



Christoph Griehl, \*1997

Schule:  
Georg-Cantor-Gymnasium Halle,  
Halle (Saale)

Eingang der Arbeit:  
Juli 2014

Zur Veröffentlichung angenommen:  
November 2014

## Stroh im Tank

### Der Clou mit der Kuh - Biogas mit Pansensaft

Es wurde gezeigt, dass Pansenorganismen effektiver als Gülleorganismen cellulosehaltige Substrate wie Stroh zu Biogas abbauen. Zudem können durch enzymatische Vorbehandlung des Strohs bis zu 50 Prozent höhere Biogas- und Methanausbeuten erzielt werden. Die Cellulosespaltung mit Pansensaft lässt sich also auch für die Biogasgewinnung außerhalb der lebenden Kuh erschließen, so dass sie zukünftig auch in pflanzenvergärenden Biogasanlagen Anwendung finden könnte.

#### 1 Einleitung und Problemstellung

Seit einigen Jahren bewegt mich die Frage, wie wir in 100 Jahren unseren Strom-, Wärme- und Kraftstoffbedarf decken werden. Derzeit stammen etwa 80 Prozent der genutzten Energie aus fossilen Kohlenwasserstoffen, deren Vorräte zur Neige gehen. Außerdem schaden diese der Umwelt, da bei ihrer Verbrennung klimaschädliche CO<sub>2</sub>-Emissionen anfallen. In einem Artikel von Roberto Rinaldi und Ferdi Schüth in „Spektrum der Wissenschaft“ [22] erfuhr ich, dass Cellulose eine fast unbegrenzte Energie- und Rohstoffquelle darstellt. Sie gilt als häufigste organische Verbindung auf der Erde, die sich stetig erneuert (ein Baum bildet täglich ca. 14 g). Pflanzen produzieren pro Jahr etwa eine Billion Tonnen dieses Moleküls und bauen es über Photosynthese als Stützmaterial in ihre Zell-

wände ein. Man schätzt, dass die weltweit in Biomasse umgewandelte Sonnenenergie etwa dem Zehnfachen des derzeitigen Energieverbrauches der Menschheit entspricht. Wenn es gelingt, die in Biomasse enthaltene Cellulose zu spalten, könnten sich fast grenzenlose Energiequellen ergeben. Das ist allerdings nicht so einfach, denn Cellulose fungiert als strukturerhaltende Trägersubstanz, die den Pflanzen Schutz und Festigkeit gibt. Das spiegelt sich in ihrer komplexen chemischen Struktur wider. Celluloseketten sind  $\beta$ -Glucose-Polymere, die sich über H-Brückenbindungen zu Fibrillen anordnen. Diese Fibrillen sind bündelweise über Lignin und Hemicellulose (Lignocellulose) miteinander zu kräftigen Fasern verseilt (Abb. 1), die starr, wasserunlöslich und nahezu chemisch resistent sind.

Daher kann Cellulose auch nur durch wenige Organismen abgebaut werden. Hierzu zählen Wiederkäuer, wie Rinder und Schafe, die den Pansen als pflanzenverdauendes Organ besitzen. Im Pansen leben Mikroorganismen, die mithilfe von Cellulasen die  $\beta$ -1,4-Bindungen zwischen den Glucosemolekülen „aufbeißen“ können und auf diese Weise ihre Wirte mit Energie versorgen. Dabei spalten die Pansenorganismen täglich hohe Mengen cellulosehaltiger Substrate zu Glucose auf, die dann zu flüchtigen Carbonsäuren und Biogas weiter umgewandelt wird. Das schafft die Bakterienpopulation des Verdauungstraktes von Menschen und fleischfressenden Tieren nicht, für die Cellulose ein Ballaststoff ist, der unverdaut ausgeschieden wird. Ich fragte mich daher, ob sich die Verdauungstalente der Kuh zur Gewinnung

von Biogas auch ins Labor übertragen lassen. Als Substrat wollte ich eine Abfallbiomasse nutzen, da der Anbau von Pflanzen für eine energetische Nutzung mit den Ackerflächen für den Nahrungsmittelanbau konkurriert. Angesichts von Armut und Hunger in vielen Teilen der Welt ist dies ein sehr wichtiger Aspekt. Daher wählte ich für mein Projekt Stroh aus, das zu den landwirtschaftlichen Reststoffen mit dem größten ungenutzten Potenzial [4] zählt und wie Biogas gut lagerfähig ist. Nach Einschätzung der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR) könnte der Abbau von Stroh zu Biogas künftig einen wichtigen Beitrag zur nachhaltigen Energieversorgung leisten [23]. Die Strohvergärung ist aber aufgrund des hohen nicht vergärbaren Anteils von ca. 35 Prozent und des geringen Wasseranteils problematisch. Mein Ziel war daher, den Abbau von Stroh zu Biogas mit Hilfe von Cellulose-spaltenden Enzymen und Pansenorganismen zu untersuchen und dabei den nicht vergärbaren Anteil, der vermutlich auf die stabile Cellulosestruktur zurückzuführen ist, aufzuspalten.

## 2 Grundlagen und Stand der Forschung

### 2.1 Stroh als potenzieller Energierohstoff

Zu Stroh gehören die ausgedroschenen Stängel und Blätter von Getreide, Raps, Sonnenblumen, Mais und Leguminosen, die bei der Ernte als Rückstand verbleiben [13]. Pro Hektar Anbaufläche fallen 5 bis 6 Tonnen verwertbares Stroh an, das sind in Deutschland ca. 49 Mio. t/a [19], darunter 30 bis 36 Mio. t/a Getreidestroh. Bisher verbleibt Stroh zur Aufrechterhaltung der Humusbilanz auf den Feldern. Getreidestroh wird teilweise geborgen und als Einstreu in Tierställen oder Baustoff verwendet. Aufgrund der Flächenkonkurrenz zwischen Energie- und Nahrungsmittelpflanzen und großer ungenutzter Strohpotenziale von 8 bis 13 Mio. t/a Getreidestroh [4] wird zunehmend die energetische Nutzung erforscht. Im Vordergrund steht die Verbrennung, die aber aufgrund hoher Schadstoffemissionen noch in den Kinderschuhen steckt. In Deutschland werden vor allem Kleinf Feuerungsanlagen betrieben, die bei weniger als 100 kWh genehmigungsfrei sind [12]. 2014 soll in Emlichheim das erste große Strohheizkraftwerk in Betrieb gehen, das 60.000 t Stroh verarbeiten kann [18]. Andere

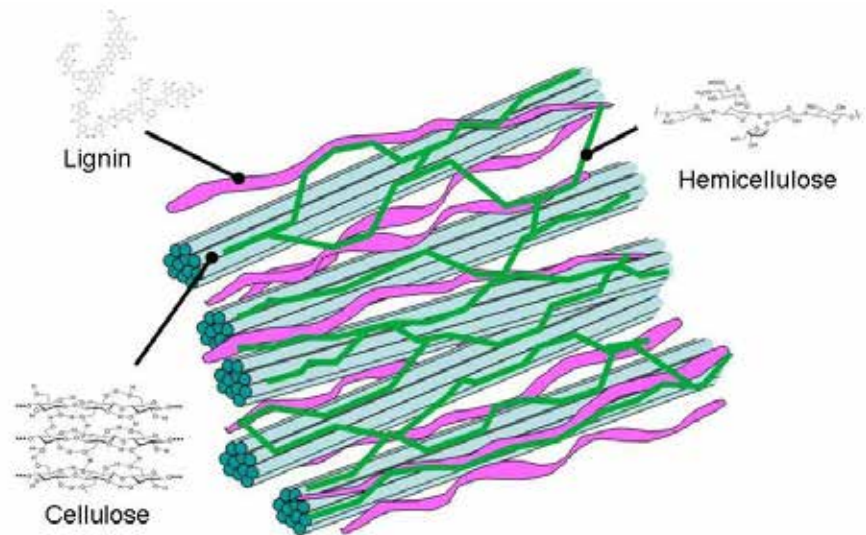


Abb. 1: Schema der Lignocellulose [16, © MPI für Kohlenforschung].

Möglichkeiten, aus Stroh Energie zu gewinnen, sind die Bioethanol- und Biogasgewinnung [23]. Letztere gilt als sehr aussichtsreich, da die Substratkosten gegenüber Maissilage um 40 bis 50 Prozent geringer sind [21].

### 2.2 Biogasgewinnung

Biogas entsteht beim bakteriellen Abbau organischer Stoffe unter Ausschluss von Sauerstoff (anaerob) in feuchter Umgebung. Derartige Faulprozesse (Vergärungen) treten beispielsweise im Schlamm von Gewässern, in Mooren, Gülle- und Klärgruben sowie im Pansen von Wiederkäuern auf. Die Hauptbestandteile sind Methan ( $\text{CH}_4$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ), deren Anteile je nach Substrat schwanken. Methan ist der eigentliche Energieträger und liefert pro Kubikmeter 10 kWh Energie (ein Kubikmeter Erdgas liefert dagegen nur 5 bis 7,5 kWh).

Industriell wird Biogas in Biogasanlagen hergestellt und meist vor Ort in einem Blockheizkraftwerk (BHKW) zur Erzeugung von Strom und Wärme genutzt. Wenn man den  $\text{CO}_2$ -Anteil im Biogas entfernt, kann man das zu 98 Prozent angereicherte  $\text{CH}_4$  ins Erdgasnetz einspeisen oder als Kraftstoff für Autos verwenden.

Die meisten Biogasanlagen arbeiten im Durchflussverfahren mit pumpfähigen Substraten (Trockensubstanz-Gehalt <15 Prozent), die in einen beheizten Fermenter kontinuierlich eingespeist und abgebaut werden. Biogas sowie der nicht abbaubare Gärrest werden laufend

entnommen, in ein Gärrestlager geleitet und als Dünger genutzt. Beim diskontinuierlichen Batchverfahren sind Fermenter und Gärlager zusammengefasst. Der Fermenter wird komplett gefüllt und luftdicht verschlossen. Nach dem Abbau wird er bis auf einen kleinen Rest zum Animpfen der nächsten Charge geleert. Hierbei ändert sich die Gasproduktionsrate in Abhängigkeit von der Zeit. Nach diesem Prinzip arbeiten auch die im Labor genutzten Eudiometerapparaturen.

Die im Fermenter ablaufenden chemischen Vorgänge sind sehr komplex. Die Biopolymere in der Biomasse werden in 4 parallel ablaufenden Schritten zu Biogas abgebaut, an denen verschiedene Bakteriengruppen (aus einem Impfschlamm wie Gülle) mit ihren Enzymen beteiligt sind (Abb. 2, Seite 42). Die hydrolytischen Bakterien sind fakultativ anaerob (mit und ohne  $\text{O}_2$  lebend) und leben in Symbiose mit den fermentativen Bakterien. Die gebildeten Monomere werden in der Acetogenese und Methanisierung von strikt anaerob lebenden Bakterien zu Biogas abgebaut. Viele Anlagen arbeiten bei 32 bis 42 °C (mesophil) und einem pH Wert von 6,8 bis 7,5. Fällt dieser ab, ist das ein Indiz für die Bildung zu hoher Säuremengen. Diese hemmen die langsam wachsenden Methanbakterien. Daher versucht man mitunter, die Hydrolyse und Säurebildung von der Methanbildung räumlich zu trennen (zweistufiges Verfahren), was aber nur bedingt gelingt und teuer ist. Um die Organismen mit Nährstoffen ausreichend zu versorgen, sollten die Substrate

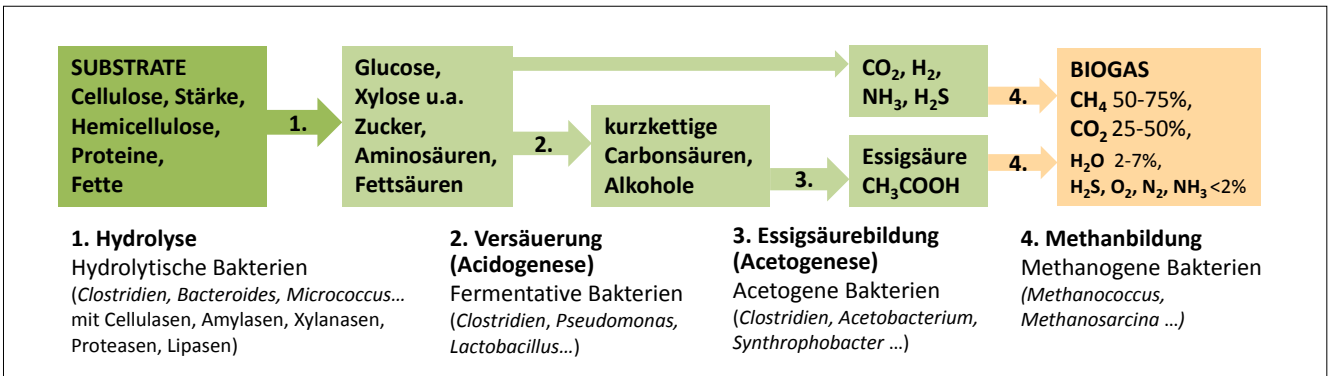


Abb. 2: Mikrobiologische Abbauprozesse von Biomasse zu Biogas (Daten aus [7, 5]).

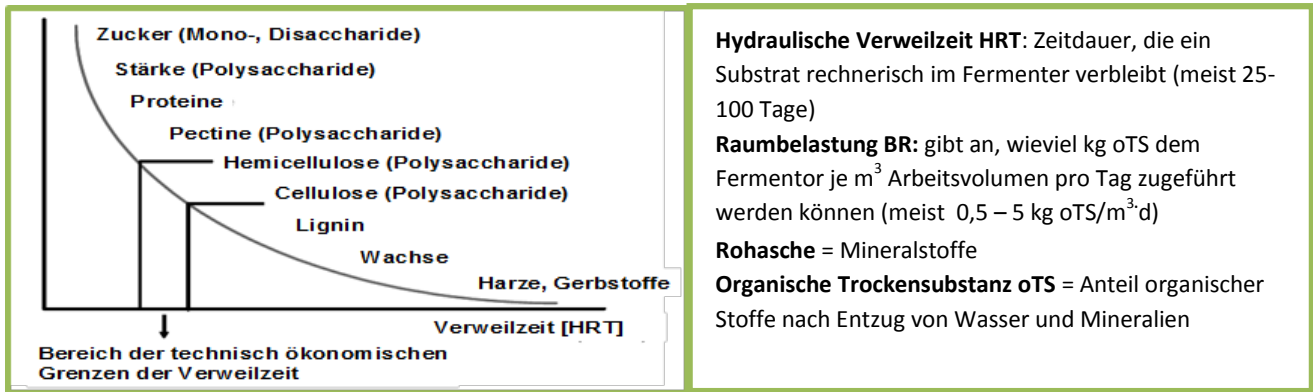


Abb. 3: Abbaugeschwindigkeit von Stoffgruppen [5], Begriffe aus FNR-Broschüre [8].

Substrat	Biogas-ausbeute [ln/kg <sub>oTS</sub> ]	CH <sub>4</sub> -Gehalt [Vol.%]	CH <sub>4</sub> -Ausbeute [ln/kg <sub>oTS</sub> ]	TS [%]	oTS [% der TS]	NH <sub>4</sub> [% der TS]	C:N:P:S Verhältnis	Cellulose/Hemicell./Lignin [%]
Rindergülle	200-500	60	110-275	8-11	75-82	1-4	600:40:2:4	18/11/15
Schweinegülle	300-700	60-70	180-360	4-7	75-86	3-7		
Maissilage	450-700	50-55	234-364	28-35	85-98	0,1-0,3	600:20:4:2	19/24/2
Weizenstroh*	280	50-55	140-154	85-91	90-95		600:7:2:11	40/28/15

Tab. 1: Biogas-/CH<sub>4</sub>-Ausbeuten, TS-, oTS-, NH<sub>4</sub>-Gehalte wichtiger Substrate [8],\* [14] und Cellulose-/Hemicellulose-, Ligninanteile [13, 11, 1].

ein C:N:P:S-Verhältnis von 600:15:5:3 haben [8]. Die Biogas- und Methanausbeute eines Substrates wird hauptsächlich durch den Gehalt an verdaubaren Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten bestimmt. Bei faserreichen Substraten besteht der Kohlenhydratanteil zu großen Teilen aus Cellulose, die nur schwer abbaubar ist. Die Substrate werden von den Bakterien nicht vollständig abgebaut, so dass ein Gärrest verbleibt, der energetisch nicht nutzbar ist. In Abhängigkeit von ihrer Verweilzeit im Fermenter (Abb. 3) und der Zusammensetzung liegen die Abbauraten bei 25 bis 80 Prozent [8]. Typische Substrate sind Rinder- und Schweinegülle sowie nachwachsende Rohstoffe wie Gras und vor allem Mais, die zur besseren Haltbarkeit siliert werden. Gülle wird

häufig in pflanzenvergärenden Anlagen als Cosubstrat eingesetzt, da sie aufgrund der hohen Pufferkapazität die Vergärungsprozesse stabilisiert und Ammonium, Spurenelemente sowie Bakterien liefert. Zur Vergärung von Stroh konnte ich nur wenige Daten finden, diese sind in Tab. 1 (mit anderen Substraten) zusammengestellt. Nach meinen Recherchen führt nur die Firma Verbio eine Strohvergärung im industriellen Maßstab durch [4]. Das liegt vermutlich daran, dass Stroh einen nicht vergärbaren organischen Anteil von ca. 35 Prozent hat, der wahrscheinlich auf den hohen Cellulosegehalt von 36 bis 54 Prozent [1] zurückzuführen ist. Problematisch sind auch der hohe Aschegehalt (bis 10 Prozent) und der geringe Stickstoff- und Wassergehalt [21]. Um Stroh erfolg-

reich vergären zu können, sollte man es mechanisch zerkleinern (für H<sub>2</sub>O-Aufnahme) und stickstoffhaltige Cosubstrate wie Gülle zusetzen.

### 2.3 Enzymatischer Abbau der Strukturpolymere der Pflanzenzellwand

Enzyme sind katalytisch wirksame Proteine. Sie beschleunigen in lebenden Zellen selektiv die vielen parallel ablaufenden Reaktionen, indem sie für einen einfacheren Reaktionsweg mit geringerer Aktivierungsenergie sorgen [20]. Der Abbau der Zellwandpolysaccharide Cellulose (30 bis 55 Prozent) und Hemicellulose (20 bis 35 Prozent) wird durch Hydrolasen (Cellulasen, Xylanasen) katalysiert, die die Glykosidbindungen mit Wasser zu Di- und Monosacchariden spalten. Cellulose

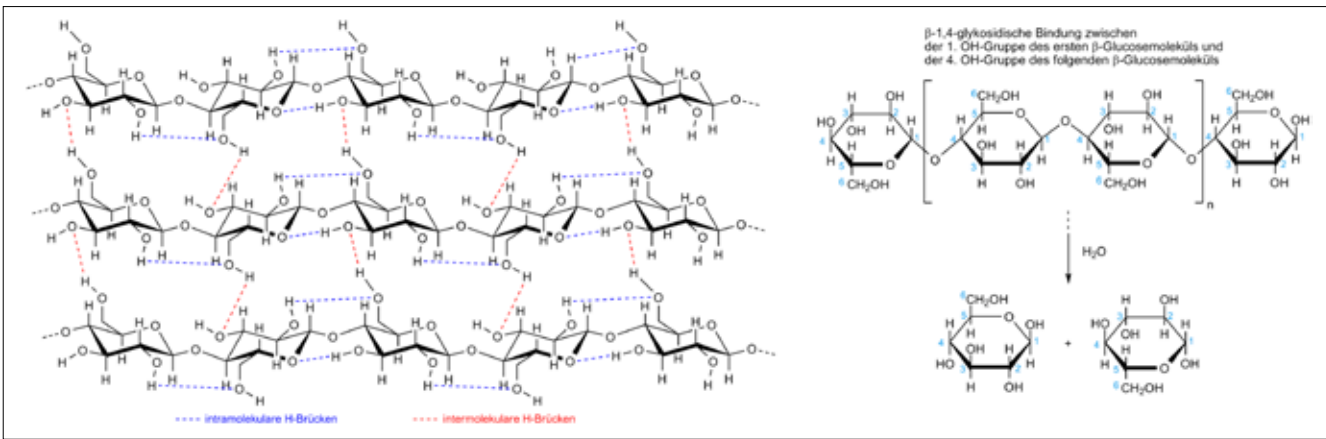


Abb. 4: H-Brücken in Cellulose [nach 3]; β-1,4-Bindung in Cellulose und Hydrolyse zu Glucose.

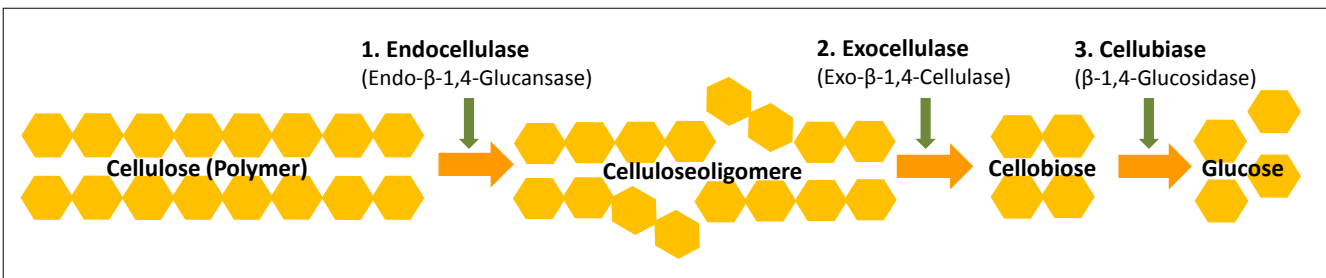


Abb. 5: Vereinfachtes Schema zum enzymatischen Abbau des Strukturpolymers Cellulose mit Cellulasen.

ist ein Polymer aus 1.000 bis 15.000 D-Glucosemolekülen. Die β-1,4-Bindung in Cellulose führt zu geraden Ketten, die sich über Wasserstoff-Brückenbindungen zu überwiegend kristallinen Cellulose-Fibrillen vernetzen (Abb. 4) [17].

Um Cellulose spalten zu können, muss man zunächst die H-Brückenbindungen aufbrechen, was man durch Vorbehandlung mit (heißem) Wasser schaffen könnte. Anschließend werden die β-1,4-glykosidischen Bindungen mit Hilfe von Cellulasen gespalten. In der Natur kommen Cellulasen in verschiedenen Pilzen und Bakterien vor, die auch im Darm von Termiten oder Wiederkäuern leben. Die Hydrolyse der Cellulose wird durch mehrere Cellulasen katalysiert (Abb. 5), die das Polymer stufenweise bis zum Einfachzucker Glucose (Hexose) abbauen [17].

Endocellulasen spalten zunächst die Celluloseketten im Inneren der Kette in kürzere Oligomere, deren freigesetzte Enden von Exocellulasen zum Disaccharid Cellobiose hydrolysiert werden. Cellobiose wird dann mit Hilfe von Cellubiasen zu Glucose aufgespalten, die unter Energiegewinn zu CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> abgebaut werden kann. In Bakterien sind die drei Cellulasen meist in einem Komplex (Cellulosom) an der Zelloberfläche organisiert [17]. Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für

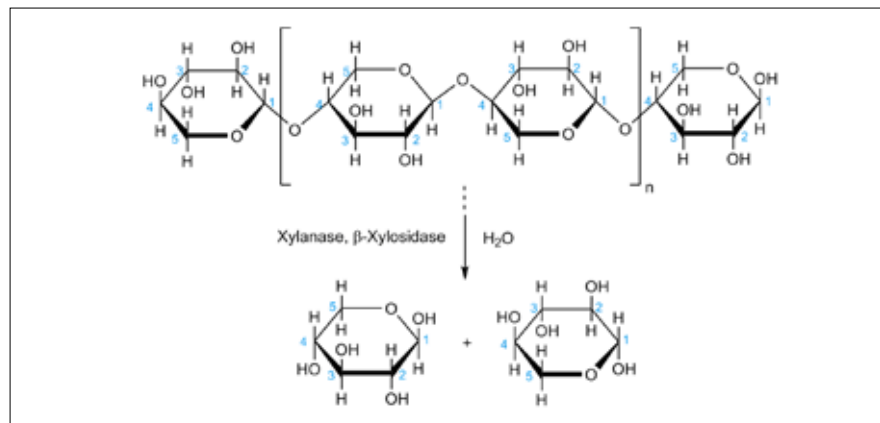


Abb. 6: Xylanabbau.

verschiedene niedrigmolekulare Polysaccharide, die leichter als Cellulose spaltbar sind und als versteifende Kittsubstanzen in Zellwänden vorkommen. Hauptkomponente ist Xylan, das vor allem aus β-D-Xylose-Molekülen (< 500) aufgebaut ist, die teilweise Acetat-, Glucose-, Galactose- und Arabinose-Reste tragen. Die β-glykosidischen Bindungen werden mit Hilfe von Xylanasen gespalten, die in Cellulose spaltenden Organismen auftreten. Xylanasen spalten zunächst Xylan zu Xylobiose, die dann durch eine β-Xylosidase weiter zur Pentose Xylose abgebaut wird (Abb. 6) [17].

Lignin (10 bis 30 Prozent) ist der eigentliche Füllstoff in der Zellwand, der für die enorme Festigkeit von Holz ver-

antwortlich ist (Lignineinlagerung = Verholzung). Lignin ist kovalent mit Hemicellulosen verbunden, die über H-Brückenbindungen mit Cellulose verknüpft sind (Lignocellulose). Chemisch ist es ein komplexes Polymer aus Coniferyl-, Sinapyl- und p-Cumarylalkohol, die über C-O- und C-C-Bindungen quervernetzt sind und die Cellulosefibrillen umhüllen (Abb. 7, Seite 44) [17].

Die mit Lignin verfestigte Zellwand lässt sich äußerst schwer abbauen. In der Natur schaffen das nur wenige Organismen. Hierzu zählen Holz zerstörende Weißfäulepilze (*Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*), die mit Hilfe von Oxidoreduktasen (Peroxidasen und Laccasen) Lignin abbauen. Der erste Schritt ist eine Oxi-

ditionsreaktion. Peroxidasen benötigen hierfür Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , welches bei der Oxidation durch das Enzym zu Wasser reduziert wird. Laccasen sind Polyphenoloxidasen, die mit Sauerstoff Phenole oxidieren bei gleichzeitiger Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$ . Dabei entstehen im Lignin sehr instabile Sauerstoff-Radikale, die spontan zu aromatischen Alkoholen und Aldehyden zerfallen [17, 10].

### 2.4 Die Kuh als effiziente celluloseverdauernde Biogasanlage

Wiederkäuer können aus cellulosehaltigen Substraten Energie gewinnen - das schaffen wir Menschen und die meisten anderen Tiere nicht. Bei Kühen (Abb. 8) gelangt die Nahrung durch die Speiseröhre in den Pansen (Rumen), wird hier mit Speichel vermischt, durch peristaltische Bewegungen zerkleinert und mit Mikroorganismen zersetzt. Der Nahrungsbrei wird dann im Netzmagen (Reticulum) zu kleineren Klumpen geformt. Diese werden ins Maul zurückgestoßen und wieder zerkaut. Die zerkleinerte Nahrung gelangt nun über den Blättermagen (Omasum), wo Wasser entzogen wird, in den Labmagen (Amasum). Dieser ist vergleichbar mit dem sauren Magen der Nichtwiederkäuer. Hier setzen Verdauungsenzyme den Abbau fort, der im Dünn- und Dickdarm vollendet wird.

Der Pansen, der erste von 4 Mägen, hat ein Volumen von 100 bis 150 Liter und beherbergt eine enorme Menge von Mikroorganismen (Pansenflora: ca. 200 Bakterienarten, Wimperntierchen, Pilze), von denen die Bakterien ( $10^{10}$ - $10^{11}$ /g Panseninhalt) für die Cellulosespaltung am wichtigsten sind. Bei einem pH Wert von 6,5 und 39 °C hydrolysieren cellulose-spaltende Enzyme Cellulose über die Stufe der Cellobiose zu Glucose. Hemicellulose wird von den Pansenbakterien mithilfe von Xylanasen zu Xylose abgebaut. Die freigesetzten Zucker werden zu Brenztraubensäure ( $CH_3CO-COOH$ ) umgewandelt und im nächsten Schritt wie in einer Biogasanlage anaerob zu flüchtigen Carbonsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure) vergoren. Diese werden durch die Wand des Pansens in das Blut abgegeben und von der Kuh als Hauptenergiequelle und zur Synthese von Milch Inhaltsstoffen genutzt. Daneben entstehen täglich etwa 200 Liter Pansengase ( $CO_2$ ,  $CH_4$ ), die durch Aufstoßen in die Atmosphäre gelangen. Die

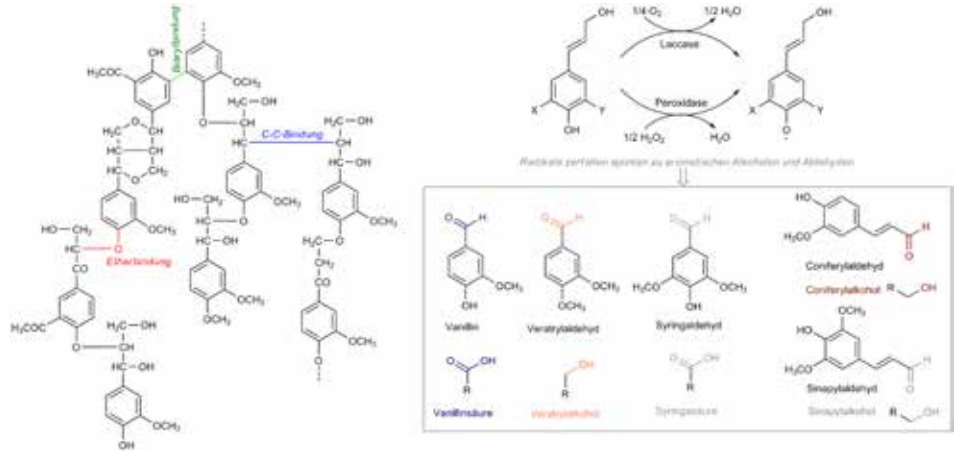


Abb. 7: Ausschnitt aus Ligninstruktur [nach 17], enzymatischer Ligninabbau.

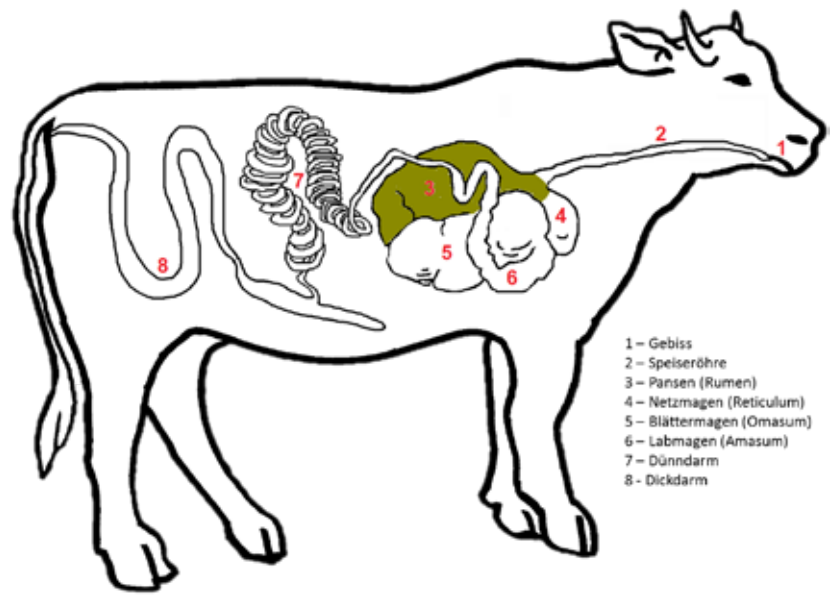


Abb. 8: Verdauungssystem einer Kuh [nach 2].

Parameter	Kuh (Pansen)	Biogasanlage
Celluloseabbau durch	Pansenflora (sehr effizient)	Gülle aus Dickdarm (sehr gering)
Raumbelastung /Tag	bis 200 kg <sub>g<sub>OTS</sub></sub> /m <sup>3</sup> (20 g <sub>g<sub>OTS</sub></sub> /100 ml)	0,5-5 kg <sub>g<sub>OTS</sub></sub> /m <sup>3</sup>
Verweilzeit in Tagen	ca. 3	25-100

Tab. 2: Abbauleistung einer Kuh und einer Biogasanlage im Vergleich (Daten aus [8,15]).

Pansenflora arbeitet dabei effektiver als die Bakterien in Biogasanlagen (Tab. 2). Sie setzt in kürzerer Zeit mehr Biomasse um (ca. 38 kg Frischmasse pro Tag  $\approx$  ca. 20 kg<sub>g<sub>OTS</sub></sub>) [15]. Die Verdauungstalente der Kuh haben mich fasziniert, so dass ich diese zur Cellulosespaltung außerhalb des Pansens in einer Biogasapparatur untersuchen wollte. Bei meinen Recherchen fand ich heraus, dass vor allem die Tierärztliche Hochschule in Hannover daran forscht und hierzu gerade ein Forschungsvorhaben läuft [Projektdatenbank [7]: FKZ 22017612 und 22017612, Laufzeit:

1.9.2012-31.08.2015]. Geplant ist der Aufbau einer zweistufigen Technikumsanlage.

### 3 Vorgehensweise und Methoden 3.1 Versuche zum Abbau der Strukturpolymere zu Monomeren

Zunächst wollte ich in vergleichenden Versuchen herausfinden, ob und wie schnell sich die Strukturpolymere Cellulose, Hemicellulose und Lignin zu ihren Monomerbausteinen spalten lassen. Hierfür setzte ich isolierte Enzyme ein und verglich diese mit frischem Pansensaft. Als

Name des Enzyms	Hauptenzyme (Enzymaktivität in U/mg)*	Temperatur	optimaler pH-Bereich	katalysierte Reaktion
Cellulase aus <i>Trichoderma reesei</i>	Endo-1,4-β-Gluconase (0,8) u.a.	37 °C	5	Spaltung zu Oligomeren, Cellubiose und Glucose
Cellulase aus <i>Trichoderma viride</i>	Endo-1,4-β-Gluconase (1) u.a.	40 °C	4	Spaltung zu Oligomeren, Cellubiose und Glucose
Cellulase Onozuka aus <i>Trichoderma</i>	Cellulase (1) Hemicellulase (1) α-Amylase (0,8)	40 °C 37 °C 25 °C	4,5 5,5 6	Spaltung zu Glucose und anderen Zuckerarten
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	Endo-1,4-β-Gluconase (1,0)	37 °C	5,0	Spaltung zu Oligomeren
Xylanase-Cellulase (Novaplus)	Endo-β-Xylanase (400) β-Glucanase (0,9)	30-70 °C	4,5-7	Spaltung zu Xylose, Mannose..., Glucose
Laccase aus <i>Trametes versicolor</i>	p-Diphenol-Oxidase (0,82)	25 °C	6	Oxidation von Lignin zu aromatischen Alkoholen

Tab. 3: Eigenschaften der eingesetzten Enzyme (\*Die Enzymaktivität wird in Unit (U in  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) oder Katal (kat in  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ) angegeben. Unit bezeichnet die Menge eines Enzyms, die unter Standardbedingungen innerhalb einer Minute 1  $\mu\text{mol}$  Substrat umsetzt.

Substrat setzte ich Weizenstroh mit einem Cellulosegehalt von 40 Prozent ein. Da dieses auch hohe Anteile an Hemicellulose (28 Prozent) und Lignin (10 Prozent) enthielt, untersuchte ich als Modellsubstrate neben kristalliner Cellulose (Papierstreifen) auch Xylan und Lignin.

### 3.1.1 Vorbehandlung von Stroh

Für alle Versuche wurde gehäckseltes Stroh eingesetzt, das mit einer Moulinette auf kleiner 1,65 mm gemahlen und mit dem Digitalmikroskop VXH-2000 (Firma Keyence) vermessen wurde. Durch Trocknung bei 105 °C über 24 h wurde ein Trockensubstanz (TS)-Gehalt von 92,5 Prozent ermittelt, der oTS-Gehalt (550 °C über 2 h) lag bei 91,6 Prozent. Neben der mechanischen Vorbehandlung kann auch eine thermische Vorbehandlung helfen, um Lignin und Hemicellulose von den Celluloseketten zu lösen und die Biogasausbeute aus Stroh zu erhöhen. Aus diesem Grund wollte ich das Verfahren der Thermodruck-Hydrolyse (TDH) in meine Versuche aufnehmen. Zur Herstellung des TDH-Strohs nutzte ich einen Dampfdrucktopf als Reaktionsgefäß und kochte darin 10 g Stroh in 1 Liter Wasser für 60 min. Durch den Überdruck von ca. 1 bar werden Temperaturen von 120 °C erreicht.

### 3.1.2 Auswahl der Enzyme

Da die Hersteller gleiche Enzyme mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten anbieten und die Präparate meist Begleitenzyme mit weiteren Spaltaktivitäten haben, wurden mehrere Enzyme ausgewählt, die in Tab. 3 zusammengestellt

sind. Neben 4 Pilzcellulasen setzte ich ein Enzympräparat (Novaplus) ein, das für den Abbau cellulosehaltiger Biomasse in Biogasanlagen entwickelt wurde und auch Xylan spaltet. Um auch Aussagen zum Ligninabbau treffen zu können, wurde eine Laccase einbezogen, die Lignin oxidativ spaltet.

### 3.1.3 Pansensaft

Der Pansensaft wurde von der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig bereitgestellt, die für ernährungsphysiologische Untersuchungen zwei Kühe mit einem künstlichen Pansenzugang (Fistel) zur Probenentnahme ausgestattet hat. Der Pansensaft (aus Jersey-Rind 12 Stunden nach Fütterung entnommen, pH 5,8) wurde unter  $\text{N}_2$ -Begasung (Vermeidung  $\text{O}_2$ -Eintrag) in mehrere 2,5 l-Doppelmantelreaktoren umgefüllt und bei 39 °C kultiviert. Um die Aktivität der Pansenorganismen über mehrere Monate aufrecht zu erhalten, wurde dem Pansensaft zerkleinertes Heu zugesetzt ( $4 \text{ g}_{\text{TS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Für die Versuche wurde je nach Bedarf ein Teil des Pansensaftes entnommen und durch frisch hergestelltes Nährstoffmedium ersetzt.

### 3.1.4 Versuchsaufbau und Durchführung

Als Versuchsgefäße wählte ich kleine Glasfläschchen (20 ml), in denen ich die Abbauaktivitäten beobachten und untereinander vergleichen konnte. Alle Versuche erfolgten in Dreifachbestimmung nach folgender Prozedur: In 18 ml Sörensen-Puffer (pH = 5,1) wurden 200 mg Substrat und 5 mg Enzym/-mischung einge-

füllt. Die Glasfläschchen wurden gasdicht verschlossen (Ausnahme Laccase, die  $\text{O}_2$  benötigt) und in einem Tischinkubator bei 39 °C (Temperaturoptima vieler Enzyme, Pansentemperatur) für sieben Tage temperiert. Der Laccaseversuch wurde bei 25 °C (Temperaturoptimum) und 39 °C durchgeführt. Die Bewertung erfolgte täglich visuell und nach Versuchsende über die Bestimmung der Abbauprodukte Glucose und Xylose. Den Glucosegehalt habe ich mit einem einfachen Teststäbchen-Reflektometer (Reflectoquant®-System) bestimmt, das durch Messung des am Teststäbchen reflektierten Lichts quantitative Aussagen zum Glucosegehalt gestattet (1 mg Genauigkeit). Die Bestimmung von Xylose und Glucose im Spurenbereich war hiermit nicht möglich und wurde mit Hilfe eines HPLC-Gerätes (RI-Detektor, SphereClone  $\text{NH}_2$ -Säule) durchgeführt.

### 3.2 Versuche zur Vergärung von Stroh

Im zweiten Teil des Projektes untersuchte ich den Abbau des Strohs zu Biogas. Mein Ziel war es herauszufinden, ob sich Stroh mit Pansensaft auch außerhalb des Kuhmagens vergären lässt. Ich stellte mir hierbei auch die Frage, ob durch eine enzymatische oder thermische Vorbehandlung der schwer vergärbare Cellulose-Anteil im Stroh besser aufgespalten werden kann, so dass höhere Biogasausbeuten erzielt werden können.

#### 3.2.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Die Versuche wurden mit gehäckseltem Stroh in 0,5 l Eudiometer-Batch-Fermen-

tern (1,1 g Stroh je 100 ml Pansensaft) als Doppelbestimmung durchgeführt und mit Gülle (100 ml) als traditionellem Impfschlamm und Biogassubstrat verglichen. Das Reaktionsgefäß der Eudiometer-Apparatur, welches Substrat und Impfmateriale enthält, ist verbunden mit einer mit Sperrflüssigkeit (NaCl-Lösung, angesäuert mit 5 Vol.-%  $H_2SO_4$ ) gefüllten skalierten Glassäule (Abb. 9). Das gebildete Biogasvolumen kann hier abgelesen werden. Über einen Gasauslass erfolgt die Messung der Gaszusammensetzung mit Hilfe eines portablen Biogasanalytators (BM2000 Biogas Monitor). Als Kontrolle wurden Gülle und Pansensaft (ohne Substrat) mitgeführt und die Gas-mengen ermittelt. Durch Subtraktion der Kontrollwerte kann die Biogasausbeute der jeweiligen Substrate ermittelt werden. Da das Gasvolumen in Abhängigkeit von Druck und Temperatur schwankt, wurden die ermittelten Werte auf Normvolumen umgerechnet (DIN 1343: Normtemperatur 273,15 K oder 0 °C, Normdruck 101325 Pa oder 1013,25 mbar). Die Bestimmung der Zucker erfolgte wie unter

3.1 beschrieben. Der Gehalt der Fettsäuren wurde mit einem Gaschromatograph (FID, Stabilwax DA-Säule) ermittelt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur Effektivität unterschiedlicher Cellulasen

Mit den Cellulase-Enzympräparaten wurde zunächst ein Vorscreening mit Filterpapierstreifen (Cellulose) durchgeführt und durch visuelle Beurteilung der Enzym-Aktivität eine Vorauswahl für weitere Versuche getroffen (Tab. 4). Die Vorversuche haben gezeigt, dass der schnellste Abbau der Cellulosestreifen mit der Cellulase aus *Trichoderma reesei* und dem Cellulase-Xylanase-Präparat Novaplus gelingt. Daher wurden diese beiden Cellulasen für die weiteren Versuche eingesetzt.

### 4.2 Untersuchungen zum Abbau der Strukturpolymere zu Monomeren

Mit diesen Untersuchungen wollte ich herausfinden, wie effektiv sich Cellulose, Hemicellulose (Xylan), Lignin und Stroh enzymatisch zu ihren Monomerbausteinen abbauen lassen. Die Ergebnisse zum

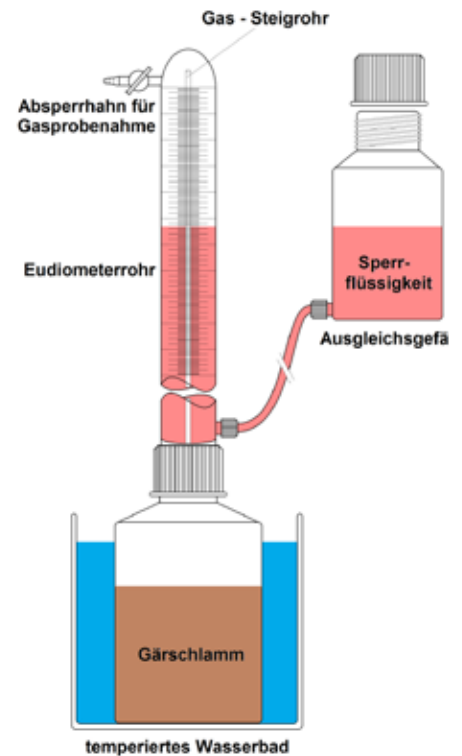










































































Abb. 9: Versuchsapparatur nach DIN 38 414-8 (Gasvolumenmessung mit Eudiometerrohr).

Enzym	Beobachtungen							Ergebnis
	0 h	48 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	
Kontrolle ohne Enzym								kein Aufweichen der Cellulosestrukturen
Cellulase <i>Trichoderma reesei</i>								sehr schneller und vollständiger Abbau
Cellulase <i>Trichoderma viride</i>								vollständiger Abbau, langsamer als mit <i>T. reesei</i> -Cell.
Cellulase <i>Onozuka Trichoderma viride</i>								unvollständiger Abbau
Cellulase <i>Aspergillus niger</i>								kein Abbau
Cellulase- Xylanase (Novaplus)								schneller und vollständiger Abbau

Tab. 4: Vorscreening der Enzyme mit Cellulaseaktivitäten (nur 2 Versuche der Dreifachbestimmung dargestellt).

Substrat	Enzyme	Beobachtungen						Ergebnis	Abbauprodukte [mg/ml]
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	7 d		
Cellulose	Cellulase							sich auflösender Cellulosestreifen, nach 4 Tagen Suspension	Glucose: 11
	Novaplus							sich auflösender Cellulosestreifen, nach 5 Tagen Suspension	Glucose: 9
	Pansensaft							sich auflösender Cellulosestreifen, nach 5 Tagen Suspension	Glucose: 0
Xylan (Hemicellulose)	Novaplus							klare Lösung, keine sichtbare Veränderung	Xylose: 7,3
	Pansensaft							Trübung durch Pansensaft, keine sichtbare Veränderung	Glucose: 0 Xylose: 0
Lignin	Laccase 25 °C / 39 °C (keine Unterschiede)							sehr dunkle Lösung, keine sichtbare Veränderung	
	Pansensaft							Lösung dunkler als reiner Pansensaft, keine sichtbare Veränderung	
Stroh	Cellulase							Schwimm- schicht, keine erkennbaren Strukturveränderungen am Substrat, Lösung wird gelb	Glucose: 0,1 Xylose: 0,28
	Novaplus							analog Cellulase	Glucose: 0,1 Xylose: 0,24
	Enzymmix: Cellulase Novaplus							analog Cellulase	Glucose: 0,2 Xylose: 0,24
	Pansensaft							analog Cellulase	Glucose: 0,9 Xylose: 0,24
	Kontrolle in Puffer							Schwimm- schicht, keine erkennbaren Strukturveränderungen am Substrat, klare farblose Lösung	Glucose: 0 Xylose: 0
TDH-Stroh	siehe Stroh	keine erkennbaren Unterschiede zu Versuchen mit Stroh ohne TDH-Behandlung (daher nicht dargestellt)							

Tab. 5: Ergebnisse der Vorbehandlung von zerkleinertem Stroh im Vergleich zu thermdruckvorbehandeltem Stroh sowie den Einzelsubstraten Cellulose (Filterpapier), Xylan (hellbeiges Pulver) und Lignin (schwarzes Pulver).





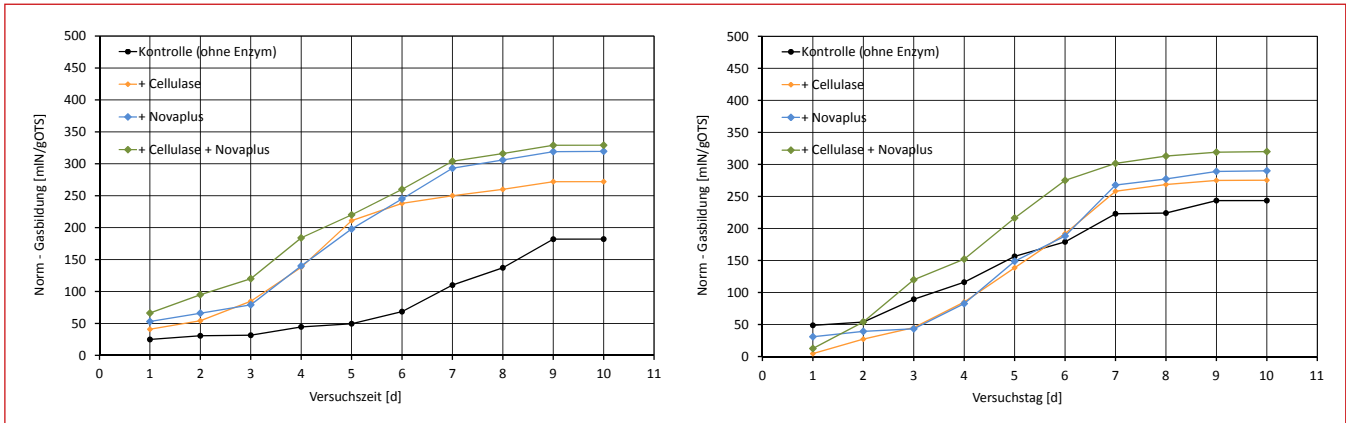


Abb. 10: Verlauf der Biogasausbeuten aus Stroh mit Gülle als Inokulum a) Stroh ohne Vorbehandlung b) TDH vorbehandeltes Stroh.

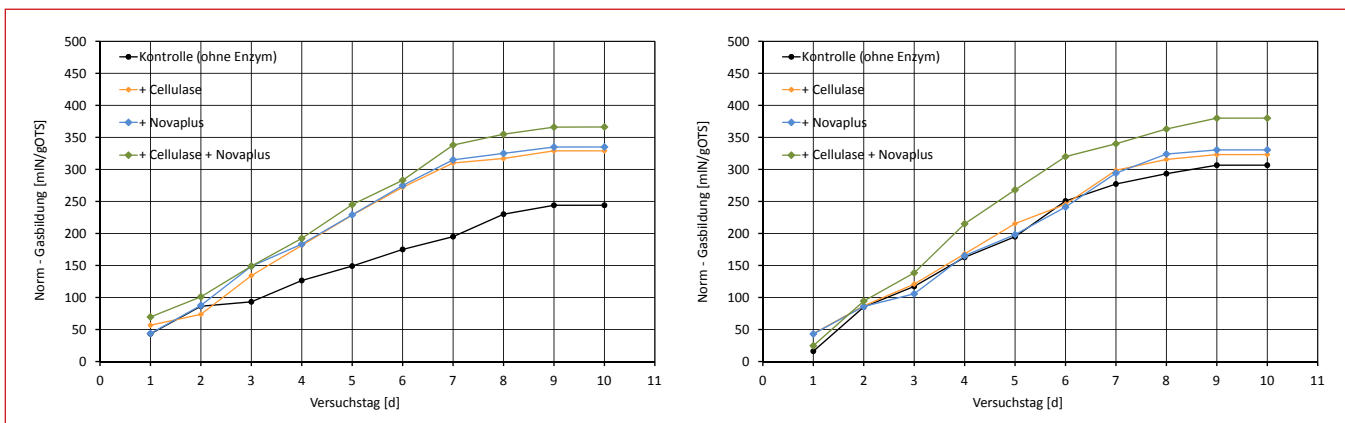


Abb. 11: Verlauf der Biogasausbeuten aus Stroh mit Pensensaft als Inokulum a) Stroh ohne Vorbehandlung b) TDH vorbehandeltes Stroh.

lymere im Stroh erkennbar. Die höheren Glucosegehalte weisen auf einen etwas schnelleren Abbau gegenüber isolierten Enzymen hin. Vergleicht man den Abbau von Stroh und den Modellsubstraten mit Pensensaft, so stellt man fest, dass nur bei den langsam abbaubaren Strukturpolymeren im Stroh Glucose und Xylose nachgewiesen werden konnten. Eine plausible Erklärung ist, dass die Modellsubstrate leichter abbaubar sind und die gebildeten Zucker daher schneller zu Fettsäuren und Gasen weiterreagieren können. Das ist auch in Biogasanlagen und im Pensan der Kuh der Fall, die bei schnell abbaubaren Kohlenhydraten wie Stärke versäuern (Pansenacidose) und dann mit faserreichen Substraten gefüttert werden [6, 8]. Durch eine TDH-Behandlung des Strohs konnten geringfügig höhere Zuckerwerte ermittelt werden.

### 4.3 Versuche zur Vergärung von Stroh

Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, ob sich Pansenorganismen auch außerhalb der lebenden Kuh zur Vergärung von Stroh zu Biogas nutzen lassen. Ich stellte mir hierbei auch die Frage, ob durch eine enzymatische oder thermische Vorbe-

handlung der schwer vergärbare Cellulose-Anteil im Stroh besser aufgespalten werden kann, so dass höhere Biogasausbeuten erzielt werden können. Hierfür wurden die Hydrolyseansätze des enzymatischen Abbaus (Kap. 4.2.1) als Substrat für die Vergärung genutzt (mit Ausnahme der aerob arbeitenden Laccase).

Um die Wirksamkeit der Pansenorganismen beurteilen zu können, wurde Gülle, die traditionell als Impfschlamm in Biogasanlagen eingesetzt wird, vergleichend untersucht. Nach neun bis zehn Tagen kam die Gasbildung in allen Versuchen zum Erliegen. Glucose konnte nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, was für eine Weitervergärung zu Biogas spricht. Der pH-Wert in den Fermentern mit Gülle sank von 7,8 (Start) auf Werte um pH 7 (Versuchsende), was auf die zunehmende Bildung von Fettsäuren hinweist. Etwas höhere Säuregehalte wurden bei den Vergärungen mit Pensensaft nachgewiesen. Ursache hierfür könnte der schnellere Abbau des Strohs mit den Mikroorganismen im Pensensaft im Vergleich zu den Güllebakterien sein. Der pH-Wert bei diesen Versuchen war mit 6,5 etwas

niedriger. Ich konnte feststellen, dass aus Stroh mit Pensan als Inokulum stets ein deutlich höherer Gasertrag erreicht wurde als mit Gülle (Abb. 10 und 11). Die ermittelten Methangehalte lagen mit Gülle bei 56-59 Prozent und mit Pensensaft bei 55-58 Prozent. Die Methanausbeuten, die sich aus Biogasausbeute und Methangehalt ergeben, waren bei der Vergärung mit Pensensaft höher. Die höchsten Methanausbeuten wurden nach enzymatischer Vorbehandlung mit dem Enzymmix Cellulase/Novaplus erzielt. Eine vorgeschaltete Thermodruckhydrolyse führte zu keiner weiteren Steigerung, so dass aus meiner Sicht eine enzymatische Vorbehandlung von Stroh und im Anschluss daran eine Vergärung in Pensensaft zu empfehlen ist. In Abb. 12 und Abb. 13 sind die erzielten Biogas- und Methanausbeuten aus Stroh mit Gülle und Pensensaft als Inokulum gegenübergestellt.

Aus den durchgeführten Versuchen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Mit Pensensaft als Inokulum werden stets höhere Biogaserträge erzielt als mit Gülle.
- Die Vergärung von unbehandeltem

Stroh mit Pansensaft liefert um mehr als 30 Prozent höhere Biogaserträge ( $244 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ ) im Vergleich zu Gülle ( $182 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ ).

- Durch eine Thermodruck-Vorbehandlung kann die Biogasausbeute mit Pansensaft und Gülle um 25-30 Prozent im Vergleich zu unbehandeltem Stroh erhöht werden (Pansensaft  $306,5 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ , Gülle  $243,5 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ ).
- Durch enzymatische Vorbehandlung des Strohs kann der Biogasertrag fast verdoppelt werden (Pansensaft:  $329\text{-}366 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ , Gülle:  $272\text{-}329 \text{ ml}_N/\text{g}_{\text{OTS}}$ ).
- Eine enzymatische Vorbehandlung ist effektiver als die durchgeführte Thermodruckvorbehandlung (1 bar,  $120^\circ\text{C}$ ).
- Der Methangehalt im Biogas liegt immer über 55 Prozent und damit deutlich höher als im Pansen des Tieres mit ca. 20 bis 40 Prozent Methan [6].

In ersten Versuchen mit einer Steigerung des Substratanteils von 11 g/l auf bis zu 100 g/l Pansensaft erhöhte sich die Biogasausbeute proportional, Hemmungen der Biogasbildung waren nicht feststellbar. Um das mögliche Einsparpotenzial bei Nutzung von Pansen als Inokulum abschätzen zu können, habe ich die Kosten auf Basis der Methanausbeuten kalkuliert (Abb. 14). Die Kosten für die enzymatische Vorbehandlung wurden hierbei vernachlässigt, da die Enzyme nur in katalytischen Mengen zugesetzt werden. Ich konnte feststellen, dass sich die Kosten zur Erzeugung von 1 kWh Strom von 0,08 € (Gülle) auf weniger als 0,06 € bei Einsatz von Pansen senken lassen, das entspricht einer Einsparung von 25 Prozent der Kosten im Vergleich zu Gülle. Gegenwärtig nutzen die meisten Biogasanlagen in Deutschland Mais als Substrat. Für Mais werden Herstellungskosten von 0,10 €/kWh angenommen [21], bezogen darauf wäre eine Vergärung von Stroh mit Pansensaft theoretisch sogar um 40 Prozent kostengünstiger.

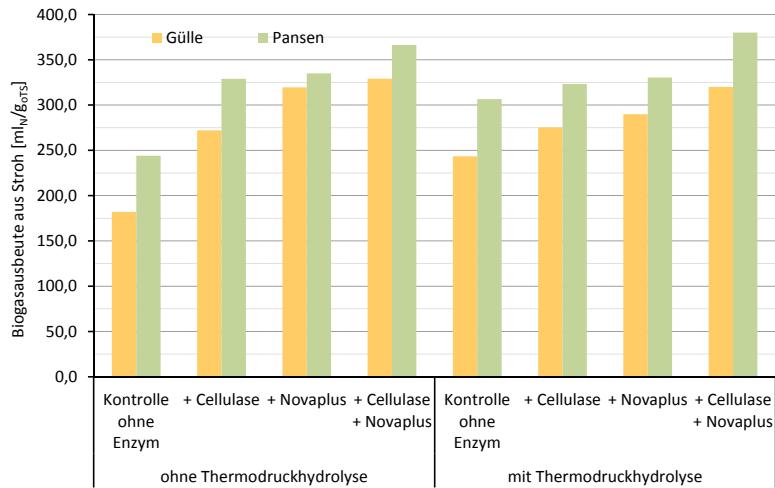


Abb. 12: Erzielte Biogasausbeuten aus Stroh mit Gülle oder Pansensaft als Inokulum.

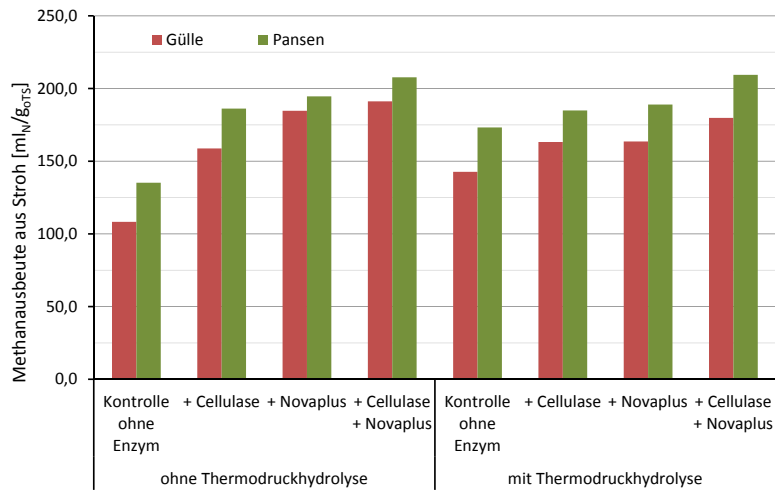


Abb. 13: Erzielte Methanausbeuten aus Stroh mit Gülle oder Pansensaft als Inokulum.

### 5 Fehlerbetrachtung

Die ermittelten Werte müssen im Zusammenhang mit möglichen Fehlerquellen betrachtet werden. Dies könnten sein:

- Bei den Vergärungen konnte ich aus zeitlichen Gründen nur eine Doppelbestimmung durchführen. Hier hätte mindestens eine Dreifachbestimmung erfolgen müssen, um auch mögliche Schwankungen in der Aktivität der Inokula (Pansensaft, Gülle) ausgleichen zu können.

- Der im Pansensaft gemessene pH-Wert lag mit 5,8 unterhalb des pH-Optimums, welches in der Literatur mit 6,5 angegeben wird [15]. Da Methanbildner einen pH-Wert um 7 bevorzugen, könnte deren Aktivität möglicherweise gehemmt gewesen sein.
- Die Ergebnisse wurden im Labor mit geringen Mengen erzielt. Eine Übertragbarkeit in einen größeren Maßstab ist zur Bestätigung erforderlich.

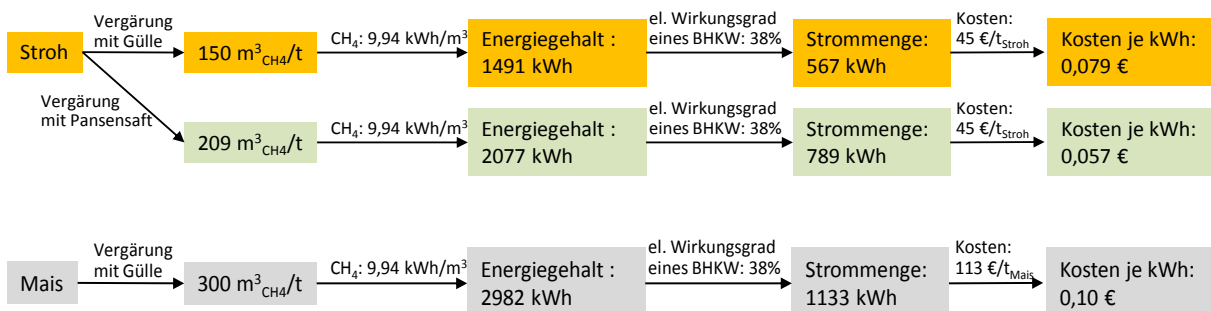


Abb. 14: Kostenkalkulation zur Stromerzeugung aus Stroh im Vergleich zu Mais.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des Projektes konnte ich zeigen, dass Pansenorganismen effektiver als Gülleorganismen Cellulose haltige Substrate wie Stroh zu Biogas abbauen und dass durch enzymatische Vorbehandlung des Strohs mit Cellulase aus *Trichoderma reesei* und/oder dem Enzympräparat Novaplus (Cellulase-/Xylanase-Aktivität) bis zu 50 Prozent höhere Biogas- und Methanausbeuten erzielt werden können.

In ersten Versuchen zur Steigerung des Substratanteils von 11 g/l Pansensaft auf 100 g/l konnte die Biogausbeute proportional erhöht werden. Um die erziel-

ten Ergebnisse zur Vergärung Cellulose haltiger Substrate mit Pansensaft als Inokulum zukünftig in der Praxis anwenden zu können, werden gegenwärtig weitere Versuche zur Substratsteigerung und zur kontinuierlichen Vergärung mit Pansensaft durchgeführt.

Mein Fazit ist, dass sich die Cellulosespaltung mit Pansensaft auch für die Biogaserzeugung außerhalb der lebenden Kuh erschließen lässt. Da sich die Aktivität der Pansenorganismen mit Hilfe eines Nährstoffmediums auch über längere Zeit in einem Fermenter aufrecht erhalten lässt, könnte der „Clou mit der Kuh“ zukünftig

auch in Pflanzenvergärenden Biogasanlagen Anwendung finden.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Biologielehrer Torsten Polity. Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei der Firma Verbio AG in Zörbig für das stetige Interesse am Projekt sowie die großzügige Unterstützung mit Informationen, Hinweisen und Sachspenden bedanken. Ebenso danke ich der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig für die Bereitstellung des Pansensaftes sowie bei allen Personen, die mein Projekt unterstützt haben.

## Quellenverzeichnis

- [1] AgrarPlus. (2013). Stroh. Abgerufen am 30. Dezember 2013 von <http://www.agrarplus.at>
- [2] Bauernhof.net. (2014). Verdauungsapparat der Kuh. Abgerufen am 18. Januar 2014 von <http://www.bauernhof.net>
- [3] Cambridge-University. (kein Datum). The Structure of Wood. Abgerufen am 15. Januar 2014 von <http://www.doitpoms.ac.uk>
- [4] DBFZ. (2011). Energetische Biomassenutzung: Schriftenreihe des BMU 02. Leipzig: Fischer Druck.
- [5] Eder, B., & Schulz, H. (2007). Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. Freiburg: Ökobuch-Verlag.
- [6] Engelhardt, W. (2010). Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke-Verlag.
- [7] FNR. (2012). Biogas. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.
- [8] FNR. (2013). Leitfaden Biogas. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.
- [9] FNR-Projekte. (2012). Projekte und Förderung. Abgerufen am 16. August 2013 von <http://www.fnr.de>
- [10] Fuchs, G. (2007). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme.
- [11] Gronauer, A. (2005). Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer Versuchsfermentoranlage zur Bearbeitung von Fragestellungen im Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Abgerufen am 31. Oktober 2013 von Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft: <http://www.lfl.bayern.de>
- [12] Hering, T. (29-30. März 2012). Gülzower Fachgespräche Band 38, 2. Internationale Fachtagung Strohennergie. Abgerufen am 3. August 2013 von Energetische Halmgutnutzung in Deutschland: <http://www.mediathek.fnr.de>
- [13] Kaltschmitt, M. (2009). Energie aus Biomasse. Heidelberg: Springer-Verlag.
- [14] KTLB. (2005). Gasausbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Darmstadt: KTLB.
- [15] Madigan, M. T. (2006). Brock Mikrobiologie. München: Pearson Studium.
- [16] Meine, N., Hilgert, J., Kaldstrom, M., Rinaldi, R., Schüth, F. (2013). Katalytisches Vermahlen: Ein neuer Zugang für Lignocellulose-Bioraffinerien. Abgerufen am 30. Dezember 2013 von <http://www.mpg.de>
- [17] Munk, K. (2001). Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- [18] NeueOZ. (3. Januar 2014). Deutschlands erstes Strohheizkraftwerk bald in Betrieb. Abgerufen am 4. Januar 2014 von Neue Osnabrücker Zeitung: <http://www.noz.de>
- [19] Pacan, B., & Dröge, S. (2009). Stoffliche und energetische Nutzung von Stroh. Abgerufen am 4. August 2013 von <http://www.pfi-biotechnology.de>
- [20] Probst, W. (2004). Duden Biologie (Abitur). Berlin: Paetec.
- [21] Reinhold, G. (29-30. März 2012). Gülzower Fachgespräche Band 38 - 2. Internationale Fachtagung Strohennergie. Abgerufen am 3. August 2013 von Vergärung von Stroh - Stand und Perspektiven: <http://www.mediathek.fnr.de>
- [22] Rinaldi, R., & Schüth, F. (April 2009). Mit Salz aus Holz Zucker gewinnen. Spektrum der Wissenschaft, S. 20-22.
- [23] Schütte, A. (29-30. März 2012). Gülzower Fachgespräche Band 38, 2. Internationale Fachtagung Strohennergie. Abgerufen am 3. August 2013 von Förderung der Strohnutzung in Deutschland: <http://www.mediathek.fnr.de>
- [24] Verbio. (16. März 2012). Verbio weiht weltweit erste Strohverarbeitungsanlage zur Biomethanproduktion ein. Abgerufen am 4. August 2013 von <http://www.verbio.de>