreste die indirekte Anthron-Methode (mit Vorhydrolyse) angewandt. Bei Zugabe von Monosacchariden erfolgt die intrazelluläre Aufnahme direkt. Somit wird bei Anwendung der direkten Anthron-Methode im Wesentlichen die Aufnahmekinetik der aktiven Biomasse über Zeitprofile bestimmt. Hingegen ist bei Zugabe partikulärer, unlöslicher Kohlenhydrate vor intrazellulärer Aufnahme des entsprechenden Substrates über Exoenzyme die Hydrolyse vorgeschaltet. Die im Reaktor verbleibende suspendierte Stoffkonzentration muss hierbei über den Schritt der Vorhydrolyse bestimmt werden. Misst man unter diesen Gegebenheiten die Menge des gelösten Kohlenhydratanteils einer Probe, so ist festzustellen, dass sich diese mehr oder weniger konstant über den gesamten Probenahmezeitraum um eine Basislinie bewegt. Dies spricht dafür, dass die über die Exoenzyme gespaltenen Substanzen unverzüglich von der Biomasse aufgenommen und der Kontakt zwischen hydrolysierenden Bakterien und Substrat folglich unmittelbar an der partikulären Grenzfläche verläuft.

Abbildung 2 zeigt den Zusammenhang zwischen Extinktion und Verdünnung der gelösten Fraktion eines Inokulums, welches als Startmasse für eine kontinuierlich betriebene Biogasanlage verwendet wurde, ohne (untere Kurve) und mit Anthron-Reaktion (obere Kurve) bei einer Wellenlänge von 625 nm. Das Inokulum wurde zunächst zentrifugiert, auf  $< 0,45 \mu\text{m}$  filtriert und anschließend die hergestellte gelöste Phase auf ein Verhältnis von 1 : 3 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von der gelösten Phase des Inokulums wurden anschließend in Polystyrol-Küvetten (alternativ Quarzglas-küvetten) verschiedene Verdünnungsreihen angesetzt und deren Farbhintergrund bei der Wellenlänge 625 nm photometrisch vermessen (untere Kurve in Abbildung 2).

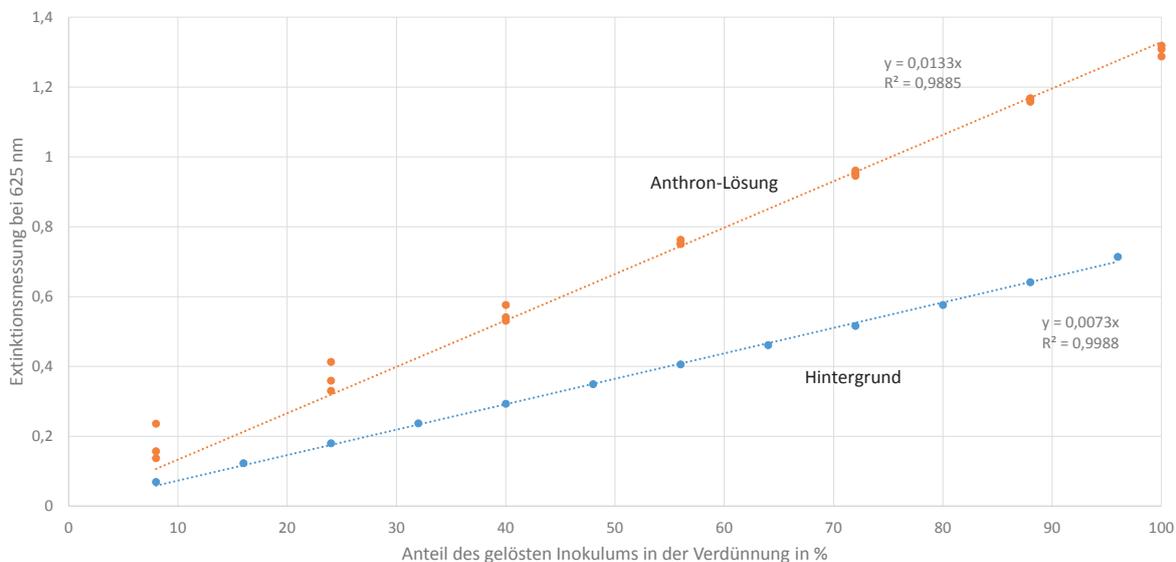


Abbildung 2: Gemessene Extinktion für 625 nm als Funktion der Verdünnung des Filtrats (Inokulum) im Bereich 1 (100 %) bis 1:12,5 (8 %) ohne (untere Kurve, Hintergrund) und mit (obere Kurve) Anthron-Reaktion. Reaktionszeit: 8 min bei 100 °C Heiztemperatur.

Abbildung 3 setzt die bei identischen Verdünnungsschritten gemessenen Extinktionen beider Kurven ins Verhältnis.

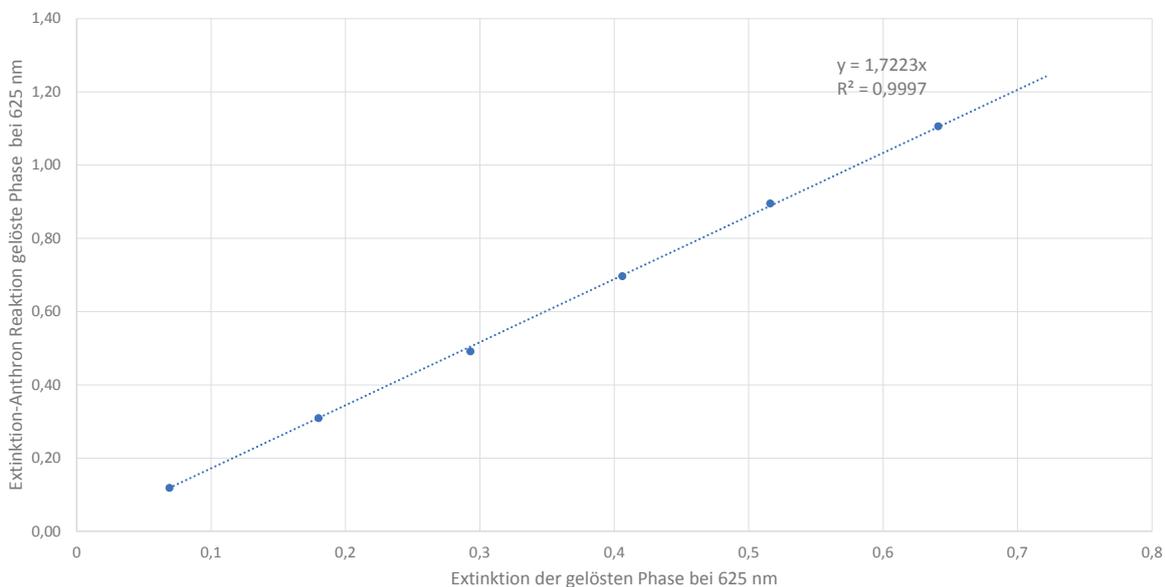


Abbildung 3: Verhältnis der Extinktion der Anthrone-Reaktion zur gelösten Phase des Hintergrunds bei identischer Verdünnung der gelösten Phase eines Inokulums

Von diesen Verdünnungen wurde nachfolgend die Anthron-Farbreaktion mit einer Reaktionszeit von 8 Minuten unter 100-°C-Temperierung im Thermoblock durchgeführt (obere gegen destilliertes Wasser korrigierte Kurve in Abbildung 2). Im Bereich der größten Verdünnung (< 25 %) gibt es eine größere systematische Abweichung zur Trendlinie, die auf die Verwendung einer anderen Pipette zur Herstellung der Verdünnungen zurückgeführt werden kann.

Die in Abbildung 3 ermittelte Geradensteigung dient bei der Bestimmung der Glucoseäquivalentkonzentration von Reaktorproben somit folglich als Faktor zur direkten Ermittlung des Hintergrundeanteils am Anthron-Extinktionswert. Dies setzt natürlich voraus, dass die Probe zur Bestimmung des Farbhintergrundes auch ohne weitere Verdünnung für die Anthron-Reaktion verwendet wird (identischer Verdünnungsgrad). Ansonsten können die Werte zur Korrektur bei nicht identischer Probenverdünnung auch über Interpolation der Geradenpaare aus Abbildung 2 ermittelt werden.

Folgende Bedingungen haben einen Einfluss auf das Messergebnis der Anthron-Farbreaktion und wurden bei den dargestellten Ergebnissen berücksichtigt:

- Reaktionszeit mit Anthron-Reagenz: Das Extinktionsmaximum wird nach 6–8 min. erreicht. Die Zeit von 8 Minuten wird für die Anthron-Reaktion weiterhin angewandt.
- Kühlung: Kühlung der Mischung nach Zusammenführung der Anthron-Lösung mit der Probe im Eiswasserbad auf 4 °C (vor dem Aufheizen auf 100 °C für die Anthron-Reaktion) sowie Kühlung nach der Anthron-Reaktion im Eiswasserbad auf 4 °C (5 min) und 30-minütiges Temperieren bei Raumtemperatur vor Extinktionsmessung am Spektrometer (625 nm).
- Langzeitstabilität der Extinktion nach Anthron-Reaktionsschritt: Bei lichtgeschützter Lagerung der Probe bei Raumtemperatur wird nach 7 h ein linearer Abfall des Messsignals auf 95 % bezogen auf dessen Startwert beobachtet. Die Proben sind demnach innerhalb eines Tages zu messen.

Die Validität der Messmethode wurde des Weiteren damit überprüft, dass Proben mit definierter Konzentration an Glucose und Inokulum gemessen wurden (Aufstockerserie). Dabei wurde für den Konzentrationsbereich 28 bis 92 mg Glucose/l eine Abweichung < 7 % beobachtet. Für kleinere Konzentrationen stieg die Abweichung auf bis zu 40 %.

### **Messung von partikulär-gebundenen Kohlenhydraten aus Reaktorproben mit Vorhydrolyse**

Für die Bestimmung des noch unvergorenen Kohlenhydratanteils aus Bioreaktoren, welche mit Feststoffen wie beispielsweise Mais- oder Grassilagen, aber auch mit mikrokristalliner Cellulose im Versuchsmaßstab gefüttert werden, kann die direkte Methode nicht angewandt werden, da diese auf feststofffreie Probenmatrices hin ausgerichtet ist. Dadurch muss – im Gegensatz zur direkten Methode – eine Hydrolyse des partikulären Kohlenhydratanteils zwischengeschaltet und somit vom Anthron-Reaktionsschritt getrennt werden. Dies wird im Weiteren als „indirekte Methode“ bezeichnet. Durch die Vorhydrolyse in verdünnter Schwefelsäure bei erhöhter Temperatur werden die partikulär vorhandenen Kohlenhydrate in lösliche Monomere umgewandelt. Die Hydrolyse als nunmehr separater Schritt führt zu einer Erhöhung der Gesamtsäurestärke bei der Anthron-Farbreaktion und muss diesbezüglich unter Verwendung der entsprechend eingesetzten Substrate neu kalibriert werden.

In einem ersten Verfahrensschritt zur Vorhydrolyse partikulär gebundener Kohlenhydrate gilt es zunächst die Säurestärke zu definieren, bei welcher unter Berücksichtigung der eingetragenen Energie in Form von Heizdauer und Heiztemperatur eine vollständige Monomerisierung des Substrates

eintritt. Als Modellsubstrat wurde bei diesem Ansatz mikrokristalline Cellulose verwendet, da sie einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweist und aufgrund ihrer hohen spezifischen Oberfläche auch einer zügigen Hydrolyse unterliegt. Zudem lässt sich durch die zügige Monomerisierung der Cellulose der Einfluss des Energieeintrags auf die Anthron-Extinktion über die Zeit sehr gut abbilden.

Nach höheren Energieeinträgen (höhere Temperatur bzw. längere Verweilzeit) der Hydrolysate im Thermoblock wurde eine zunehmend bräunliche Verfärbung beobachtet. Diese sind vom Prozess der Karamellisierung von Zucker bei höheren Temperaturen bereits bekannt, wenn auch die chemischen Prozesse nicht vollständig aufgeklärt sind. Durch Vermessung der Hydrolysate im sichtbaren Bereich des Spektrometers wurde beim Wellenlängenscan ein Extinktionsmaximum von 325 nm festgestellt. Alle auf  $< 0,45 \mu\text{m}$  filtrierte Hydrolysate wurden anschließend bei dieser Wellenlänge vor Durchführung des Anthron-Tests vermessen, um Erkenntnisse über einen möglichen Einfluss zu erhalten.

In Abbildung 4 ist der Einfluss des Säureanteils im Vorhydrolyseschritt auf die Intensität der Braunfärbung (325 nm) dargestellt. Hierbei wurde bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (Thermoblock) die Reaktionszeit variiert. Die verwendeten Glasröhrchen mit Schraubdeckelverschluss wurden nach der Vorhydrolyse unverzüglich im Eisbad abgekühlt, und nach 30-minütiger Temperierung bei Raumtemperatur am Spektrometer gegen destilliertes Wasser als Referenz vermessen.

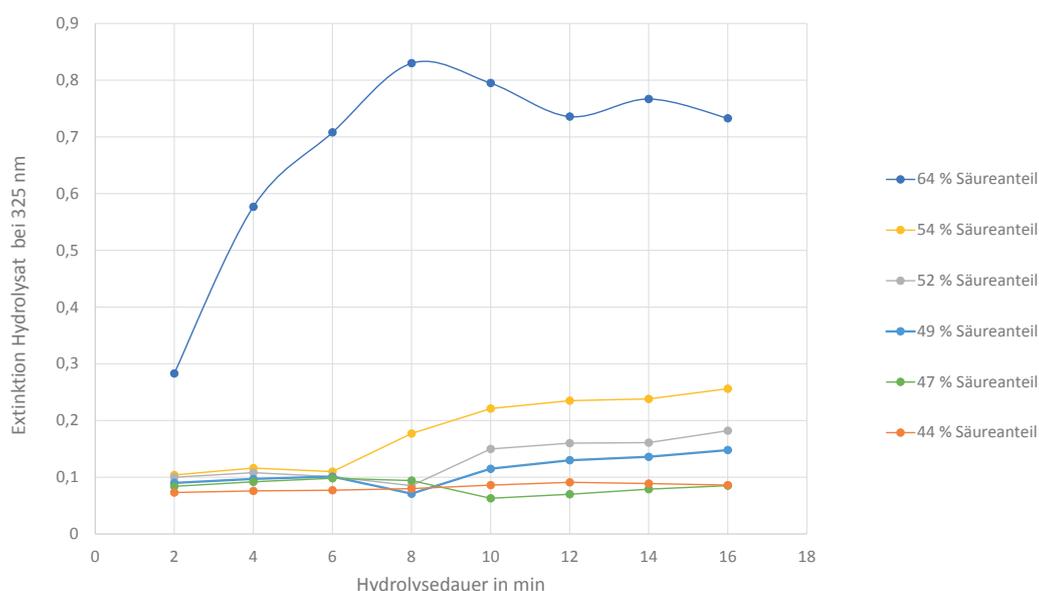


Abbildung 4: Einfluss des Säureanteils und der Hydrolysezeit bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  auf die bei 325 nm gemessene Extinktion des Vorhydrolysats

Der Intensitätsverlauf der Braunfärbung über die Zeit unterliegt deutlich abgegrenzt dem Säureanteil im Hydrolysat. Geringere Säuregehalte führen hierbei zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der Braunfärbung.

Im Folgenden wird überprüft, inwiefern diese aus dem Vorhydrolyseschritt hervorgegangene Braunfärbung einen Einfluss auf die Extinktionsmessung im nachfolgenden Anthron-Reaktionsschritt hat. Hierfür wurden die mit unterschiedlichem Säureanteil sowie verschiedenen Heizzeiten hergestellten Hydrolysate in Dreifachbestimmung der Anthron-Reaktion unterzogen. Dabei wurden jeweils  $500 \mu\text{l}$  auf  $< 0,45 \mu\text{m}$  filtrierte (mittels PTFE-Spritzenfilteraufsatz) Probenvolumen mit 1 ml

der Anthron-Lösung vermischt, bei 4 °C im Wasserbad gekühlt und dann im Thermoblock bei 100 °C die Reaktion während 8 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Proben erneut im Eisbad abgekühlt (5 Minuten) und nach 30-minütiger Temperierung bei Raumtemperatur am Spektrometer bei 625 nm vermessen. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der Extinktionsmessung, wobei hier die Gesamtsäurestärke (Vorhydrolyse plus Anthron-Reaktionsschritt) angegeben ist.

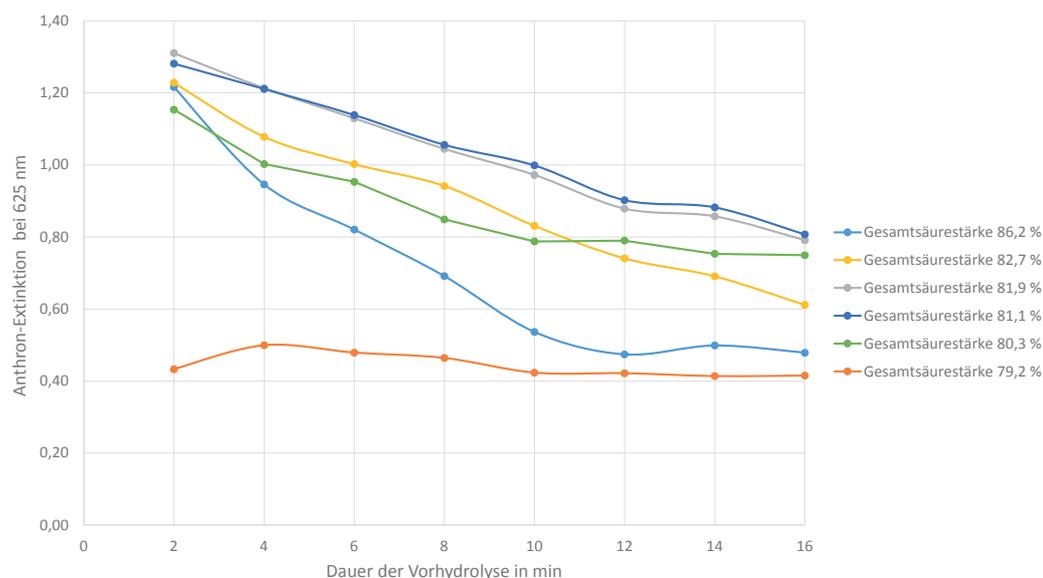


Abbildung 5: Einfluss der Säurestärke und Heizdauer der Vorhydrolyse auf die Anthron-Extinktion

Der Verlauf der Anthron-Extinktion aus den mit verschiedenen Säurestärken hergestellten Hydrolysaten verdeutlicht zwei unterschiedliche Phänomene. Über den konstanten Verlauf der Anthron-Extinktion lässt sich aus dem Hydrolysat mit der geringsten Säurestärke (44 % Säureanteil) ableiten, dass in diesem Falle eine für die Vorhydrolyse notwendige Mindestsäurestärke unterschritten wurde und es folglich zu einem hohen Anteil an Residualcellulose kam, welcher über Filtration der Hydrolysate entzogen wurde. Dieser steht für eine abschließende Hydrolyse im Anthron-Reaktionsschritt folglich nicht mehr zur Verfügung und führt im gesamten Profil zu Minderbefunden an Glucose-Äquivalenten. Ab einer Säurestärke von 47 % im Hydrolysat, welche einer Gesamtsäurestärke von 80,3 % im Anthron-Reaktionsschritt entspricht, liegen bei kürzester Vorhydrolysedauer von lediglich 2 Minuten die Anthron-Extinktionen relativ nahe beieinander (Spanne 1,15–1,28 Extinktionseinheiten). Mit zunehmender Hydrolysedauer zeigt sich nachfolgend jedoch eine deutliche, in Abhängigkeit der Gesamtsäurestärke erkennbare Signalabnahme der Extinktion. Vergleicht man den Verlauf der Braunfärbung im Hydrolysat nunmehr mit der Signalabnahme im Anthron-Reaktionsschritt, so besteht ein starker reziproker Zusammenhang beider Variablen.

Die Braunfärbung im Hydrolyseschritt kann somit als sinnvoller Kontrollparameter der Vorhydrolyse verwendet werden, um die Mindestsäurestärke im Hydrolysat sowie auch den maximal notwendigen Energieeintrag abzugleichen. Es bleibt zu berücksichtigen, dass der Verlauf der Zeitprofile substrat- und oberflächenabhängig ist. Mikrokristalline Cellulose als Modellsubstanz steht hierbei sicherlich für den Idealfall, da sie sehr feinverteilt und homogen aufgebaut ist.

### Bestimmung des Verlaufs des Kohlenhydratabbaus von Glucose, Stärke und Cellulose in mesophilen Batch-Versuchen

Es wurden bei 37 °C Batch-Versuche mit den drei Modellsubstraten Glucose (Reinheitsgrad > 99,5 %, Sigma-Aldrich, USA), Maisstärke (Maisstärke Sigma-Aldrich, USA) und mikrokristalliner Cellulose (Pharmaqualität, Euro OTC Pharma GmbH, Germany) durchgeführt und dabei die lösliche (direkt) und partikuläre Kohlenhydratkonzentration (indirekt über Vorhydrolyse) mit den oben beschriebenen Bedingungen bestimmt. Die Versuche wurden in Kunststoffreaktoren mit 0,75-l-Nettoinhalt durchgeführt. Das verwendete Inokulum hatte einen Trockensubstanz-Gehalt (TS) von 5,36 %, einen organischen Trockensubstanzgehalt-Gehalt (oTS) von 3,27 %, eine Kalkreserve von 15 g CaCO<sub>3</sub>/l und einen pH-Wert = 8,0. Die Beladung in den 3 Versuchen betrug 8 g oTS/l. Eine genaue Versuchsbeschreibung findet sich in BENITO (2015).

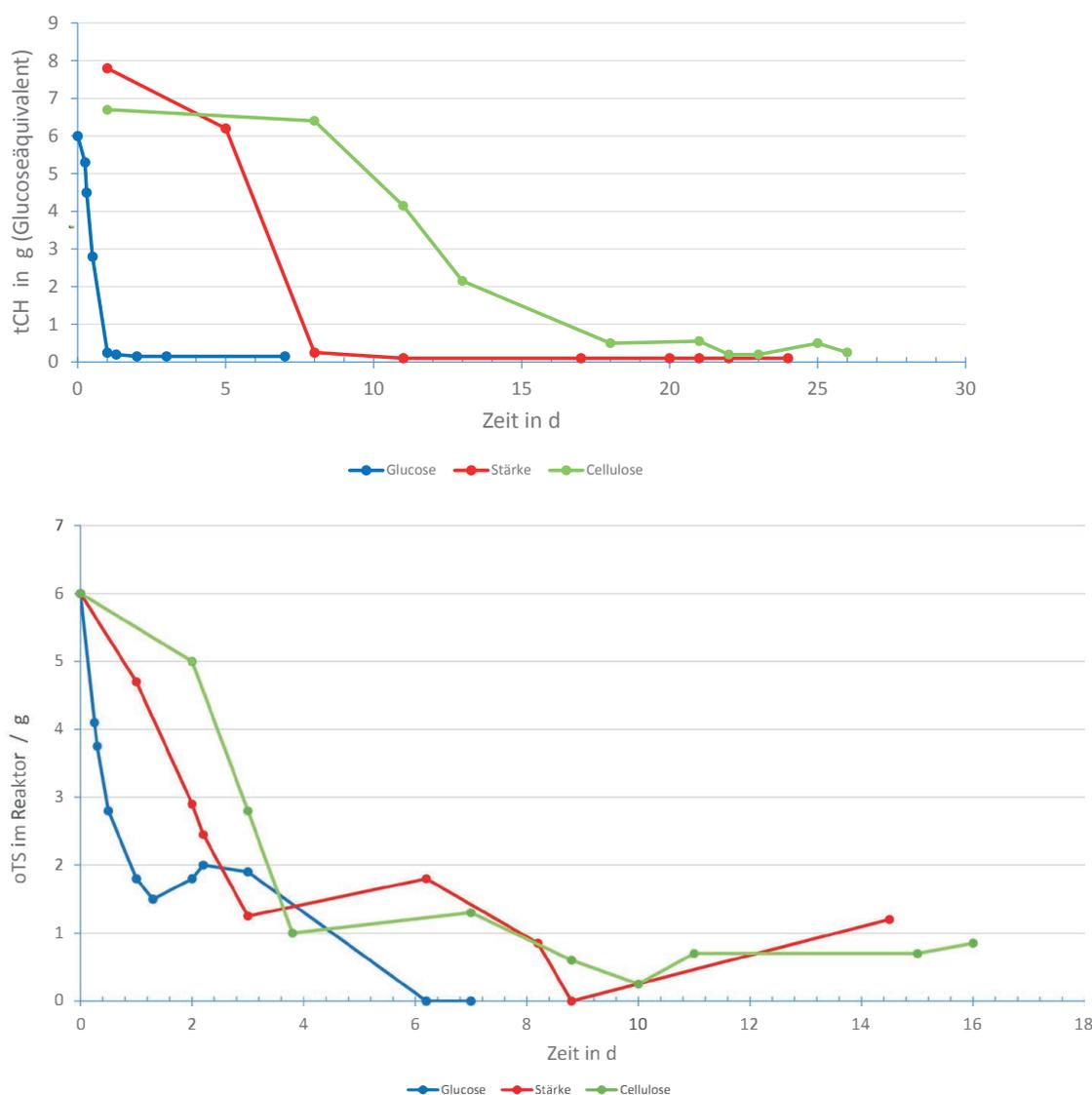


Abbildung 6: Zeitliche Veränderung der gesamten Kohlenhydratmenge (tCH in g Glucoseäquivalent dargestellt, oben) und der Menge oTS (unten) bei der Fermentation von Glucose, Maisstärke und Cellulose (Reaktor-Beladung 8 g oTS/l; Reaktorvolumen: 0,75 l; BENITO 2015).

Abbildung 6 zeigt den zeitlichen Verlauf der gesamten Kohlenhydrat-Menge (tCH) sowie den experimentell bestimmten oTS-Gehalt für die 3 Kohlenhydrate. Die Variation für kleine oTS-Gehalte (< 2 g) ist durch die Streuung bei der Probenahme erklärbar. Der Abbau der Glucose erfolgte sehr schnell und war nach einem Tag abgeschlossen (Abbildung 6 oben). Maisstärke wurde um einen Tag verzögert abgebaut, während bei Cellulose der Abbau erst nach 2 bis 4 Tagen erfolgte und schließlich nach 7 Tagen abgeschlossen war. Zu beachten ist, dass bei den Versuchen mit Maisstärke und Cellulose keine nennenswerten Konzentrationen an gelösten Monomeren, die durch die Hydrolyse entstanden waren, nachgewiesen wurden. Die Versuche wurden nach 17 Tagen beendet.

### **Bestimmung der flüchtigen Säuren und der Methanbildung zur Bilanzierung**

Für die Bilanzierung der Versuche müssen die Bildung der flüchtigen organischen Säuren, von Methan und Biogas sowie der oTS-Gehalt zum Versuchsabschluss bestimmt werden.

Abbildung 7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung der Zwischenprodukte Essigsäure und Propionsäure. Diese wurden gaschromatographisch bestimmt („FOCUS“ GC, Thermo Fisher Scientific, Italien, BENITO 2015). Andere Säuren konnten nicht nachgewiesen werden. Beim Versuch mit Glucose wird ein schneller Anstieg der Essigsäurekonzentration beobachtet, der nach ca. 20 Stunden mit 1.440 mg/l das enge Maximum überschreitet und dann nach 50 Stunden auf einen Wert < 50 mg/l abfällt. Die Propionsäure-Konzentration steigt erst etwas verzögert (6 h) steil an und erreicht erst nach ca. 44 h den Maximalwert, um danach schnell innerhalb von einem Tag auf die Nachweisgrenze abzufallen. Bei Stärke und Cellulose setzt der Konzentrationsanstieg der Essig- und Propionsäure um einen Tag verzögert ein. Im Fall der Essigsäure werden die (deutlich kleineren) Maximalwerte nach 2 Tagen erreicht und fallen nach 3 Tagen auf Werte < 50 mg/l ab. Nur im Falle der Propionsäure werden die Maxima für alle 3 Substrate nach 2 Tagen erreicht, liegen jedoch für Stärke und Cellulose tiefer.

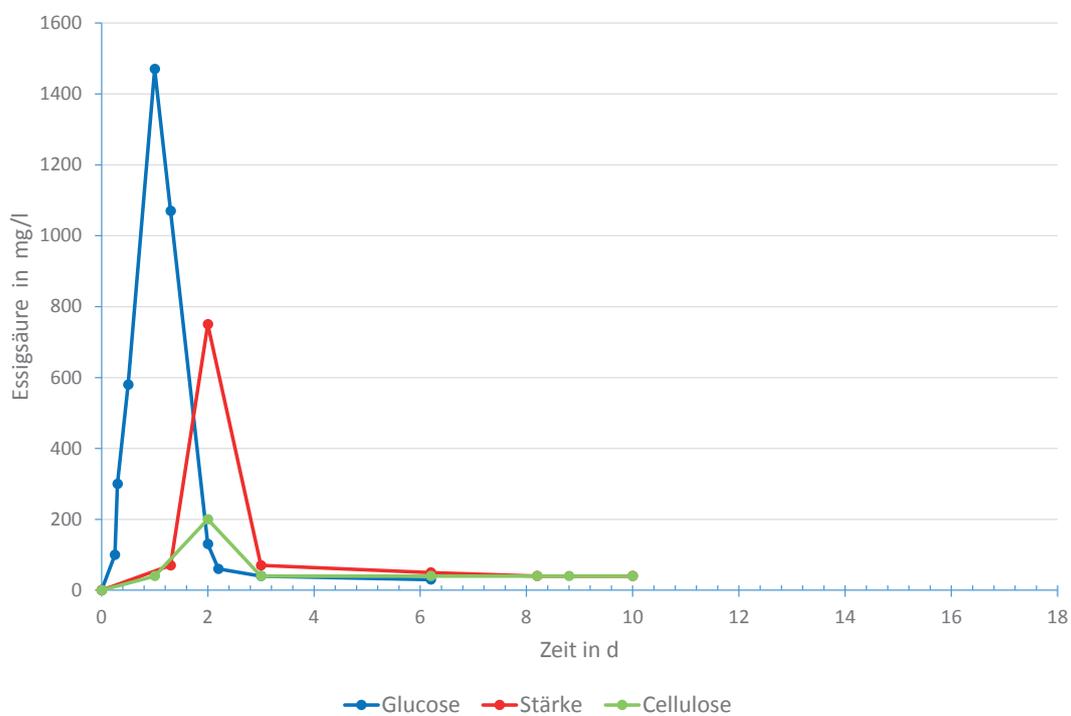
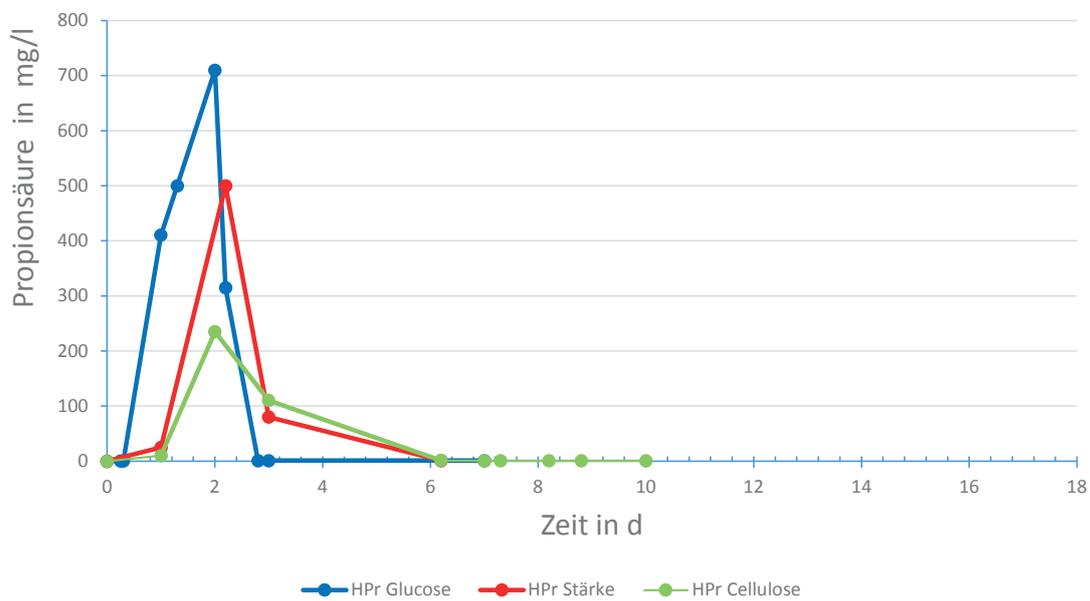


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Konzentration an flüchtigen Säuren (Essig- und Propionsäure) der Batch-Versuche mit Glucose, Stärke und Cellulose

Der Versatz der Bildung der flüchtigen organischen Säure (Essig- und Propionsäure) für die 3 Substrate spiegelt sich auch in der Variation des pH-Werts wider (Abbildung 8). Bei der Fermentation von Glucose wird das Minimum nach ca. 8 h erreicht, während dieses für Stärke bei 2 Tagen und für Cellulose bei ca. 3 Tagen liegt.

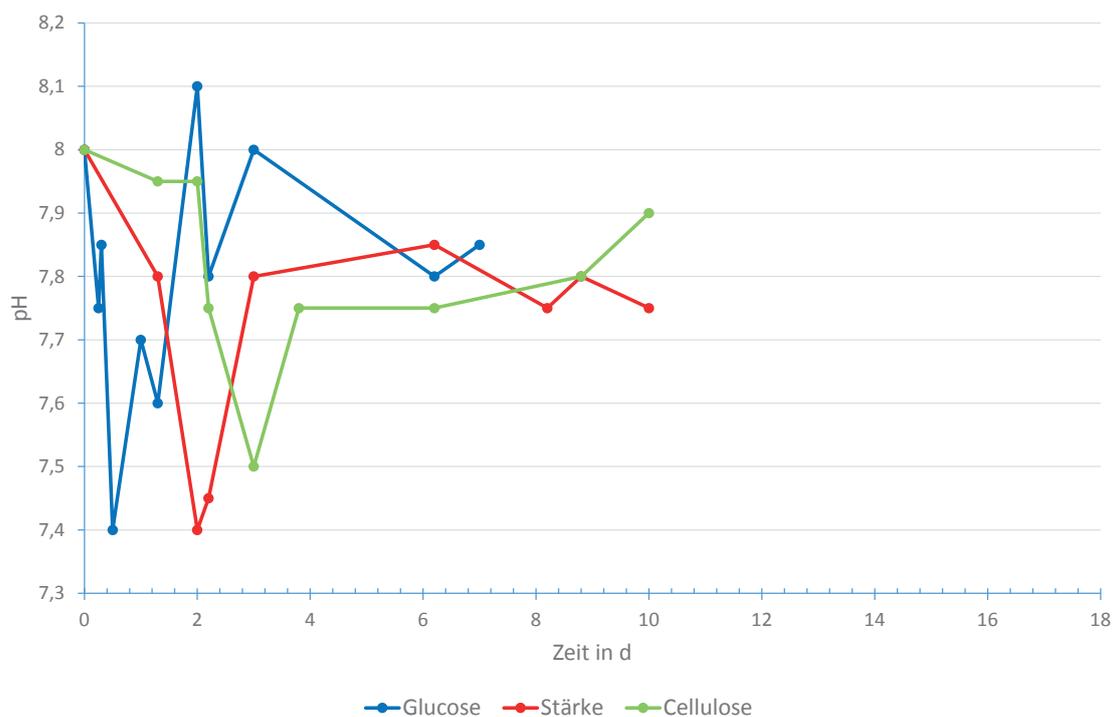


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des pH-Werts

Abbildung 9 zeigt die spezifische Methanbildung (unten) und den Methangehalt im gebildeten Biogas für die drei Substrate. Der Methan- und  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Biogases wurden mit dem IR-Biogas Monitor BM 2000 (Geotechnical Instruments, GB) bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die Methanbildung im Falle von Glucose sehr schnell einsetzt und nach 3 bis 4 Tagen abgeschlossen ist. Im Falle von Stärke und Cellulose setzt die Methanbildung erst nach dem Tag 2 ein und ist nach ca. 6 bis 7 Tagen abgeschlossen.

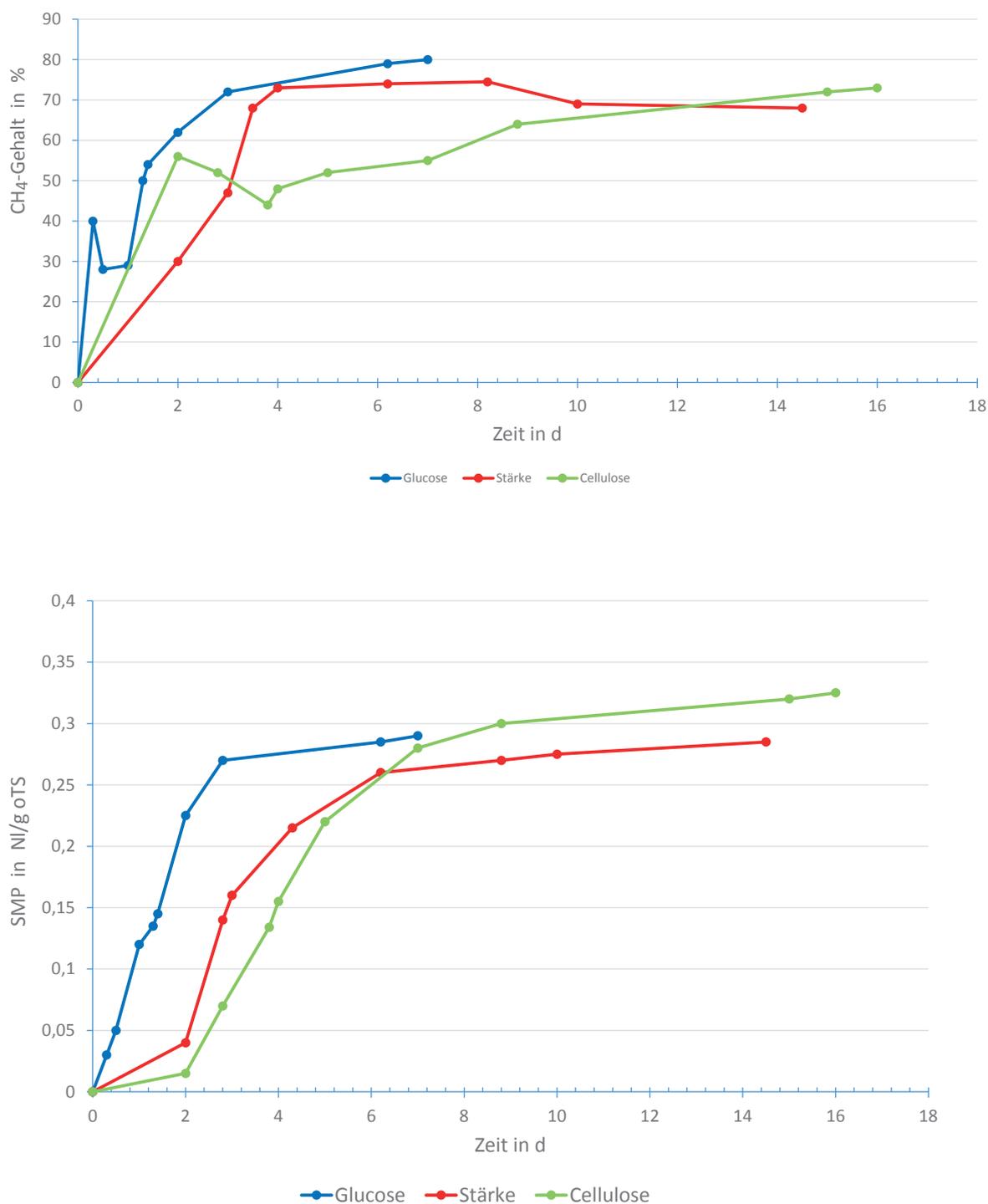


Abbildung 9: Spezifische Methanbildung (SMP, unten) und Methangehalt (oben) im Biogas bei der mesophilen Fermentation von Glucose, Stärke und Cellulose

Die Versuche wurden beim Erreichen einer spezifischen Methanbildung von ca. 0,3 NI/gVS beendet, die auch als Referenz in der Literatur gefunden wurden (HANSEN et al. 2004, GOLKOWSKA und GREGER 2015).

Der metabolische Umsatz als Verhältnis des experimentell gefundenen, bezogen auf das theoretische spezifische Methanbildungspotenzial, liegt im Bereich zwischen 69 bis 79 % (Tabelle 1), wobei das theoretische spezifische Methanbildungspotenzial ThSMP mit der Buswell-Gleichung (1) berechnet wurde (BUSWELL und MUELLER 1952, BOYLE 1976, RAPOSO et al. 2011, BENITO 2015):

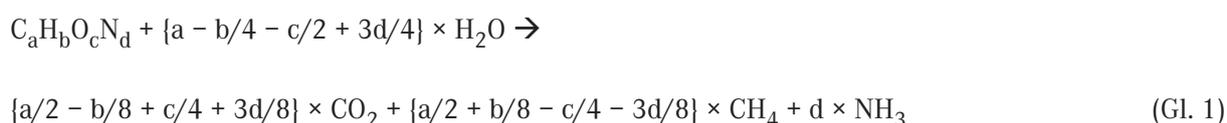


Tabelle 1: Theoretisches spezifisches Methanbildungspotenzial (ThSMP) sowie die experimentell gefundene spezifische Methanbildung nach Erreichen eines nahezu konstanten Endwerts mit Angabe der jeweiligen Versuchszeit. Das Verhältnis dieser beiden Werte wird als Wiederfindung bezeichnet.

	Spezifisches Methanpotenzial		Wiederfindung	
	ThSMP NI(CH <sub>4</sub> )/gVS	SMP experimentell NI(CH <sub>4</sub> )/gVS	%	Versuchstage
Glucose	0,373	0,285	76	7
Stärke	0,414	0,28	69	14
Cellulose	0,414	0,329	79	15,8

## Schlussfolgerungen

Anhand der ausgewählten Beispiele der Fermentation von Glucose, Stärke und Cellulose konnte gezeigt werden, dass die Anthon-Methode auf die Bestimmung der gelösten und partikulären Kohlenhydrate zum Monitoring des Kohlenhydratabbaus in Batch-Biogasreaktoren angewendet werden kann.

In weiteren Untersuchungen soll die Methode auch auf kontinuierlich betriebene und mit verschiedenen Substraten versorgte Biogasreaktoren angewendet werden. Hierfür sind insbesondere Küchenabfälle unterschiedlicher Herkunft von aktuellem Interesse. Mithilfe des Ansatzes einer Trennung von Hydrolyse- und Farbreaktion soll im Weiteren untersucht werden, ob sich der methodisch ausgearbeitete Ansatz auch auf Gärrestproben aus nachwachsenden Rohstoffen im weitesten Sinne übertragen lässt.

## Literatur

- Benito Martin, P. C. (2015): Mesophilic Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Substrates under different Operating Modes and Extreme Feeding Conditions – Optimisation and Modelling. Dissertation, University of Luxemburg
- Boyle, W.C. (1976): Energy Recovery from Sanitary Landfills – A Review. In: Microbiol. Energy Conversion, Eds. Schlegel, H.G.; Barnea, S., Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 119–138.
- Buswell, A. M.; Mueller, H. F. (1952): Mechanism of Methane Fermentation. Industrial and Engineering Chemistry 44(3), pp. 550-552, cited in Raposo et al. (2011)
- Deublein, D.; Steinhauser, A. (2008): Biogas from Waste and Renewable Resources, An Introduction. Weinheim, Wiley-VCH Verlag
- Golkowska, K.; Greger, M. (2013): Anaerobic Digestion of Maize and Cellulose under Thermophilic and Mesophilic Conditions – a Comparative Study. Biomass and Bioenergy 56, pp. 545–554

- Grandy, A. S.; Erich M. S.; Porter G. A. (2000): Suitability of the Anthrone-Sulfuric Acid for Determining Water Soluble Carbohydrates in Soil Water Extracts. *Soil Biology and Biochemistry* 32, pp. 725–727
- Hansen, T. L.; Schmidt, J. E.; Angelidaki, I.; Marca, E.; Jansen, J. I. C.; Mosbaek, H.; Christensen, T. H. (2003): Method for Determining of Methane Potentials of Solid Organic Waste. *Waste Management* 24, pp. 393–400
- Loewus, F. A. (1952): Improvement in Anthrone Method for Determination of Carbohydrates. *Anal. Chemie* 24(1), pp. 219–219
- Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura S.-I.; Lee, Y. C. (2005): Carbohydrate Analysis by a Phenol-Sulfuric Acid Method in Microplate Format. *Analytical Biochemistry* 339, pp. 69–72
- Raposo, F.; Fernandez-Cegri, V.; De la Rubia, M. A.; Borja, R.; Béline, F.; Cavinato, C.; Demirer, D.; Fernandez, B.; Fernandez-Polanco, M.; Frigon, J. C.; Ganesh, R.; Kaparaju, P.; Koubova, J.; Méndez, R.; Menin, G.; Peene, A.; Scherer, P.; Torrijos, M.; Uellendahl, H.; Wierinck, I.; de Wilde, V. (2011): Biochemical Methane Potential (BMP) of Solid Organic Substrates: Evaluation of Anaerobic Biodegradability using Data from an International Interlaboratory Study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86(8), pp. 1088–1098
- Sluiter, J. B.; Ruiz, R. O.; Scarlata, C. J.; Sluiter, A. D.; Templeton, D. W. (2010): Composition Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, pp. 9043–9053
- Viles, F. J.; Silverman, L. (1949): Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical Chemistry* 21, pp. 950–953
- Yan, X. (2014): High Performance Liquid Chromatography for Carbohydrate Analysis: Chapter 3 in: HPLC Principle, Practice and Procedures, Ed. Zou Y., Nova Science Publisher, pp. 22
- Yemm, E. W.; Willis, A. J. (1954): The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochem. J.* 56, pp. 508–514

## Autoren

**Markus Schlienz, Dr.-Ing. Patricia C. Benito Martin** und **Prof. Dr.-Ing. Manfred Greger** arbeiten im Labor für Process Engineering an der Fakultät für Wissenschaft, Technologie und Kommunikation der Universität Luxemburg, 6, rue Richard Coudenhove-Kalergi, L-1359 Luxemburg-Kirchberg, E-Mail: manfred.greger@uni.lu.

## Danksagung

Die Autoren danken der Universität Luxemburg für die Finanzierung des Projekts.