

# Projekt BiberZym: Enzyme aus dem Verdauungstrakt des Bibers und mögliche Anwendungen im Biogasbereich

Nils Engler



Biogas Fachgespräch "Substratdesintegrationsverfahren – Aktuelles aus der Forschung"

# Inhalt

- Hintergrund und Zielstellung des Vorhabens
- Projektpartner
- Projektstruktur und Ablauf
- Ergebnisse: Verdauung von Lignocellulose durch den Biber
- Ergebnisse: Isolation von Mikroorganismen aus dem Darm-Mikrobiom
- Ergebnisse Vergärungsversuche: Biomethanertrag
- Ergebnisse Vergärungsversuche: Rheologische Eigenschaften
- Fazit und Ausblick

# Hintergrund und Zielstellung

- Biber ernähren sich besonders im Winterhalbjahr nahezu ausschließlich von lignocellulosehaltigem Material wie Rinde, Zweige, Vollholz.
- Anders als bei Wiederkäuern wird Zellulose durch Biber in nur einem Magen verdaut (hind-gut-fermentation).
- Es wird vermutet, dass die aktiven Mikroorganismen zur Produktion der benötigten Enzyme in einem vergrößerten Blinddarm (caecum) siedeln.
- Das Darm- Mikrobiom des Bibers ist nur wenig erforscht, da die Art (in Europa) zwischenzeitlich nahezu ausgestorben war.



**Ziel: bisher nicht nutzbare Reststoffe für die Energieerzeugung in Biogasanlagen erschließen:**

- Landschaftspflegematerial
- Material der Gewässerpflege
- Straßenbegleitgrün
- Spelzen, Schäben
- industrielle biologische Reststoffe
- .....

**BiberZym**

# Projektpartner



## Deutsches Biomasseforschungszentrum (DBFZ)

- Projektleitung
- Analyse der Bibernahrung
- Beschaffung und Aufbereitung der biologischen Proben (Darminhalte)
- Durchführung von Vergärungstests in Laborreaktoren mit Enzymapplikation



## TU Dresden, Institut für Naturstofftechnik, Professur Bioverfahrenstechnik

- Charakterisierung des Darm-Mikrobioms aus den gelieferten Proben
- Isolierung einzelner Mikroorganismen auf Gattungsebene
- Produktion von Enzymen im Labormaßstab
- Labortests zur Enzymaktivität



# Projektpartner (II)



## GEDO: Gewässer und Deichverband Oderbruch

- Bereitstellung von geeignetem biologischen Material der Biber, die im Rahmen des Bestandsmanagements entnommen werden
- Unterstützung bei der Gewinnung realer Feldproben der jeweils saisonalen Bibernahrung

## Bibermanagement Naturpark Dübener Heide

- Unterstützung bei der Gewinnung realer Feldproben der jeweils saisonalen Bibernahrung

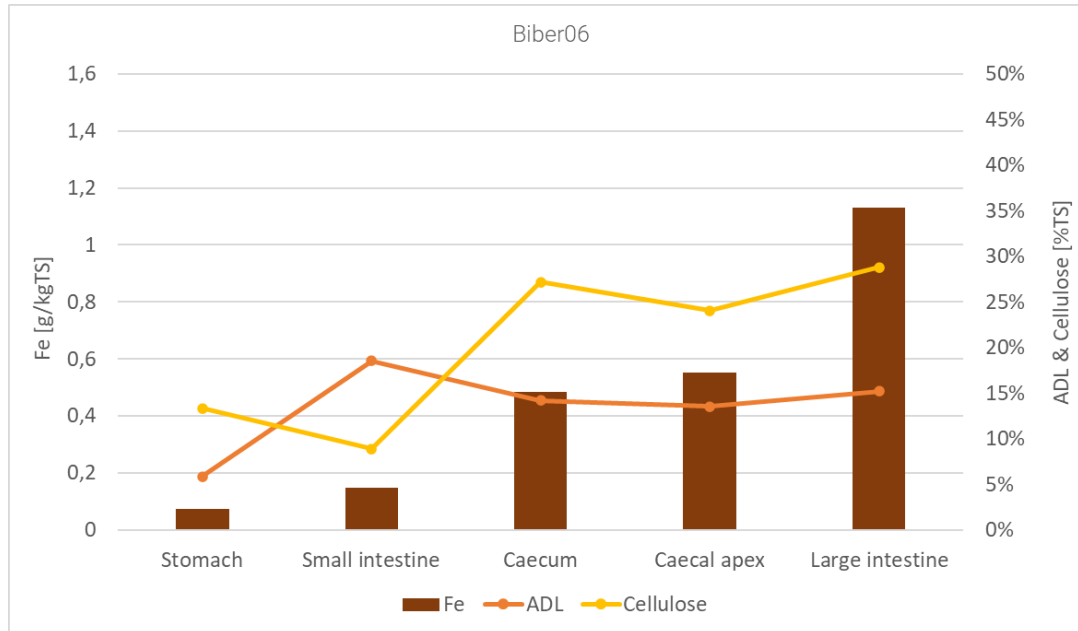


# Projektstruktur



# Ergebnisse: Verdauung von Lignocellulose durch den Biber

Im Projektverlauf wurden bisher 8 Tiere bereitgestellt und Proben aus verschiedenen Abschnitten des Verdauungstraktes entnommen.



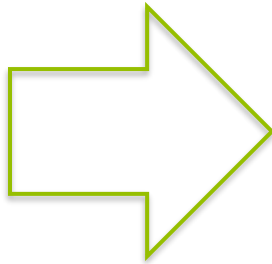
Verlauf der Konzentration von Cellulose und Lignin (ADL) im Vergleich zu einem Inertmarker (Fe) :

- Durch den stetigen Abbau (Verdauung) der Organik steigt der Inertmarker konstant an.
- ADL steigt nicht in gleichen Maße, wird also im Verlauf der Verdauung abgebaut.
- Blinddarm (caecum) und Blinddarmspitze (caecal apex) sind hier die Zentren.
- Die Verdauung der Cellulose beginnt bereits im Dünndarm .

# Ergebnisse: Verdauung von Lignocellulose durch den Biber

Enzymaktivitätstest der TU Dresden bestätigen dies: Blinddarm und Blinddarmspitze stellen das enzymatische Zentrum für die Verdauung der Nahrung dar.

- Magen
- Dünndarm
- Blinddarm
- Blinddarmspitze
- Dickdarm



| Abschnitt\Enzym | Amylasen<br>[U/L] | Xylanasen<br>[U/L] | Cellulasen<br>[U/L] | Pektinasen<br>[U/L] | Lipasen<br>[U/L] |
|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Magen           | 47,04             | 49,01              | 21,16               | 35,05               | 8,33             |
| Dünndarm        | 2033,08           | 108,01             | 10,63               | 26,01               | 1058,33          |
| Blinddarm       | 346,77            | 115,53             | 41,15               | 53,73               | 600,00           |
| Blinddarmspitze | 307,67            | 95,51              | 36,13               | 71,57               | n.d.             |
| Dickdarm        | 532,55            | 53,78              | 11,13               | 16,01               | 400,00           |

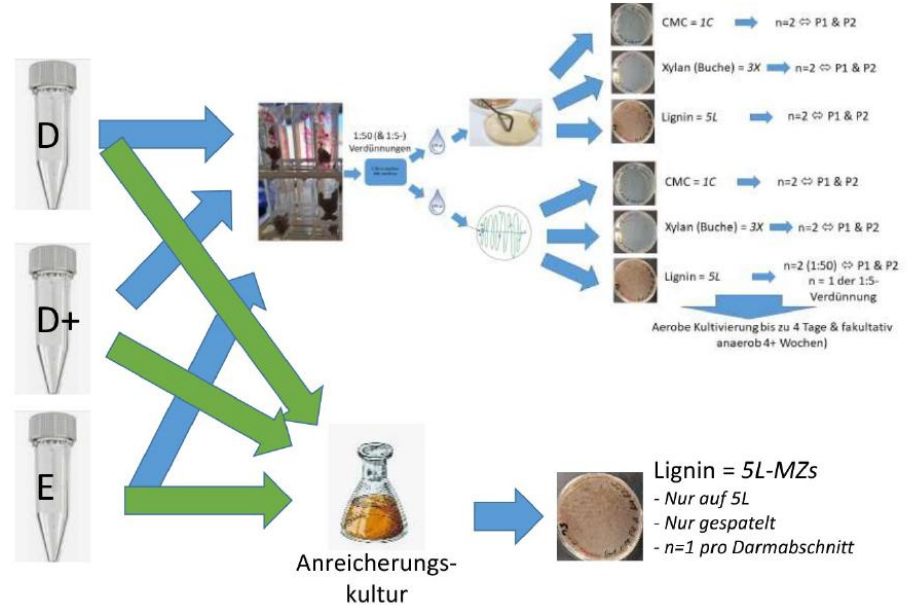
Ergebnisse von Enzymaktivitätstests von Proben aus den einzelnen Abschnitten des Verdauungstraktes

# Ergebnisse: Isolate von MO aus dem Darm-Mikrobiom (TU Dresden)

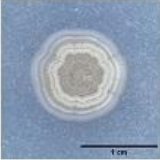
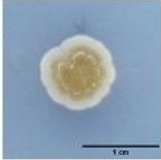
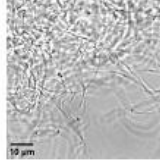
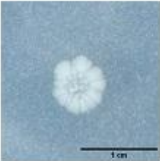
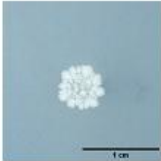
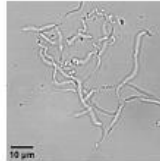
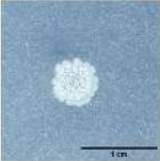
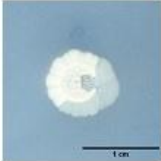
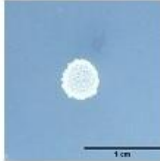
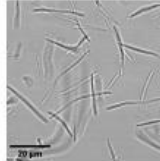
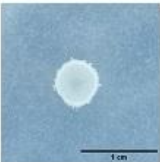
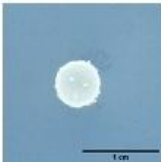
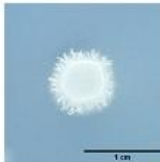
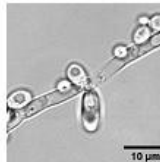
Isolierung vielversprechender, enzymbildender Mikroorganismen auf Komplexmedium

Weiterkultivierung der Isolate auf verschiedenen Selektivmedien

Identifikation von Isolaten mit hoher Enzymaktivität auf mehreren Medien (Cellulose-Xylan- Stärke- und Pektinmedium)



# Ergebnisse: Isolate von MO aus dem Darm-Mikrobiom (TU Dresden)

| Isolate<br>Seq (16S/18S)            | Colony morphology                                                                 |                                                                                   |                                                                                   | Cell morphology                                                                    |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     | Cellulose agar                                                                    | Xylan agar                                                                        | Starch agar                                                                       | Light microscopy                                                                   |
| <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> |  |  |  |  |
| <i>Bacillus sp.</i>                 |  |  |  |  |
| <i>Bacillus megaterium</i>          |  |  |  |  |
| <i>Candida albicans</i>             |  |  |  |  |

- Vier Isolate zeigten starkes Wachstum auf mindestens drei Selektivmedien.
- Diese MO sind vielversprechende Kandidaten im Sinne der Projektziele.
- *S. thermoviolaceus* als leicht kultivierbarer und nicht pathogener Organismus für die Applikation in Biogas- Gärversuchen gewählt.

# Ergebnisse: Vergärungsversuche

## Versuchsdesign

- Kontinuierliche Gärtests in 6 Laborreaktoren ( $V=15\text{ L}$ ).
- 3 Reaktoren mit Behandlung: einmal wöchentlich Zugabe von MO-Kultur, Zugabe in Substratvorlage für Wochenendfütterung.
- 3 Reaktoren als Kontrollgruppe: identische Fütterung (Menge und Zusammensetzung), jedoch autoklavierte MO-Kultur.
- Substratauswahl: Abfallbiomassen mit hohem Anteil an Lignocellulose, um mögliche Effekte deutlich zu sehen.
- Neben der Biogas- und Methanproduktion werden auch rheologische Parameter regelmäßig gemessen.

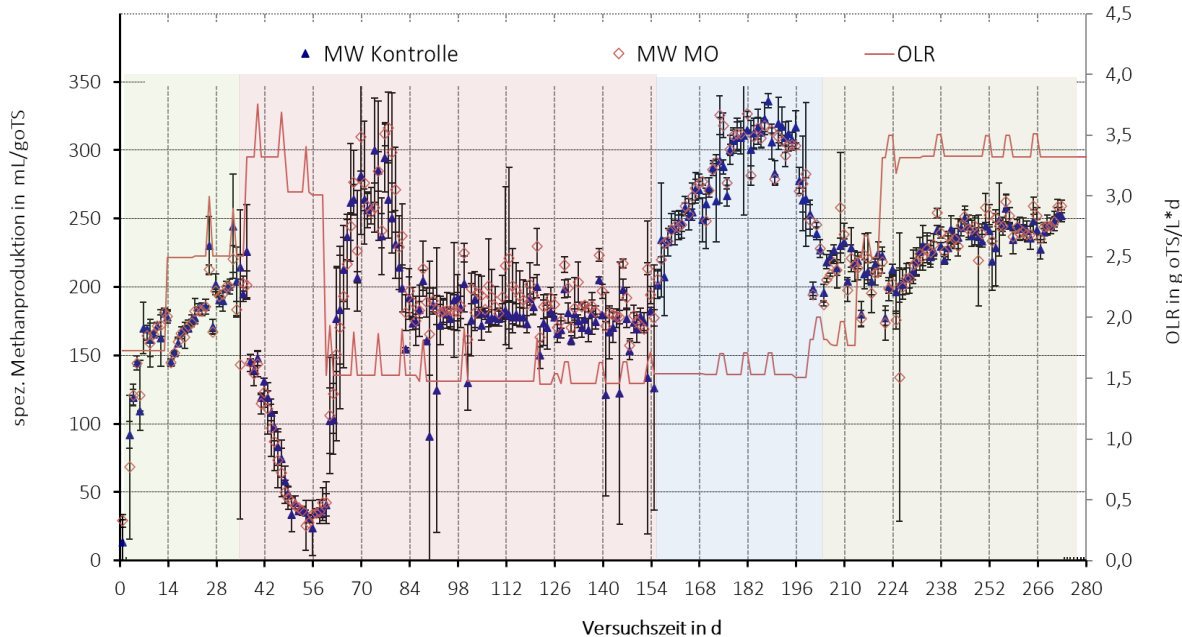
# Ergebnisse: Vergärungsversuche

## Substrate

| von-bis<br>(Versuchstag) | Substrat 1<br>Anteil in % FM | Substrat 2<br>Anteil in % FM |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 - 36                   | Gerstenspelzen 25 %          | Rindergülle 75 %             |
| 37-153                   | Hanfschäben 20 %             | Rindergülle 80 %             |
| 154-199                  | Gewässerpflegematerial 80 %  | Rindergülle 20 %             |
| ab 200                   | Getreideausputz 20 %         | Rindergülle 80%              |

# Ergebnisse: Vergärungsversuche

## spezifische Methanproduktion

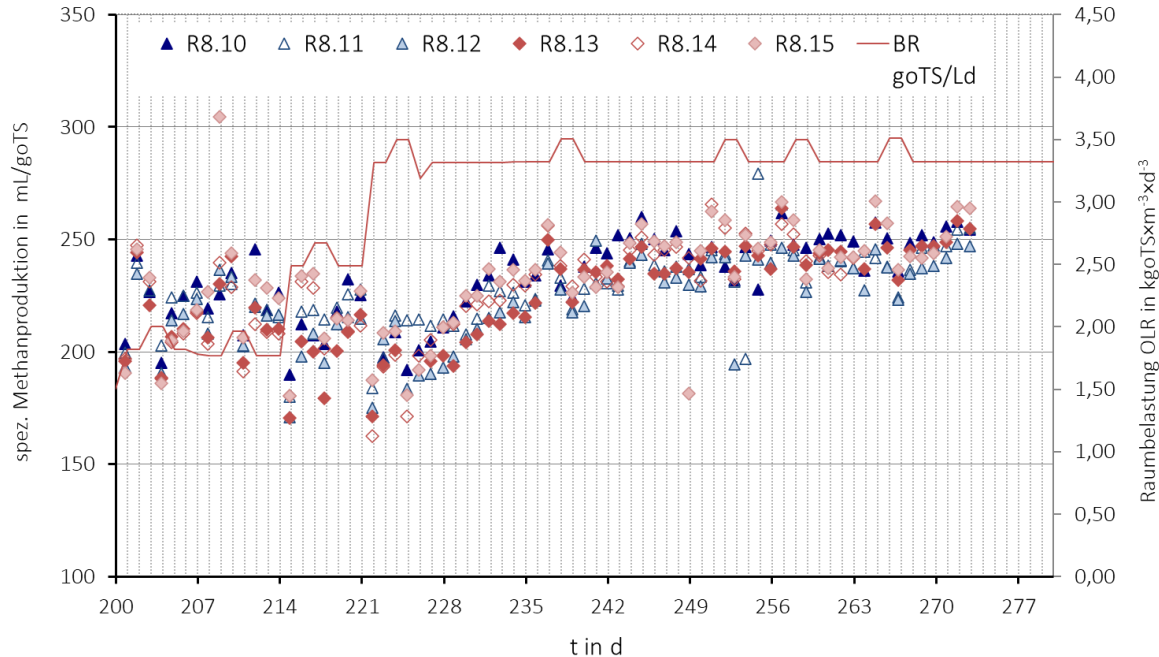


- Aus den Tageswerten kein klarer Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung erkennbar.
- Hohe Varianz innerhalb der Gruppen.
- Gruppenmittelwerte für spezif. Methanbildung bei beiden Gruppen gleich.

- Gerstenspelzen
- Hanfschäben
- Gewässerpflagematerial
- Getreideaussputz

# Ergebnisse: Vergärungsversuche

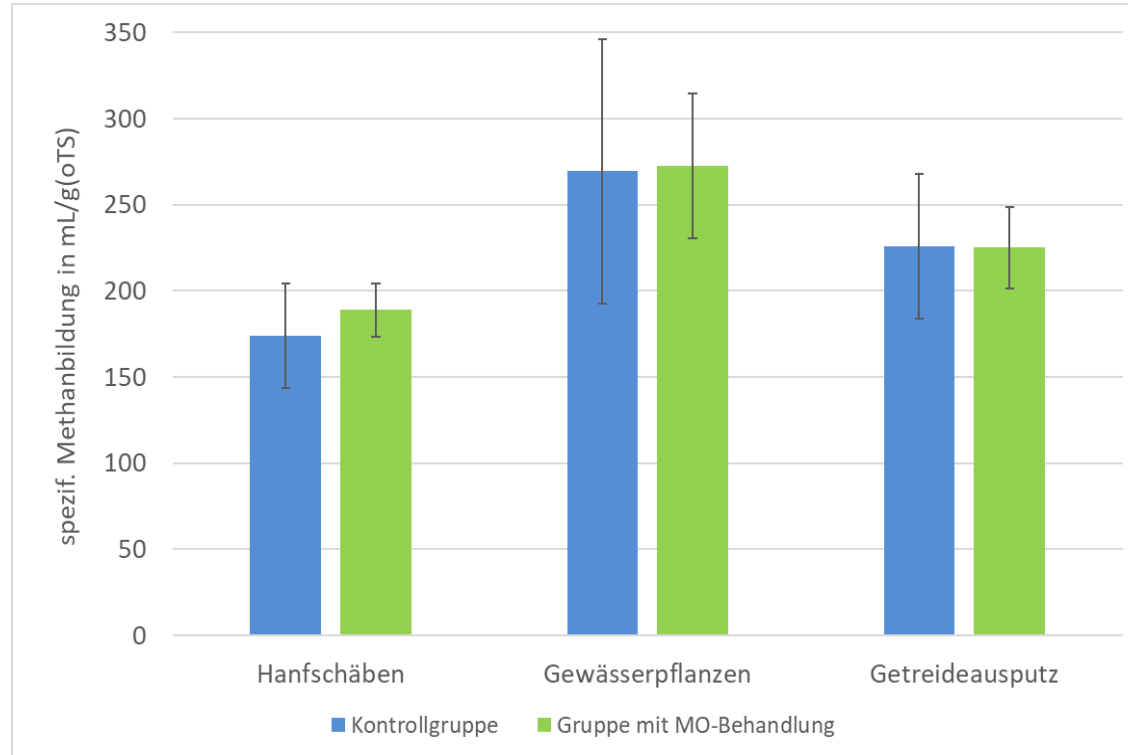
## Vergleich Kontrollgruppe / Behandlung



- Spezifische Methanbildung seit Beginn Fütterung Getreideausputz.
- Stabiler Betrieb bei Raumbelastung 3,2.
- Kein erkennbarer Einfluss der MO-Zugabe auf den spezifischen Methanertrag.
- Varianz innerhalb der Gruppen ist hoch

# Ergebnisse: Vergärungsversuche

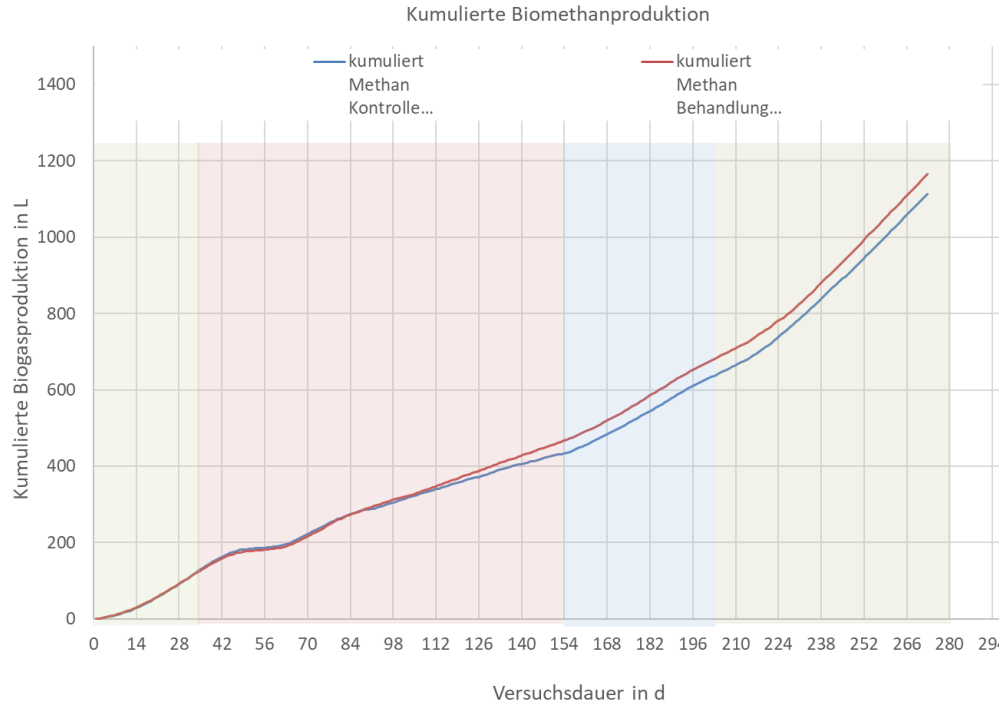
## Vergleich Kontrollgruppe / Behandlung



- Spezifische Methanbildung: Mittelwerte der behandelten Variante liegen immer über denen der Kontrollgruppe
- Unterschied nicht statistisch signifikant, da Varianz innerhalb der Gruppen hoch
- Varianz der behandelten Gruppe stets deutlich unter der Varianz der Kontrollgruppe

# Ergebnisse: Vergärungsversuche

## Vergleich Kontrollgruppe / Behandlung

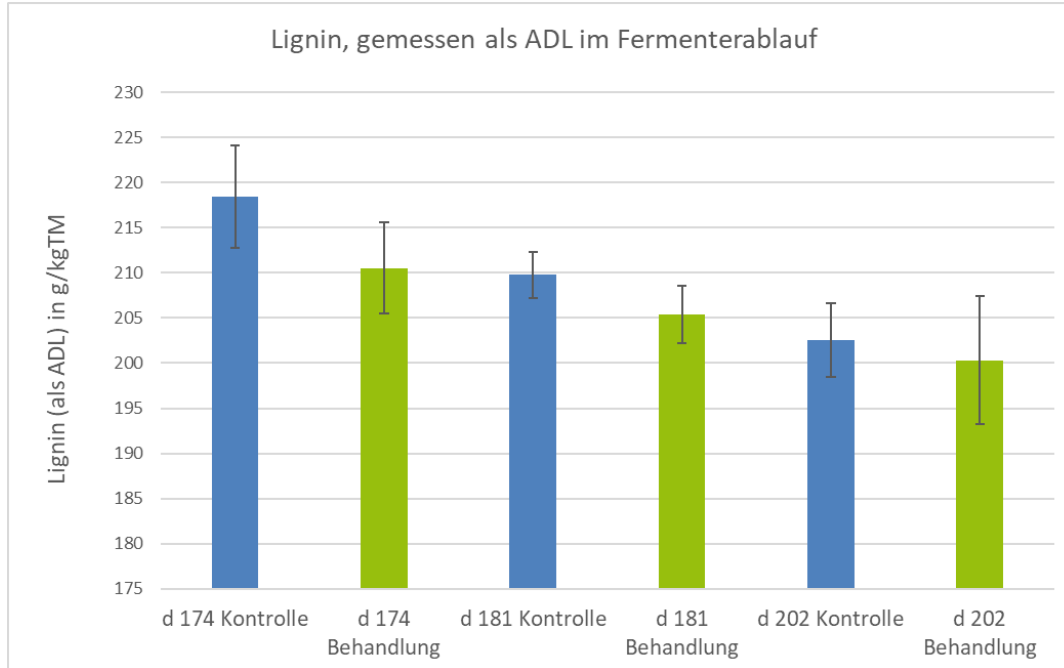


- Methanvolumen: bei kumulierter Darstellung summieren sich kleine Unterschiede auf.
- Dargestellt ist der kumulierte Methanertrag für Kontrollgruppe und Gruppe mit MO-Behandlung
- Langsames, aber stetiges Auseinanderlaufen der beiden Gruppen

-  Gerstenspelzen
-  Hanfschäben
-  Gewässerpflagematerial
-  Getreideausputz

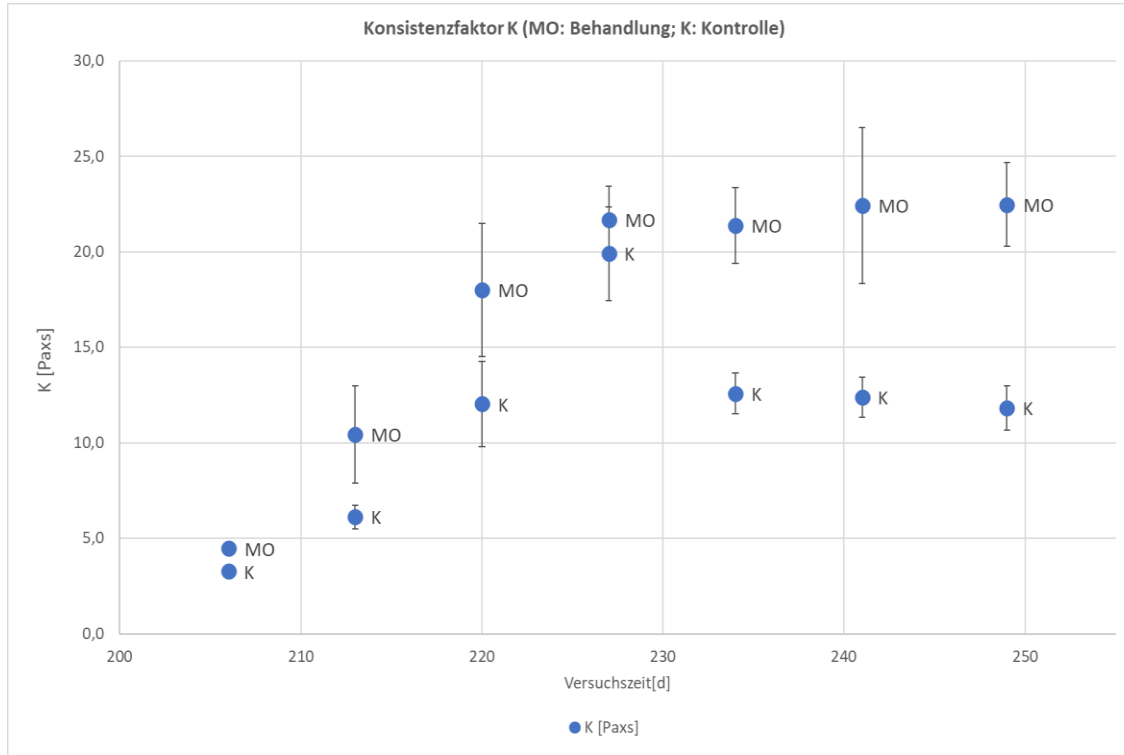
# Ergebnisse: Vergärungsversuche

## Vergleich Kontrollgruppe / Behandlung



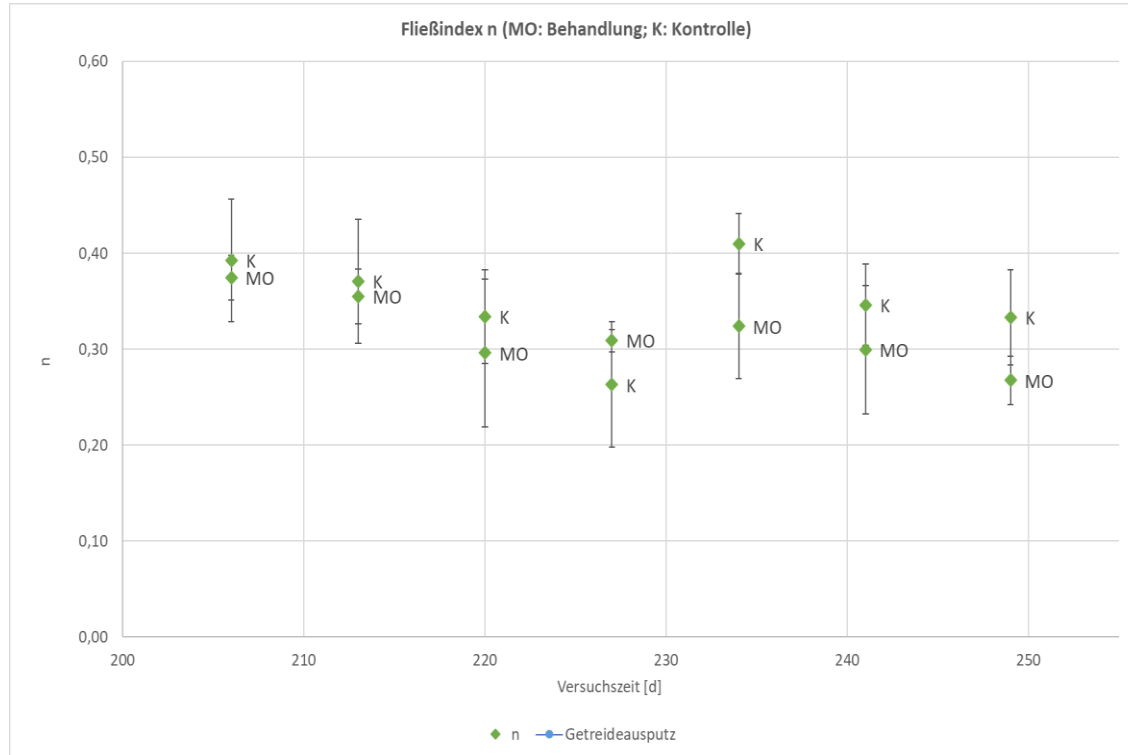
- Dargestellt ist der Zeitraum, in dem Gewässerpflagematerial (GPM) gefüttert wurde.
- Der Einfluss des vorherigen Inputs (Hanfschäben) ist zu Beginn noch deutlich vorhanden.
- Die Konzentration von Lignin (bestimmt als ADL nach van Soest) ist in der behandelten Gruppe stets niedriger als in der Kontrollgruppe.
- Die Unterschiede werden mit der Zeit geringer, weil der Einfluss des GPM dominiert.

# Ergebnisse: Vergärungsversuche Rheologie der Fermenterinhalt



- Konsistenzfaktor K : Vergleich Kontrollgruppe (K) -Behandlung (MO), Substrat: Getreideauszut
- K ist in der unbehandelten Kontrollgruppe niedriger. (!)
- Beobachtung: wesentlich homogenerer Fermenterablauf in Behandlungsgruppe und gleichmäßigere Partikelverteilung, insgesamt feinere Partikel.

# Ergebnisse: Vergärungsversuche Rheologie der Fermenterinhalt



- Fließindex  $n$  : Vergleich Kontrollgruppe (K) -Behandlung (MO), Substrat: Getreideausputz.
- kleinerer Fließindex  $n$  in der Gruppe mit Behandlung: stärker ausgeprägtes scherverdünnendes Fließverhalten.
- Tendenziell wird die Differenz zwischen Kontrolle und Behandlung größer.

# Zusammenfassung und Ausblick (I)

- Das Mikrobiom im Darm des Bibers ist äußerst vielfältig. Es konnten ca. 14 vielversprechende Stämme isoliert werden.
- Isolate aus dem Verdauungstrakt des Bibers zeigen hohe enzymatische Abbauleistungen auf Selektivnährböden.
- Im Laborversuch konnte mit dem Organismus *S. thermoviolaceus* für verschiedene Substrate kein signifikant erhöhter Biomethanertrag bei regelmäßiger Applikation erzielt werden.
- Es gibt aber mehrere Hinweise darauf, dass durch die Applikation ein verbesserter Substratumsatz erzielt wurde.

# Zusammenfassung und Ausblick (II)

- Geringere Varianz in der Kontrollgruppe und höherer spezifischer Methanertrag bei kumulierter Auswertung deuten auf einen Effekt hin.
- Die rheologischen Messungen zeigten einen klaren Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Behandlung. Das Ansteigen des Konsistenzfaktors in der behandelten Gruppe ist ein so nicht erwartetes Ergebnis.
- Die ersten Ergebnisse der Faseranalytik (Faserfraktionen nach van Soest) zeigen bereits einen verbesserten Abbau von ADL, Daten liegen noch nicht vollständig vor.
- Die Versuche werden bis Projektende mit Getreideausputz und unter Einsatz einer Mischung aus vier Mikroorganismen fortgeführt.

# Projektförderung



Das diesem Vortrag zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat unter dem Förderkennzeichen 2221NR031A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.

Die Tötung der Tiere erfolgte in Einklang mit den gesetzlichen Deutschen und Europäischen Vorschriften und nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden im Rahmen des Bestandsmanagements. Durch das Projekt werden keinerlei Anreize geschaffen, über die ohnehin erforderlichen Maßnahmen hinaus zusätzliche Tiere zu töten.



## Smart Bioenergy – Innovationen für eine nachhaltige Zukunft

### Kontakt:

**Dr. Franziska Schäfer (DBFZ)**

[franziska.schaefer@dbfz.de](mailto:franziska.schaefer@dbfz.de)

**Lieselotte Van Looveren (DBFZ)**

[Lieselotte.VanLooveren@dbfz.de](mailto:Lieselotte.VanLooveren@dbfz.de)

**Dr. Nils Engler (DBFZ)**

[nils.engler@dbfz.de](mailto:nils.engler@dbfz.de)

**Dr. Anett Werner (TU Dresden)**

[anett.werner@tu-dresden.de](mailto:anett.werner@tu-dresden.de)

**Dr. Marlen Zschätzsch (TU Dresden)**

[marlen.zschaetzsch@tu-dresden.de](mailto:marlen.zschaetzsch@tu-dresden.de)

**DBFZ Deutsches  
Biomasseforschungszentrum  
gemeinnützige GmbH**

Torgauer Straße 116

D-04347 Leipzig

Tel.: +49 (0)341 2434-112

E-Mail: [info@dbfz.de](mailto:info@dbfz.de)

[www.dbfz.de](http://www.dbfz.de)

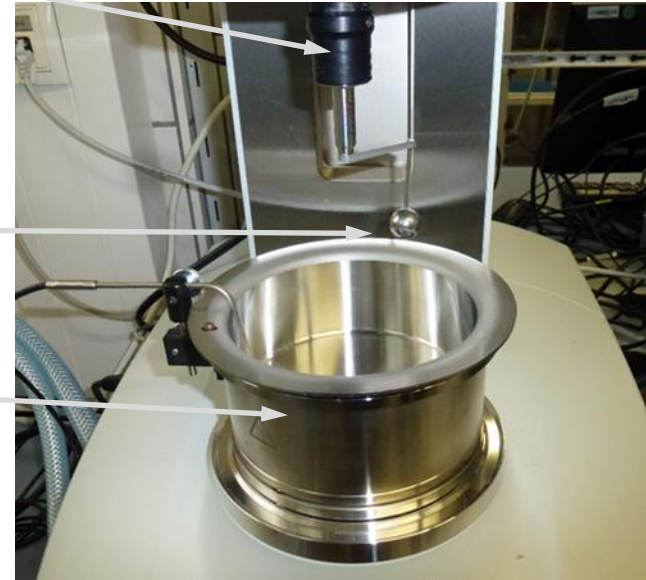
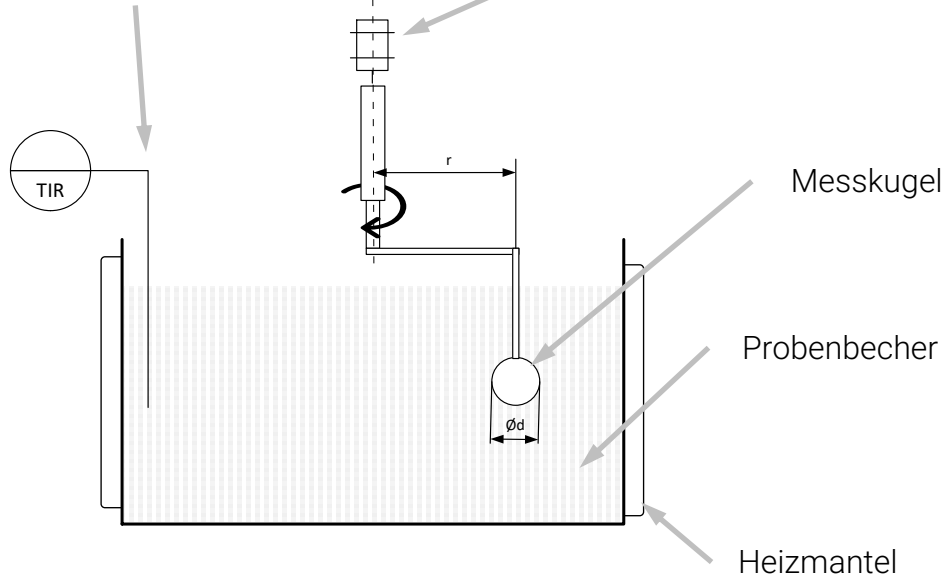
# Ergänzende Informationen Rheologische Messungen

Messaufbau schematisch:

Temperaturfühler

Antrieb

am Rheometer



BiberZym

# Ergänzende Informationen

## Rheologische Messungen

- Fermenterproben werden bei der Betriebstemperatur des jeweiligen Fermenters gemessen (Probe wird im Wasserbad vortemperiert).
- Füllhöhe im Probenbecher ist für alle Proben gleich, wird mit einer Einfüllhilfe kontrolliert.
- Messzeiten je Scherratenbereich sind so festgelegt dass die Kugel maximal eine volle Umdrehung fährt, dabei wird ein Scherratenbereich von  $0,005 \dots 50 \text{ s}^{-1}$  durchfahren (4 Dekaden → 41 Messpunkte).
- Messung von vier Fließkurven, jeweils mit neuem vortemperiertem Probenmaterial → 2 L Probe werden benötigt.
- Berechnung einer mittleren Fließkurve aus  $n=4$ .
- Berechnung der Parameter  $K$  und  $n$  nach OSTWALD-DE WAELE aus der gemittelten Fließkurve.

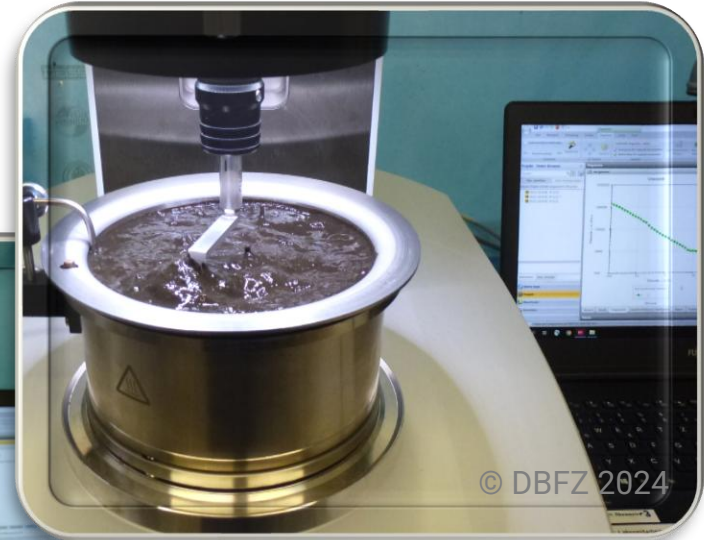
# Ergänzende Informationen Rheologische Messungen



Probe Hauptfermenter



Probe Gärproduktlager



Probe Nachgärer

# Ergänzende Informationen Rheologische Messungen

## Ergebnisprotokoll

Messung mit Kugelmesssystem

Rheometer Paar MCR 92 BM 15

### 1. Daten zur Messung

|                 |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Datum:          | 20.10.25                  |
| Proben-ID:      | BK-25-2011                |
| Beschreibung:   | R8.13_14_15 MO Zugabe BZ1 |
| Messtemperatur: | 39,0 °C                   |
| Operator:       | Lieselotte                |

### 2. Ergebnisse

auswertbarer Scherratenbereich

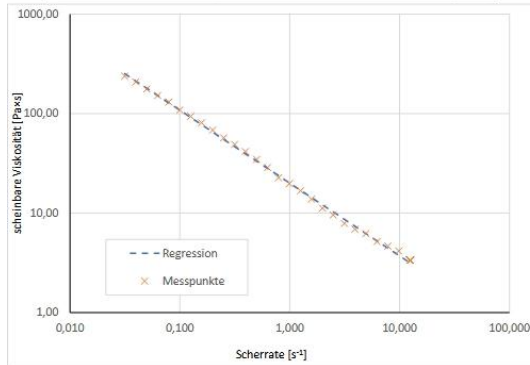
|     |                        |
|-----|------------------------|
| von | 0,0315 s <sup>-1</sup> |
| bis | 12,5 s <sup>-1</sup>   |

Ergebnisse Regression (Fließfunktion nach Ostwald-de Waele)

|                            |       | SD    |
|----------------------------|-------|-------|
| Konsistenzfaktor K in Pa·s | 22,5  | 2,2   |
| Fließindex n               | 0,268 | 0,025 |

Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup>  
der Regression

0,990

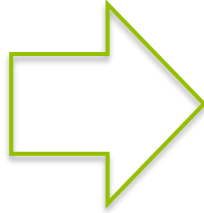
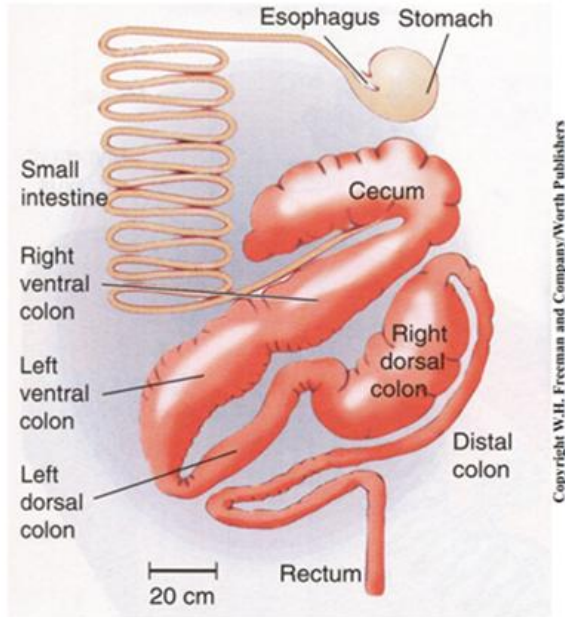


Ergebnis der Messung ist ein standardisiertes  
Ergebnisprotokoll. Es werden ausgegeben:

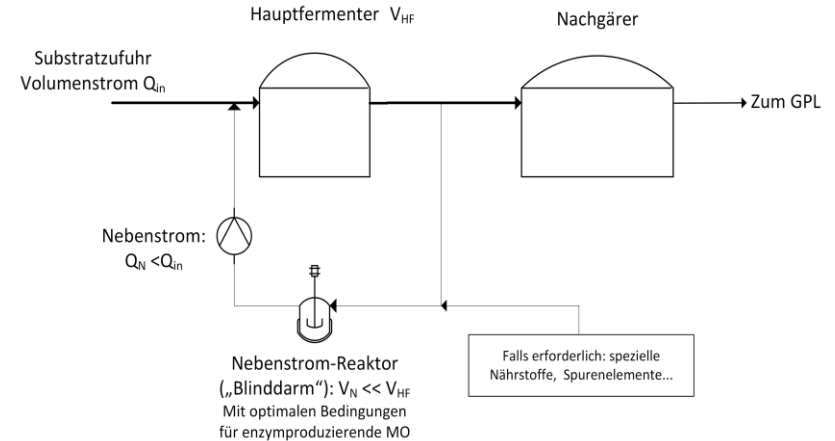
- auswertbarer Scherratenbereich (Messung ist gültig, wenn mindestens zwei Dekaden umfassend)
- Konsistenzfaktor K einschließlich RSD
- Fließindex n einschließlich RSD
- Regressionsgüte (Messung ist gültig, wenn  $R^2 > 0,97$ )

# Ergänzende Informationen: mögliche technische Umsetzung

Verdauungssystem des Bibers  
(schematisch)



Mögliche technische Nachbildung des  
Prinzips an einer Biogasanlage



BiberZym