



TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit

**Anaerobe Hydrolyse von Cellulose im  
vollsynthetischen Medium**  
Einfluss von Elicitoren auf die Celluloseabbaukinetik und  
cellulolytische Leitspezies

**Herbert Goldinger**

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Magnus Fröhling  
Prüfer\*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Volker Sieber  
2. Prof. Dr. Bastian Blombach

Die Dissertation wurde am 03.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 01.02.2023 angenommen.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Volker Sieber bedanken, der mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglichte und in unsicheren Zeiten des Projekts die Weiterführung sichergestellt hat.

Danke auch an die Bayerische Forschungstiftung und die Agraferm GmbH für die Finanzierung dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Doris Schieder für ihre Geduld, Motivation, Erfahrung und ihr stets offenes Ohr. Ihre Anleitung gab mir in der Zeit der Forschung und beim Schreiben dieser Arbeit stets Orientierung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Irmgard Urban für ihre Hilfe beim täglichen Arbeiten im Labor und der Fermenterbetreuung auch am Wochenende bedanken. Auch Herrn Manuel Döring ein großes Dankeschön für die Fermenterbetreuung.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen des Lehrstuhls für Chemie biogener Rohstoffe für ihre Beiträge zu dieser Arbeit und die vielen fachlichen und außerfachlichen Diskussionen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Ehefrau und meiner Familie bedanken, die mich bei diesem Projekt immer unterstützt haben und viele Stunden auf mich verzichten mussten.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
Zusammenfassung .....	VII
Abstract .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Bedeutung der Biogastechnologie - die energetische Nutzung von Biomasse .....	1
1.2 Bedeutung der Biogastechnologie - die Nutzung von Biogas in Europa .....	1
2 Biogaserzeugung aus Cellulose .....	3
2.1 Die Schritte der Biogasproduktion .....	3
2.1.1 Hydrolyse .....	3
2.1.2 Acidogenese .....	3
2.1.3 Acetogenese .....	4
2.1.4 Methanogenese .....	5
2.1.5 Die Biogaserzeugung als Gesamtprozess .....	6
2.2 Cellulose als Rohstoff und Energieträger .....	8
2.2.1 Überblick über die bedeutendsten Lignocellulosequellen und derzeit verwendeten Substrate in Deutschland .....	8
2.2.2 Aufbau von Cellulose .....	10
2.2.3 Mikrobieller Abbau von Cellulose .....	11
2.3 Die wichtigsten Vertreter der Domäne Bacteriaceae mit cellulolytischer Aktivität und deren Genregulation .....	17
2.3.1 <i>Clostridium cellulolyticum</i> .....	17
2.3.2 <i>Clostridium thermocellum</i> .....	19
2.3.3 <i>Clostridium cellulovorans</i> .....	22
2.3.4 Überblick über bereits bekannte Mechanismen zur Anregung der cellulolytischen Aktivität im anaeroben Millieu .....	23
2.4 Die Modellierung des Substratabbaus .....	24
2.4.1 Das <i>Anaerobe Digestion Model 1</i> (ADM1) .....	24
2.4.2 Reaktionskinetik 1. Ordnung .....	26
2.4.3 Spezialfälle der Reaktion 1. Ordnung .....	27
2.4.4 Michaelis-Menten Kinetik .....	29
2.4.5 Modell 2. Ordnung .....	30
2.4.6 Oberflächen bezogene und 2-Phasen Modelle .....	30
2.5 Quantifizierung der cellulolytischen Leitspezies .....	34
2.5.1 Grundlagen der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion .....	34

2.5.2	Aktuelle Anwendungsbeispiele und Stand des Wissens zur qPCR.....	37
3	Zielsetzung.....	39
4	Material .....	40
4.1	Geräte.....	40
4.2	Kits .....	43
4.3	Stämme .....	43
4.4	Enzyme .....	43
4.5	Reagenzien .....	43
4.6	Medien .....	44
4.6.1	Celluloseauswahl.....	44
4.6.2	L47 Medium.....	45
4.6.3	MJ-Medium .....	46
4.6.4	141 Methanogenium Medium (M141).....	46
4.6.5	Synthetisches Fermentermedium .....	47
4.6.6	520 Ruminoclostridium cellulyticum Medium (CM3) .....	48
4.6.7	LB-Agarplatten mit Ampicillin.....	49
4.6.8	LB-Medium mit Ampicillin .....	49
4.6.9	SOC-Medium .....	49
4.7	Software und Datenbanken .....	50
4.8	Primer.....	50
5	Methoden.....	52
5.1	Inokula.....	52
5.2	Batchtest mit Kolbenprober .....	52
5.2.1	Batchtests mit Kolbenprober, allgemeine Vorgehensweise .....	52
5.2.2	Batchtests mit Kolbenprober zur Medienentwicklung des synthetischen Mediums .....	53
5.3	Fermenterbetrieb.....	54
5.4	Kultivierung von Clostridien in Reinkultur.....	55
5.5	Analytische Methoden .....	56
5.5.1	Biogasanalyse .....	56
5.5.2	Trockensubstanzbestimmung und Restsubstratanalyse.....	56
5.5.3	Bestimmung der organischen Säuren und Glucose .....	56
5.5.4	Bestimmung der Asche und des Gehalts an organischer Trockensubstanz.....	57
5.5.5	Phosphatbestimmung .....	57
5.5.6	Elementaranalytik .....	57
5.5.7	Ammoniumbestimmung.....	57
5.5.8	Analyse der Cellooligosaccharide und chlorierten Cellooligosaccharide.....	58

5.5.9	Datenverarbeitung .....	58
5.6	Ermittlung des Celluloseabbaus .....	58
5.6.1	Ermittlung des Celluloseabbaus anhand der Restsubstratkonzentration.....	58
5.6.2	Modelierung des Substratabbaus basierend auf der Substratkonzentration.....	58
5.6.3	Ermittlung des Celluloseabbaus anhand der Gasentwicklung .....	59
5.6.4	Evaluierung der Modelle .....	60
5.7	Herstellung und Modifikation von Cellooligosacchariden .....	61
5.7.1	Herstellung von Cellooligosacchariden aus Cellulose .....	62
5.7.2	Chlorierung von Cellobiose .....	62
5.7.3	Modifikation von Cellooligosacchariden .....	62
5.8	Molekularbiologische Methoden .....	63
5.8.1	DNA-Aufreinigung.....	63
5.8.2	Primerdesign .....	63
5.8.3	qPCR Messungen.....	63
5.8.4	Ermittlung der Primerspezifität.....	64
5.8.5	Optimierung der Annealingtemperatur .....	64
5.8.6	Optimierung Primerkonzentration .....	64
5.8.7	Ermittlung der qPCR Effizienz.....	64
5.8.8	Quantifizierung von <i>C. cellulolyticum</i> und <i>C. cellulovorans</i> .....	65
5.8.9	Sequenzierung der qPCR-Produkte von <i>C. cellulovorans</i> .....	65
5.8.10	Sequenzierung der qPCR-Produkte von <i>C. cellulolyticum</i> .....	66
5.8.11	Agarosegelelektrophorese .....	67
5.8.12	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	67
6	Ergebnisse.....	68
6.1	Inokula.....	68
6.1.1	Charakterisierung des Fermenterinokulums.....	68
6.2	Ergebnisse der Fermentationsversuche in den Laborfermentern .....	68
6.2.1	Versuchsplanung und Ablauf der Fermentationsversuche .....	68
6.2.2	Vorversuche zur Medienentwicklung im Kolbenprober .....	68
6.2.3	Fermenterbetrieb und Anpassung des Mediums.....	70
6.2.4	Leistungssteigerung im Fermenter 3.....	72
6.3	Evaluierung der Kinetikmodelle .....	75
6.3.1	Biogasbasiertes Modell .....	75
6.3.2	Restsubstratbasierte Modelle .....	78
6.3.3	Modell 1. Ordnung, berechnet mit einem nicht abbaubaren Substratanteil .....	78
6.3.4	Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung.....	79

6.4	Veränderung der Celluloseabbaugeschwindigkeit.....	80
6.4.1	Entwicklung der Celluloseabbaugeschwindigkeit im Fermenter .....	80
6.4.2	Einfluss der Elicitoren auf die Celluloseabbaugeschwindigkeit .....	82
6.5	Entwicklung einer Modifikationsstrategie .....	85
6.5.1	Vorversuche zur Modifikationsstrategie im Batchversuch .....	85
6.5.2	Analyse der Oligosaccharide .....	87
6.5.3	Analyse der chlorierten Cellooligosaccharide .....	87
6.5.4	Vorversuche mit chlorierten Oligosacchariden im Batchversuch .....	88
6.6	Etablierung der qPCR-Methode zur Quantifizierung von Clostridien .....	89
6.6.1	Überprüfung der Primerspezifität in silico .....	89
6.6.2	Überprüfung der Primerspezifität im Labor .....	89
6.6.3	Optimierung der Annealingtemperatur .....	91
6.6.4	Optimierung der Primerkonzentration .....	92
6.6.5	Ermittlung der qPCR-Effizienz .....	92
6.6.6	Überprüfung auf vorhandene Hemmstoffe in der extrahierten metagenomischen DNA.....	93
6.6.7	Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktion aus den Fermenterproben .....	94
6.6.8	Reproduzierbarkeit der Probennahme .....	95
6.7	Ergebnisse der Quantifizierung von cellulolytischen Clostridien mittels qPCR.....	95
6.7.1	Erstellung der Kalibrationsgeraden für <i>C. cellulolyticum</i> .....	95
6.7.2	Erstellung der Kalibrationsgeraden für <i>C. cellulovorans</i> .....	97
6.7.3	Anpassung der cellulolytischen Leitspezies an die Kinetikermittlungen mit unterschiedliche Elicitoren.....	100
6.7.4	Anpassung der cellulolytischen Leitspezies an den kontinuierlichen Betrieb mit synthetischem Feedmedium .....	101
6.7.5	Verhalten der cellulolytischen Leitspezies während der Kinetikermittlung durch Feedunterbrechung.....	103
6.8	Kontrolle der erzeugten qPCR-Produkte .....	104
6.9	Ergebnisse des Nachweisversuchs von <i>C. thermocellum</i> .....	108
7	Diskussion .....	109
7.1	Inokula .....	109
7.1.1	Eignung des Inokulums.....	109
7.2	Langfristige Fermentation mit vollsynthetischem Medium .....	109
7.2.1	Entwicklung des Fermentationsmediums .....	109
7.2.2	Austesten der Grenzen des vollsynthetischen Fermentermediums .....	111
7.3	Eignung der Teststrategie sowie der unterschiedlichen Kinetikmodelle .....	111
7.3.1	Die Analyse des Celluloseabbaus .....	111

---

7.3.2	Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung .....	112
7.3.3	Bewertung der Kinetikermittlung anhand des produzierten Biogasvolumenstroms .....	114
7.4	Ergebnisse der Ermittlungen der Cellulosehydrolyserate .....	115
7.4.1	Entwicklung der Abbaugeschwindigkeit im Fermenter .....	115
7.4.2	Einfluss der Elicitoren auf den Celluloseabbau .....	115
7.5	Analyse und Effekte modifizierter Celooligosaccharide.....	117
7.5.1	Bewertung der Zusammensetzung der Celooligosaccharide .....	117
7.5.2	Wahl der Modifikationsstrategie.....	117
7.5.3	Analyse und Effekte der chlorierten Oligosaccharide .....	118
7.6	Diskussion der Ergebnisse molekularbiologischer Methoden .....	119
7.6.1	Auswahl der Nachweismethode und Mikroorganismen.....	119
7.6.2	Primerdesign .....	120
7.6.3	Optimierung der qPCR-Bedingungen .....	121
7.6.4	qPCR – Quantifizierungs Ergebnisse.....	121
7.7	Bewertung der erreichten Forschungsergebnisse .....	123
8	Ausblick.....	124
9	Literaturverzeichnis .....	126
10	Anhang.....	141
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	141
10.2	Tabellenverzeichnis .....	143
10.3	Abkürzungsverzeichnis .....	144
10.4	Weiterführende Abbildungen .....	146

## Zusammenfassung

Die Entwicklung eines definierten synthetischen Mediums ermöglichte es, eine komplexe biogasproduzierende Biozönose aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen unter genau definierten und reproduzierbaren Bedingungen zu kultivieren und die anaerobe Cellulosevergärung zu untersuchen.

Die Eignung dieses synthetischen Mediums wurde durch die Fortführung einer semi-kontinuierlichen Cellulose-Monofermentation für mehr als 18 Monate bestätigt. Dabei konnte eine maximale Raumbelastung von  $8,3 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und eine minimale hydraulische Verweilzeit von 9,6 Tagen erreicht werden. Dieses Niveau konnte für eine Dauer von 7 hydraulischen Verweilzeiten gehalten werden. Erst bei einer weiteren Erhöhung der Raumbelastung zeigte ein starker Anstieg der organischen Säuren, bei gleichzeitigem Rückgang der Biogasproduktion eine Überlastung des Systems an.

Die Celluloseabbaugeschwindigkeit wurde durch Monitoring der abnehmenden Substratkonzentration nach Unterbrechungen der Feedzugabe ermittelt, wobei die gemessenen Restsubstratkonzentrationen zur Erstellung von Reaktionsmodellen 1. und 2. Ordnung verwendet wurden. Mit Hilfe dieser Modelle wurde der Einfluss ausgewählter Kohlehydrate auf die Abbaugeschwindigkeit bewertet, wobei eine Mischung aus Cellooligosacchariden das höchste Potential zeigte. Für diesen potentiellen Elicitor wurde eine Modifikationsstrategie entwickelt um die biologische Abbaubarkeit zu verringern und damit die Verweilzeit im Fermenter zu erhöhen. Nach der erfolgreichen Modifikation durch Chlorierung konnten die zuvor beobachteten Effekte der unbehandelten Cellooligosaccharide auf die Celluloseabbaugeschwindigkeit nicht reproduziert werden.

Zur Analyse des entwickelten synthetischen Mediums wurde dessen Einfluss auf die Population der cellulolytischen Leitspezies *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* untersucht. Eine dazu entwickelte qPCR-Methode basierend auf der Extraktion von metagenomischer DNA und dem Vergleich mit Standards aus Einzelkulturen zeigte ein konstantes Wachstum beider Spezies an. Wie auch im Inokulum gemessen zeigte dabei *C. cellulovorans* durchgehend ein höheres Konzentrationsniveau als *C. cellulolyticum*.



## Abstract

The development of a defined synthetic medium allowed to cultivate a complex biogas-producing biocoenosis from agricultural biogas plants under well-defined and reproducible conditions and to study anaerobic cellulose digestion.

The suitability of this synthetic medium was confirmed by semi continuous cellulose mono-fermentation for more than 18 months. A maximum organic loading rate of 8,3  $\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  and a minimum hydraulic residence time of 9,6 days were achieved. This level could be maintained for a period of 7 hydraulic retention times. Only when the organic loading rate was further increased a major rise in organic acids, with a simultaneous decrease in biogas production, indicated an overload of the system.

The cellulose degradation rate was studied by monitoring the substrate depletion after short feed-stops, using the measured residual substrate concentrations to establish 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> order reaction models. These models were used to evaluate the effect of selected carbohydrates on the rate of degradation, with a mixture of cellooligosaccharides showing the highest potential. A modification strategy was developed for this putative elicitor to reduce biodegradability and thus increase residence time in the fermenter. After successful modification by chlorination, the previously observed effects of untreated cellooligosaccharides on cellulose degradation rate could not be reproduced.

To analyse the developed synthetic medium, its effect on the population of the cellulolytic lead species *C. cellulolyticum* and *C. cellulovorans* was investigated. A qPCR method developed for this purpose based on the extraction of metagenomic DNA and comparison with standards from single cultures indicated constant growth of both species. As measured in the inoculum, *C. cellulovorans* consistently showed a higher concentration level than *C. cellulolyticum*.

## 1 Einleitung

### 1.1 Bedeutung der Biogastechnologie - die energetische Nutzung von Biomasse

Erneuerbare Energien, zu welchen auch die Produktion und Nutzung von Biogas als Bestandteil der Energie aus Biomasse zählen, sind das Herzstück des Übergangs zu einem weniger kohlenstoffintensiven nachhaltigerem Energiesystem.

Insgesamt stellte die aus Biomasse gewonnene Energie, also auch die Produktion und Nutzung von Biogas, 2015 rund 9 % der weltweit eingesetzten Primärenergie dar. Dabei basierte über die Hälfte davon auf der traditionellen Nutzung von Biomasse in Entwicklungsländern, also zum Heizen und Kochen auf ineffizienten offenen Feuern oder einfachen Kochherden, welche die Gesundheit und Umwelt beeinträchtigen. Die moderne Bioenergie zählt hingegen zu den wichtigsten Sektoren der erneuerbaren Energie überhaupt, denn auch ohne die traditionelle Nutzung von Biomasse ist der Anteil am globalen Energieverbrauch fünfmal größer als die von Wind und Photovoltaik erzeugte Energiemenge. Neben der traditionellen Nutzung war vor allem die Wärmeproduktion das wichtigste Einsatzgebiet, so wurden 2015 rund 15 EJ zur Wärmeproduktion verwendet, was 6 % des weltweiten Wärmeverbrauchs entsprach. Neben der Wärmenutzung haben sich in letzter Zeit, bewirkt durch Unterstützung von politischer Seite, die Nutzung von Bioenergie zur Stromerzeugung und als alternativer Kraftstoff im Transportsektor als größter Wachstumsmarkt entwickelt.

Langfristig gesehen hat Bioenergie eine wichtige Rolle in einem weniger Kohlenstoff intensiven Energiesystem. So spielt die moderne Nutzung von Biomasse eine wichtige Rolle im 2 °C Szenario der IEA (Internationale Energieagentur), in welchem der Anteil der Bioenergie am weltweiten Energieverbrauch bis 2060 vervierfacht werden soll. (IEA Publications, 2017).

### 1.2 Bedeutung der Biogastechnologie - die Nutzung von Biogas in Europa

Auch die Europäische Union bekannte sich zum 2 °C Ziel, also dem Ziel, die globalen Durchschnittstemperaturen bis 2100 um nicht mehr als 2 °C ansteigen zu lassen. Dieses Ziel wurde 2007 von der Europäischen Kommission formuliert (Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 2007a) und gleichzeitig wurde auch ein Energiepaket verabschiedet, welches im Zuge einer gemeinsamen Energiepolitik die Treibhausgasemissionen bis 2020 um mindestens 20 % im Vergleich zu 1990 reduzieren und den Anteil an erneuerbaren Energien auf 20 % steigern sollte (Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 2007b). Diese Rechtsakte stehen im Einklang mit der langjährigen Klimapolitik zur erneuerbaren Energie in der europäischen Union. Dessen Basis wurde 1997 gelegt, als der Europäische Rat und das Europäische Parlament das Weißbuch für eine Gemeinschaftsstrategie und einen Aktionsplan zum Thema „*Energie für die Zukunft: erneuerbare Energieträger*“ verabschiedet haben (Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 1997) und somit das Leitziel, den Anteil der erneuerbaren Energieträger an der Energiebilanz auf 12 % und an der Stromerzeugung auf 22 % bis zum Jahr 2010 zu steigern, formuliert wurde.

Durch diese günstige politische Lage in den einzelnen Mitgliedstaaten hat die Biogasproduktion in den letzten Jahren stark zugenommen. So betrug die Gesamtbogasproduktion in der Europäischen Union 2015 18 Millionen Kubikmeter, was 665 PJ an Primärenergie entsprach und im Vergleich zu 92 PJ im Jahr 2000, 170 PJ im Jahr 2005 und 364 PJ im Jahr 2010 eine starke Steigerung darstellte (Eurostat, 2017). Während dabei der Beitrag von Deponiegas in den letzten 10 Jahren relativ konstant blieb, ging der Großteil des Wachstums auf die starke Zunahme von Biogas zurück und zum kleineren Teil aus Gas aus der Abwasserbehandlung.

Dabei war die Situation in den einzelnen Mitgliedsländern der Europäischen Union sehr unterschiedlich im Bezug auf die Bezugsquelle (Deponiegas, Faulschlamm oder anaerobe Vergärung) und Produktionsmenge. Auch war der Beitrag von Biogas zum nationalen Gasverbrauch sehr

verschieden und lag im Schnitt bei 4 %, konnte aber auch bis zu 23 % betragen, wie beispielsweise in Schweden. Deutschland hatte hier die zweithöchste Quote mit 12,1 % und war außerdem das Land mit der höchsten Biogasproduktion, gefolgt von England, Italien, der Tschechischen Republik und Frankreich. Auffällig war dabei, dass die Biogasproduktion in Deutschland 2015 so hoch war, wie die aller anderen EU-Länder zusammen (Scarlat et al., 2018).

Hinsichtlich der Bezugsquellen des Biogases zeigte sich eine divergente Situation. Die größten Biogasmengen wurden in Europa durch anaerobe Vergärung in Deutschland, Italien und der Tschechischen Republik erzeugt. In diesen Ländern war folglich die anaerobe Vergärung auch die dominierende Produktionsart. In anderen Ländern wie England, Portugal oder Spanien war Deponiegas vorherrschend und nur in seltenen Fällen, wie Schweden oder Polen, war die Abwasserbehandlung der hauptsächlichliche Ursprung (Eurostat, 2017).

Insgesamt gab es 2015 17400 Biogasanlagen in Europa, wobei im Jahr 2015 16606 Anlagen insgesamt eine installierte elektrische Leistung von über 10 GW aufwiesen. In den Anlagen, die nicht zur Generation elektrischer Energie genutzt wurden, wurde das Biogas zum Beheizen von Häusern oder Dampferzeugern in Industrieanlagen verwendet. In den anderen Anlagen wurde das Biogas als Treibstoff für Verbrennungsmotoren verwendet, um mit einem angeschlossenen Generator elektrischen Strom zu produzieren. Diese Motoren hatten einen Wirkungsgrad von 35 – 40 % und meist eine Leistung von 100 – 500 kW (van Foreest, 2012). Die bei der Verbrennung entstandene Wärme konnte im Fermenter selbst genutzt oder über Fernwärmenetze verteilt werden, sodass 2015 in der EU insgesamt 61 TWh (219 PJ) elektrische Energie und 26,6 PJ Wärmeenergie erzeugt werden konnten (Eurostat, 2017).

In Anbetracht dieser Zahlen wird rasch klar, dass selbst kleine Verbesserungen bei Ausbeute, Produktivität oder Effizienz eine enorme Wirkung entfalten und so zu großen ökonomischen und ökologischen Einsparungen führen können. Dem folgend besteht die Motivation dieser Arbeit darin, einen kleinen Beitrag zur Verbesserung der Biogastechnologie zu leisten und damit mitzuhelfen, das gesetzte 2 °C Ziel zu erreichen.

## 2 Biogaserzeugung aus Cellulose

### 2.1 Die Schritte der Biogasproduktion

#### 2.1.1 Hydrolyse

Der erste Schritt der Biogaserzeugung, die Hydrolyse, beschreibt eine weite Palette von Zerfalls- und Solubilisationsvorgängen, bei welchen komplexe organische Makromoleküle zu löslichen Monomeren abgebaut werden. Einige Reaktionen, wie beim Abbau von Kohlenhydraten, Peptiden, Triglyceriden und Nucleinsäuren sind auch im chemischen Sinne hydrolytische Reaktionen. Also die Auflösung einer chemischen Bindung unter Anlagerung von Wasser. Allerdings zählen auch Reaktionen, die chemisch gesehen keine hydrolytischen Reaktionen sind, zum Prozessschritt der Hydrolyse, wie beispielsweise die Auflösung von Disulfidbrücken, welche zu den Redoxreaktionen zählt (Sevier und Kaiser, 2002).

Die wichtigsten Substrate für Biogasanlagen sind Lipide, Proteine und Kohlenhydrate, welche in der Hydrolyse zu langkettigen Fettsäuren mit Glycerin, Aminosäuren und Monosacchariden abgebaut werden. Die meisten Gärsubstrate (Primärschlamm, Gülle und nachwachsende Rohstoffe) bestehen aus komplexen Mischungen dieser Stoffklassen und werden in mehreren Schritten hydrolysiert, was weitgehend von extracellulären Enzymen katalysiert wird (Tong und McCarty, 1991). Diese können entweder zellwandgebunden vorkommen oder in die Fermenterbrühe segregiert werden.

Die Hydrolyse wird allgemein als der für viele Substrate geschwindigkeitslimitierende Schritt angesehen (Gülle, Klärschlamm, nachwachsende Rohstoffe) (Pavlostathis und Giraldo-Gomez, 1991), wodurch die gesamte Abbaugeschwindigkeit bei diesen komplexen Substraten von der Hydrolyse bestimmt wird. Da die Abbaugeschwindigkeit eine maßgebliche Größe für die Verweilzeit des Substrats im Reaktor und somit auch für die gesamte Prozessauslegung ist, ist es auch wichtig, die Hydrolyserate genau zu kennen. Trotz des mehrstufigen Prozesses des Abbaus von unterschiedlichen Substraten mit unterschiedlichsten beteiligten Enzymen wird die Hydrolyse in der Literatur meist als eine Reaktion 1. Ordnung beschrieben (Batstone et al., 2002). Dies wird mit dem Argument gerechtfertigt, dass all diese beteiligten Reaktionen und Prozesse zu schwierig zu identifizieren und charakterisieren sind (Eastman und Ferguson, 1981). Bei Lignocellulose, welche aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin besteht (Tong und McCarty, 1991), hängt die Abbaugeschwindigkeit weitgehend von deren Struktur und Zusammensetzung ab. So werden beispielsweise kompakte Materialien mit hohem Ligninanteil, wie holziges Material, weit langsamer hydrolysiert als relativ einfach zugängliche Materialien, wie Stroh (Tong und McCarty, 1991; Yang et al., 2009). Im Gegensatz dazu ist bei Lipiden, welche üblicherweise aus Triglyceriden bestehen und von Lipasen abgebaut werden, die Abbaugeschwindigkeit weniger von den chemischen Eigenschaften abhängig. Hier sind vor allem die Partikelgröße und die Umgebungsbedingungen wie pH-Wert und Oberflächenspannung bestimmend. Beim Abbau von Proteinen, welche häufig in Verbindung mit Lipiden, wie zum Beispiel bei Schlachtabfällen, auftreten, ist vor allem die Proteinstruktur ein wichtiger Einflussfaktor. Globuläre Proteine sind leicht abbaubar, im Gegensatz dazu stehen die schwer zu hydrolysierenden Strukturproteine (McInerney, 1988).

#### 2.1.2 Acidogenese

Im an die Hydrolyse nachfolgenden Schritt, der Acidogenese, werden die in der Hydrolyse freigesetzten Monomere von den beteiligten Mikroorganismen durch die Zellwand aufgenommen und zu Wasserstoff, Kohlendioxid, Alkoholen und flüchtigen Fettsäuren verstoffwechselt. Zu letzteren zählen die kurzkettigen organischen Säuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure, welche typischerweise in einem Verhältnis von 75:15:10 bis 40:40:20 (Bergman, 1990) vorkommen. Zu den auftretenden Alkoholen zählen neben Ethanol auch noch Butanol. Darüber hinaus kann unter Umständen auch Milchsäure vorkommen (Henze, 2008). Die genauen Konzentrationen der auftretenden Stoffwechselprodukte der Acidogenese sind abhängig von den Bedingungen im Fermenter, so ist

bekannt, dass die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren stark variieren können und vom pH-Wert abhängig sind (Huang et al., 2015; Wu et al., 2010).

Im Gegensatz zur Hydrolyse ist die Acidogenese allgemein als schnellerer Prozess im Vergleich zu den anderen Prozessschritten der Biogaserzeugung angesehen. Auch die beteiligten Mikroorganismen zählen im Vergleich zu den methanproduzierenden mit einer Generationszeit von unter 36 h zu den schneller wachsenden im gesamten Prozess (Deublein und Steinhauser, 2011). Diese Geschwindigkeit ist es auch, die unter Umständen zum Problem werden kann. So kann es bei einer hohen Verfügbarkeit an leicht verstoffwechselbarem Substrat vorkommen, dass in der Acidogenese eine große Menge an flüchtigen Fettsäuren freigesetzt wird. Können diese in den folgenden Schritten nicht rasch genug umgewandelt werden, tritt eine Akkumulation der Fettsäuren ein und die damit einhergehende Versäuerung ist ein verbreiteter Prozessfehler (Akuzawa et al., 2011). Ein Prozess, für den die Versäuerung gezielt eingesetzt wird ist die Bokashi-Vergärung. Hier werden leicht abbaubare organische Abfälle sauer vergoren, um daraus Dünger herzustellen. Im Unterschied zur Biogasproduktion werden hier größere Mengen an Milchsäure freigesetzt (Yamada und Xu, 2001).

Die flüchtigen Fettsäuren werden nicht nur aus Fetten und Kohlenhydraten gebildet, auch Proteine stellen ein geeignetes Substrat dar. So werden diese generell in Paaren mittels der Stickland Reaktion desaminiert. Hier wird eine Aminosäure oxidativ über eine alpha-Ketosäure desaminiert und unter Einbau von Acetyl-Coenzm A decarboxyliert, während eine 2. Aminosäure zur Regeneration der Redoxüberträger reduktiv desaminiert wird. In Anwesenheit von hydrogenotrophen Mikroorganismen kann auch nur der oxidative Reaktionsteil ablaufen (Kovács et al., 2013). Bei beiden Reaktionsmechanismen fällt beim Abbau von Aminosäuren Ammoniak als Nebenprodukt an, welcher in höheren Konzentrationen als Inhibitor der Biogasproduktion bekannt ist (Kovács et al., 2013; Park et al., 2014).

### 2.1.3 Acetogenese

Die Acetogenese beschreibt die Produktion von Acetat, sowohl aus der Reduktion von CO<sub>2</sub>, als auch aus dem Abbau von langkettigen Fettsäuren, durch Homoacetatgärer. Das sind streng anaerobe Mikroorganismen, deren energieliefernder Stoffwechselmechanismus die reduktive Synthese von Acetylcoenzym A aus CO<sub>2</sub> ist, wobei hier CO<sub>2</sub> als terminaler Elektronenakzeptor dient. Als Produkt dieses, auch CO<sub>2</sub> Atmung genannten, Prozesses wird vorwiegend Essigsäure ausgeschieden (Drake, 1995). Um notwendige Substrate wie Wasserstoff, Formiat und Methanol konkurrieren Homoacetatgärer mit Methanogenen.

Die in der Acidogenese produzierten Säuren (Propionsäure, Buttersäure) und Alkohole (Ethanol) werden durch Wasserstoff produzierende Acetogene zu Acetat oxidiert. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden an Protonen oder Bikarbonat übertragen, woraus dann Wasserstoff oder Formiat entsteht. Diese Elektronenakzeptoren sind im Vergleich zur Gärung, wo das Substrat als Akzeptor verwendet wird, energetisch wesentlich ungünstiger (Stams und Plugge, 2009).

Acetogene, welche ausschließlich die Oxidation von flüchtigen Fettsäuren wie zum Beispiel Propionsäure betreiben, sind daher durch die Verwendung von Protonen als finalen Elektronenakzeptor stark eingeschränkt, da bei Standardbedingungen diese Reaktion energetisch ungünstig ist. Folglich sind die an der Acetogenese beteiligten Mikroorganismen von sehr niedrigen Produktkonzentrationen, also von geringen Wasserstoffkonzentrationen, abhängig, um diese Reaktion zu ermöglichen. Zu den wasserstoffverbrauchenden Mikroorganismen zählen methanogene Archea, wie sie im nächsten Schritt der Biogasbildung, der Methanogenese, vorkommen (McInerney et al., 2008; Sousa et al., 2009; Stams und Plugge, 2009), woraus sich eine gegenseitige Abhängigkeit, eine Syntrophie, ergibt, deren wichtigstes Merkmal ein Interspezies-Wasserstofftransfer ist. Darüber hinaus zeichnet sich diese Syntrophie durch einen, nur gemeinsam möglichen Abbau von Fettsäuren, einen

Einfluss der Zwischenzellabstände von Acetogenen und Methanogenen auf die spezifischen Wachstumsraten (Batstone et al., 2006), einem Wachstum der Lebensgemeinschaft sehr nahe am thermodynamischen Gleichgewicht und dem Vorhandensein eines Systems zum Austausch von chemischer Energie aus.

Diese Gemeinschaft aus acetogenen Bakterien und syntrophen Methanogenen zur Acetatoxidation wurde zuerst in einem thermophilen Reaktorsystem beschrieben (Zinder und Koch, 1984) und später auch bei niedrigeren Temperaturen beim Abbau von ammoniumhaltigem Klärschlamm nachgewiesen (Schnurer et al., 1996). Die Tatsache, dass die erste Beobachtung in einem thermophilen System erfolgt ist, könnte damit zusammenhängen, dass die Reaktion zwar keinen hohen Energiegewinn aufweist, dieser aber mit steigender Temperatur zunimmt (Schink und Stams, 2013).

Zu den in der Acetogenese beteiligten Mikroorganismen zählen die thermophilen *Thermacetogenum phaeum* und *Thermotoga lettingae* (Hattori, 2008) und die mesophilen *Clostridium ultunense* und *Syntrophaceticus schinkii* (Schink und Stams, 2013).

#### 2.1.4 Methanogenese

Die Methanogenese stellt die letzte Stufe der Biogasproduktion dar. Hier werden alle davor angefallenen Zwischenprodukte von methanogenen Mikroorganismen aufgenommen und daraus Methan produziert (Ferry, 2010). Für diesen Vorgang sind 3 anaerobe Stoffwechselwege beschrieben. Der erste Stoffwechselweg, die acetoklastische Methanogenese, basiert auf der Spaltung von Acetat, woraus Methan und Kohlendioxid entstehen. Dieser Weg ist bezogen auf das Methanvolumen der bedeutsamste, so werden 2/3 des gesamten Methans auf der Erde acetoklastisch produziert. Einen zweiten Stoffwechselweg stellt die hydrogenotrophe Methanogenese dar, bei welcher Wasserstoff aus der Acetogenese von syntrophen Acetogenen verwendet wird, um Kohlendioxid zu Methan zu reduzieren. Dieser Weg stellt die größte Aufnahmestelle für Elektronen dar, wenn andere Akzeptorstellen in anaeroben Umgebungen bereits verbraucht sind. Der Elektronentransfer erfolgt über den oben bereits erwähnten interspezies Wasserstofftransfer zwischen den beteiligten Syntropen, welcher bedingt durch die geringen Konzentrationen, in räumlich sehr enger Verbindung erfolgt (Stams und Plugge, 2009). In Biogasanlagen bedeutet das, dass der überwiegende Teil an hydrogenotropher Methansynthese in Flocken oder Biofilmen stattfindet, wo der notwendige enge Kontakt bestmöglich realisiert werden kann. Der noch fehlende dritte Stoffwechselweg basiert auf einer Disproportionierungsreaktion, wo aus C1-Verbindungen, wie Methanol oder Methylaminen, Methan und Kohlendioxid entstehen. Dieser Weg wird, den Reaktionsprodukten folgend, als methylotrophe Methanogenese bezeichnet (Conrad et al., 2010; Deppenmeier, 2002; Liu und Whitman, 2008).

Die methanogenen Mikroorganismen sind eine Gruppe obligat anaerober Archaea vom *Phylum der Euryarchaeota*, wovon 5 phylogenetische Gruppen in der Methanogenese identifiziert wurden: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* und *Methanopyrales*, wobei seit 10 Jahren auch eine 6. Gruppe der Methanocellales beschrieben wurde, welche zwischen *Methanosarcinales* und *Methanomicrobiales* eingeordnet wird (Sakai et al., 2008). Die Methanogenen als Gruppe sind sehr verschieden, was ihre Zellmorphologie angeht. Von regelmäßig bis unregelmäßiger kokoider Gestalt (*Methanomicrobiales*, *Methanococcales*), über zu kurze Stäbchen (*Methanopyrales*, *Methanobacteriales*) bis hin zu langen Filamenten (*Methanosaetacea* innerhalb der *Methanosarcinales*) sind alle möglichen Formen hier anzutreffen. Gemeinsam haben alle jedoch, dass sie sehr empfindlich auf Sauerstoff reagieren. So zeigte sich im Experiment, dass innerhalb von 10 h 99 % von *Methanococcus vannielli* und *Methanococcus voltae* bei Belastung mit Sauerstoff absterben (Kiener und Leisinger, 1983). Bezüglich der Umgebungsbedingungen bevorzugen die Methanogenen eher höhere pH-Werte als die an den vorhergehenden Stufen der Biogasproduktion beteiligten Prokaryonten zusätzlich zu einem

niedrigeren Redoxpotential, das ebenfalls favorisiert wird. Letzteres ist auch dafür verantwortlich, dass Methanogene nur mit hohem Aufwand im Labor kultiviert werden können (Wolfe, 2011). Eine weitere wichtige Eigenschaft von Methanogenen ist, dass ein Energiegewinn durch Substratkettenphosphorylierung von keinem Vertreter angewandt wird und ATP durch eine protonenmotorische Kraft und für hydrogenotrophe Methanogene mittels natriummotorischer Kraft erzeugt wird (Boone et al., 1993).

Die Heterogenität der Gruppe der Methanogenen zeigt sich beispielsweise auch in ihren unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften. Einerseits liegen Berichte vor, dass einige hydrogenotrophe Spezies, wie *Methanococcus maripaludis*, eine Generationszeit von nur 2 Stunden aufweisen (Richards et al., 2016), andererseits sind acetatverarbeitende Methanogene mit 2-4 fach niedrigerem Umsatz und Wachstumsraten (Bischofsberger, 2005) im allgemeinen als langsame Gruppe bekannt. Auch werden Methanogene als eine empfindliche Gruppe angesehen, obwohl auch hier am Beispiel von *Methanosarcina spp.*, welche robust gegenüber hohen Ammonium-, Natrium- und Acetatkonzentrationen sowie widrigen pH-Werten ist, Ausnahmen dokumentiert sind (Vrieze et al., 2012).

#### 2.1.5 Die Biogaserzeugung als Gesamtprozess

Beim Betrachten des gesamten Biogasproduktionsprozesses in Abbildung 1 zeigt sich sehr rasch, dass die einzelnen Abschnitte Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese eng zusammenhängen. So ist es für die nachfolgenden Prozesse wichtig, dass in der Hydrolyse die Makromoleküle im Substrat in ihre Monomere zerlegt werden, um diese somit für die in den nächsten Stufen beteiligten Mikroorganismen verfügbar zu machen. In der Acidogenese wird dann diese zuweilen sehr inhomogene Gruppe der Monomere abgebaut, bis nur noch Alkohole und flüchtige Fettsäuren wie Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure übrigbleiben. Dabei entstehen Nebenprodukte wie Ammonium aus Aminosäuren und Wasserstoff, welcher in späteren Reaktionsschritten dazu verwendet wird, Kohlendioxid zu Methan zu reduzieren. Es ist dabei von großer Bedeutung, dass die entstehenden flüchtigen Fettsäuren umgehend vom nächsten Schritt der Acetogenese verstoffwechselt werden, da ein Akkumulieren dieser Säuren und die damit einhergehende Senkung des pH-Wertes eine bekannte Prozessstörung darstellt, welcher zum Erliegen des gesamten Prozesses führen kann. Eben diese und auch längerkettige Fettsäuren werden in der Acetogenese weiter zu Wasserstoff und Essigsäure verstoffwechselt und dann in der Methanogenese in Methan umgewandelt. Nirgends wird die Abhängigkeit der einzelnen Reaktionsschritte untereinander deutlicher als bei der hydrogenotrophen Methanogenese, da hier nicht nur der im vorhergehenden Schritt freigesetzte Wasserstoff alleine benötigt wird, sondern auch zum Vorteil der beteiligten Spezies in einem Konzentrationsoptimum vorhanden sein muss. Das resultiert in die, oben bereits beschriebene, räumlich eng verbundene syntrophe Lebensweise (Patón und Rodríguez, 2019).

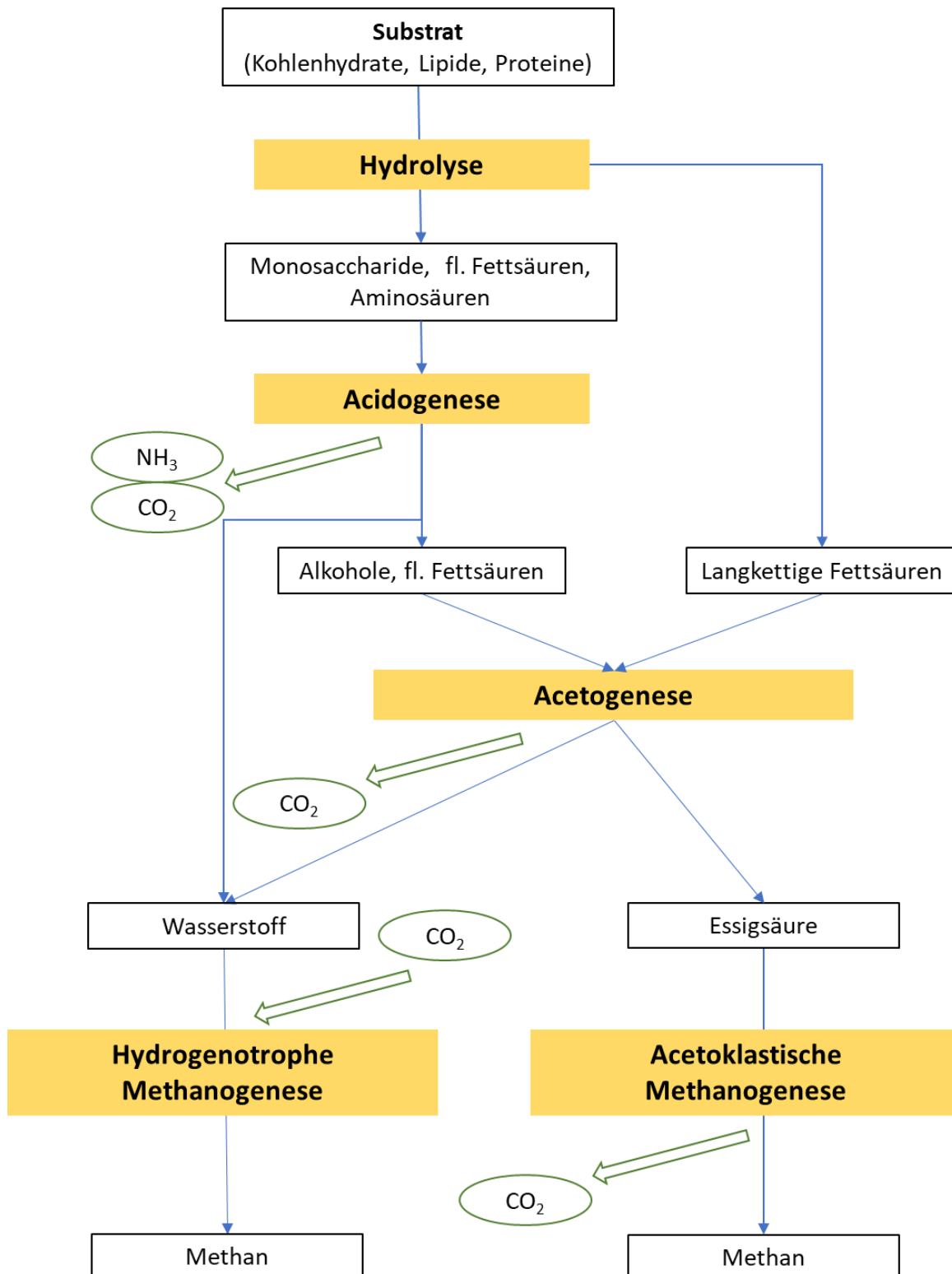


Abbildung 1: Schematischer Überblick über die 4 Reaktionsschritte der Biogaserzeugung: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese in Verbindung mit den wichtigsten Edukten und Produkten. Aus Batstone und Jensen (2010), modifiziert

In solch einer Abfolge von Prozessschritten wird die Geschwindigkeit vom langsamsten Abschnitt limitiert. Wie im Abschnitt 2.1.1 bereits beschrieben, ist dieser für viele Substrate, zu denen auch Lignocellulose zählt, die sog. Hydrolyse. Die Faktoren, welche eine rasche Hydrolyse von Cellulose verhindern, sind dabei in deren Einbettung in die pflanzliche Zellwand begründet, welche durch enge räumliche Vernetzung der einzelnen Bestandteile wie ein Bollwerk gegen den Abbau wirkt.



Die Hauptfunktion dieses engmaschigen Bollwerks ist es, die für den Abbau angreifbare Oberfläche so gering wie möglich zu halten und dadurch den Abbau zu erschweren. Darüber hinaus gibt es auch noch weitere Faktoren, die einer effizienten Hydrolyse von Lignocellulose entgegenstehen. Zu diesen zählen die chemische Zusammensetzung, wie der Ligningehalt oder der Anteil von Hemicellulose und strukturbezogene Faktoren, wie die Partikel- oder Porengröße. Auch der Aufbau der Cellulosefaser selbst wirkt sich durch Eigenschaften wie die Kettenlänge oder den Kristallisationsgrad auf die Abbaugeschwindigkeit aus (Zhao et al., 2012).

## 2.2 Cellulose als Rohstoff und Energieträger

### 2.2.1 Überblick über die bedeutendsten Lignocellulosequellen und derzeit verwendeten Substrate in Deutschland

Lignocellulose stellt den Hauptbestandteil von Pflanzen, dadurch einen Großteil der jährlich produzierten weltweiten Biomasse von 150 Mrd. Tonnen und ein enormes Potential als erneuerbare C-Quelle dar. Die Produktivität von Lignocellulose ist höher als die vergleichbarer C-Quellen wie Korn, Ölsaaten oder Zucker bezogen auf die produzierte Gesamtbiomasse (Blumer-Schuetz et al., 2014; Kim und Dale, 2004; Lynd et al., 2005; Zverlov und Schwarz, 2008).

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Cellulose ist das Verringern der sogenannten „Food vs. Fuel“ Debatte, einer Konfliktsituation, die sich für viele nachwachsende Rohstoffe wie zum Beispiel Mais, Getreidekorn oder Zuckerrübe ergibt, da diese dann bei energetischer Nutzung nicht für die menschliche Ernährung zur Verfügung stehen oder es zu einer Konkurrenz um Anbauflächen zwischen Energiepflanzen und Nahrungsmittelpflanzen kommt. Dies ist bei den verbreiteten, nicht essbaren cellulosehaltigen Substraten, wie agrarwirtschaftlichen Abfällen, Zuckerrohrbagasse, Stroh, Haushaltsabfällen und ein- oder mehrjährigen trockenen Energiegräsern nicht der Fall. Letztgenannte eignen sich besonders als schnell nachwachsende Cellulosequelle, da viele dieser Gräser C4-Pflanzen sind und sich daher über eine hohe Effizienz in der Umwandlung von Kohlendioxid in pflanzliche Zellbiomasse auszeichnen (Chandel und Singh, 2011). Deren Kultivierung und Verarbeitung ist Gegenstand vielfältiger Forschung, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf Riesen-Chinaschilf (*Miscanthus giganteus*) und Rutenhirse (*Panicum virgatum*) gelegt wurde. Außerdem spielt Biomasse aus Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) und die daraus entstehende Bagasse eine Rolle, wobei das Forschungsziel für all diese Energiepflanze oftmals die Nutzung zur Produktion von Bioethanol ist (Somerville et al., 2010).

Stroh fällt als Neben- oder Abfallprodukt bei der Erzeugung von Lebensmitteln an und steht somit, wie bereits erwähnt, nicht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion. Jedoch erschwert die komplizierte Polymerstruktur mit engen physikalischen und chemischen Verbindungen aus kristalliner Cellulose, Hemicellulose und Lignin die Verstoffwechslung von Stroh als Substrat für die Biogasproduktion und die Hydrolyse des Rohmaterials stellt hier ganz besonders den limitierenden Schritt dar (Lo Liew et al., 2012; Sun et al., 2015). Aufgrund dieser Hürden wird Stroh nur in geringem Umfang als Substrat in Biogasanlagen eingesetzt, jedoch gibt es Bestrebungen, die Nutzung zu intensivieren, so wurde 2012 in Deutschland die weltweit erste industrielle Strohverarbeitungsanlage zur Produktion von Biomethan in Monovergärung eröffnet. Diese Anlage leistete zur Eröffnung 60 MW und hatte einen Bedarf von 20 000 t Stroh pro Jahr (Strümpfel, 2019). In Deutschland ergibt sich ausgehend von einem theoretischen Potential von  $29,8 \cdot 10^6 \text{ t a}^{-1}$  abzüglich des Bedarfs für Tierhaltung und zum Aufrechterhalten der Humusbilanz ein jährliches nachhaltiges Strohpotential von 8 – 13 Mio. Tonnen (Weiser et al., 2014).

Das Riesen-Chinaschilf ist eine aus Asien stammende Nutzpflanze, welche aber auch in Europa kultiviert wird. Botanisch gehört das Riesen-Chinaschilf zu den Gräsern, weshalb die chemische Zusammensetzung stark von den Wachstumsbedingungen beeinflusst wird, wobei ein maximaler

Cellulosegehalt von 40 % erreichbar ist (Chandel und Singh, 2011). Das Riesenschilf kann bis zu 3,5 m hoch werden, ist gegenüber Trockenheit sowie Kälte resistent und benötigt nur geringe Mengen an Dünger (Ng et al., 2010).

Die Rutenhirse ist ein ungefähr 2 m hohes Präriegras, welches sich durch schnelles Wachstum auszeichnet und genau wie das Riesen-Chinaschilf zu den Gräsern zählt. Ursprünglich in Nordamerika beheimatet wird sie kommerziell vor allem in den USA und Kanada erforscht und genutzt. Rutenhirse verfügt über ein ausgeprägtes Wurzelwerk und ist deshalb resistent gegen Trockenheit und wächst auch auf schlechten Böden. Ein weiterer Effekt ist, dass die Wurzeln der Bodenerosion vorbeugen und diese somit auch zum Verbessern der Bodenqualität eingesetzt werden kann. (Parrish und Fike, 2009).

Zuckerrohr ist eine bis zu 4 m hohe perennierende Pflanze, die zu der Familie der Süßgräser zählt. Die Halme können bis zu 5 cm dick werden und neigen zur Bestockung, was die Ausbildung mehrerer Triebe und einen maximalen Ertrag von bis zu 180 t ha<sup>-1</sup> ermöglicht. Die Zusammensetzung der getrockneten Zuckerrohrstängel beträgt 11 – 16 % Fasern, 12 – 16 % lösliche Zucker, 2 – 3 % nicht Zuckerbestandteile und 63 – 73 % Wasser (Pérez, 1997). Bei der Verarbeitung von Zuckerrohr zu jährlich 1,6 mrd. t Rohrzucker fallen große Menge Bagasse als Nebenprodukt an. Diese besteht hauptsächlich aus Cellulose (70 %), welche überwiegend in kristalliner Form vorliegt. Diese kristalline Cellulose ist von amorphen Bereichen unterbrochen, wird zu Mikrofibrillen gebündelt und von einer Matrix aus Hemicellulosen umschlossen. Weitere Bestandteile sind neben Cellulose und Hemicellulosen noch Pektin, Asche und löslicher Extrakt (Hatfield und Fukushima, 2005; Pandey et al., 2000).

Haushaltsabfall ist je nach Land und verwendetem Abfallwirtschaftskonzept ein sehr inhomogener Rohstoff und der Cellulosegehalt wird vorrangig vom Anteil an Papier und Karton bestimmt. In Mexiko beispielsweise wurde in einer Studie festgestellt, dass über 60 % der organischen Fraktion des Haushaltsabfalls aus Papier und somit überwiegend aus Cellulose besteht. Einer direkten Verwendung als Substrat für die Biogasproduktion steht bei hohen Papier- oder Kartonanteilen oft ein ungünstiges C:N Verhältnis im Weg. Als Gegenmaßnahme wird Kofermentation mit Rindergülle eingesetzt (Macias-Corral et al., 2008). In einigen Ländern ist allerdings das Potential von Haushaltsabfall bereits sehr gut durch Recycling und eine bereits bestehende energetische Nutzung ausgeschöpft und es wird in Deutschland und Österreich praktisch kein Haushaltsmüll mehr auf Deponien entsorgt (SOER, 2015).

Keine der oben genannten Lignocellulosequellen ist für die derzeitige Biogasproduktion in Deutschland aus nachwachsenden Rohstoffen von Bedeutung, da der überwiegende Teil des erneuerbaren Substrats aus Maissilage besteht. Diese nimmt mit einem Anteil von 72 % eine dominierende Stellung innerhalb der nachwachsenden Rohstoffe zur Biogasproduktion ein. Mit Abstand folgen dann die Substrate Grassilage mit einem Anteil von 12 % und GPS-Getreide mit einem Prozentsatz von 7 %. Folglich wird mit diesen drei Substraten über 90 % des aus nachwachsenden Rohstoffen stammenden Biogases produziert (Daniel-Gromke, 2017).

Durch die starke Verwendung von Maissilage zur Biogasproduktion haben die Maisanbauflächen seit dem Jahr 2000 stark zugenommen, sodass aktuell ein Viertel der gesamten Maisanbaufläche Bayerns von der Biogasproduktion in Anspruch genommen wird (LFL Pflanzenbau, 2020). Die Trockensubstanz von Maissilage besteht aus 37,9 % Stärke, 19,4 % Cellulose, 16,6 % aus Hemicellulose und zu 26,1 % aus sonstigen Bestandteilen (z.B.: Lignin, Asche) (Schober, 2008). Dabei wird die Biogasausbeute der Kolben vom Stärkegehalt dominiert, während bei der Restpflanze (Blätter und Stängel) Cellulose und Hemicellulosen überwiegen. Neben einem hohen Gasertrag ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal für Silomais dessen Silierbarkeit, welche einen Trockensubstanzgehalt von mindestens 28-30% erfordert, um die Bildung von Sickersaft während der Silierung zu verhindern. Allerdings können auch zu hohe TS-Gehalte Probleme bei der Verdichtung verursachen und der damit verbundene Sauerstoffeintrag

beeinflusst die Silagequalität negativ (Eder et al., 2012). Eine gute Qualität der Maissilage ist für die Lagerfähigkeit von Bedeutung und wenn diese gewährleistet ist, steht Silomais als Biogassubstrat auch das ganze Jahr über zur Verfügung.

Durch Reduzierung der Milchviehhaltung stehen Grünflächen für andere Verwendungen zur Verfügung, speziell auf Flächen, welche sich für Ackerbau nur beschränkt eignen. Aus diesem Grund wird Grassilage vermehrt zur Produktion von Biogas genutzt, obwohl die hektarbezogenen Erträge geringer als bei Maissilage sind (Thurner et al., 2013). Die Zusammensetzung von Grassilage ist von der Reifung abhängig. So konnte gezeigt werden, dass der Rohproteinanteil im Zuge der Reifung von über 20 % auf 3,1 % abnimmt und gleichzeitig der Gehalt an Cellulose von 17 % auf 33 % und der Gehalt an Hemicellulosen von 11 % auf 21 % steigt (MacDonald et al., 1991). Dies ist nicht nur für den Biogasertrag von Bedeutung, sondern darüber hinaus können hohe Stickstoffgehalte auch eine Hemmung der Biogasproduktion durch eine erhöhte Ammoniumkonzentrationen verursachen (Andrade et al., 2009). Ein zusätzlicher Vorteil der Nutzung von Grünflächen für die Biogaserzeugung ist, dass sich die Erntezeitpunkte gleichmäßig über das Jahr verteilen, was in Verbindung mit flexibleren Möglichkeiten der Gärrestausrückführung nach jeder Mahd eine Vermeidung von Arbeitsspitzen und Überbelastungen ermöglicht. Hinzu kommt, dass Grünflächen generell eine kürzere Sperrfrist für die Gärrestausrückführung besitzen und auch die Eigenschaft, dass diese früher im Jahr wieder befahrbar sind, ermöglicht das Verwenden von kleineren Gärrestlagern (Thurner et al., 2013).

Das letzte der 3 meist verwendeten Biogassubstrate ist GPS-Getreide. Unter diese Bezeichnung fallen die oberirdisch geernteten Pflanzenbestandteile von Getreiden, welche zu Silage verarbeitet werden. Davon leitet sich auch die Bezeichnung Ganz-Pflanzen-Silage (GPS) ab. Trotz des mengenmäßig geringen Anteils von 7 % wird Getreide-GPS in 40 % der Bayerischen Biogasanlagen eingesetzt, da es sich zur Auflockerung der Energiefruchtfolgen eignet (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, 2008). Die Zusammensetzung von Getreide-GPS ist dabei von den eingesetzten Getreidesorten oder Mischungen abhängig und wird auch stark vom Reifegrad beeinflusst. Der ideale Erntezeitraum liegt im Bereich der Milchreife und dem Ende der Teigreife. In diesem Stadium kann ein hoher Trockenmasseertrag gewährleistet und das Getreide ohne Sickersaftbildung siliert werden, während gleichzeitig durch zu hohe Trockensubstanz bedingte Lufteinschlüsse und damit Verluste verhindert werden können. Der Anteil von Lignocellulose liegt bei GPS aus Triticale oder Hafer bei ungefähr einem Drittel (Arrigo et al., 2015).

### 2.2.2 Aufbau von Cellulose

Wie bereits erwähnt, stellen Cellulose und Hemicellulosen einen Großteil der Biomasse von Pflanzen dar und sind die am häufigsten auftretenden organischen Verbindungen auf der Erde. Die Verwendung dieser Polysaccharide zur Energiegewinnung in Biogasanlagen stellt ein enormes Potential dar. Der erste Schritt in der Nutzung dieses Potentials ist der Abbau der Polysaccharide zu den kleinsten Einheiten, den Zucker Monomeren, was im Prozessschritt der Hydrolyse erfolgt, jedoch aufgrund der hohen Stabilität und der Widerspenstigkeit der Cellulose eine große Hürde darstellt.

Die wohl wichtigste Eigenschaft der Cellulose, die eine Besonderheit in der Welt der Polysaccharide darstellt und zudem für die hohe Stabilität verantwortlich ist, ist ihre kristalline Form. Dabei lagern sich ungefähr 30 einzelne Cellulosemoleküle zu sogenannten Protofibrillen zusammen, welche durch Wasserstoffbrücken innerhalb und auch zwischen den einzelnen Ketten stabilisieren. Diese Protofibrillen lagern sich dann weiter zu größeren Einheiten den sogenannten Mikrofibrillen zusammen. Dabei spielen nun nicht mehr die Wasserstoffbrückenbindungen die Hauptrolle, sondern die schwächeren van der Waals Kräfte, welche aber aufgrund der großen Kontaktfläche ebenfalls eine beachtliche Bindungskraft aufbringen (Pizzi und Eaton, 1985).

Trotz dieser oben beschriebenen Kräfte im Aufbau von Cellulose, liegt diese nicht nur in der dicht gepackten kristallinen Form vor, sondern wechselt sich auch innerhalb einzelner Fasern mit einer ungeordneten amorphen Form ab. Dabei ist der Grad der Kristallisation variabel, was mit dem lateralen Verteilungsgrad der Kristallinität beschrieben wird. Kristallinität ist ein statistischer Begriff, welche den Übergang zwischen rein kristalliner Cellulose und ausschließlich amorpher, also ungeordneter, Cellulose beschreibt (Marchessault und Howsmon, 1957). Zusätzlich zu den amorphen Regionen in der Mikrofibrille, gibt es auch noch andere Unregelmäßigkeiten welche einen regelmäßigen Aufbau stören wie Knoten oder Dreher in der Fibrille oder Hohlräume, wie Mikroporen und Kapillaren (Fan et al., 1980; Marchessault und Sundararajan, 1983). Durch diese Unregelmäßigkeiten ist die Oberfläche einer realen Cellulosemikrofibrille viel größer als die einer ideal kristallinen Mikrofibrille derselben Dimension. Ein Effekt dieser strukturellen Umbrüche innerhalb einer Faser ist dafür verantwortlich, dass Cellulose meist teilweise mit Wasser hydratisiert ist und darüber hinaus auch relativ große Moleküle, einschließlich Cellulasen durch größere Mikroporen oder Kapillaren in die Faser eindringen können (Stone et al., 1969). Somit hat die Struktur der Cellulose einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Abbaubarkeit, da eine offene Struktur den Angriff von Cellulasen erleichtert. Aufgrund oben genannter Tatsachen spielt die Auswahl der Cellulose für Experimente eine große Rolle, weil davon auch das Ergebnis abhängt. Am schwersten abbaubar unter den Cellulosen ist die mikrokristalline Cellulose, welche ausschließlich aus kristallinen Anteilen besteht, da im Zuge der Herstellung amorphe Anteile und eventuell vorhandene Hemicellulosen meist durch Behandlung mit verdünnten Säuren abgebaut werden (Trache et al., 2016). Diese mikrokristallinen Cellulosen sind in reiner Form kommerziell erhältlich und unterscheiden sich aber dennoch meist in der Partikelgrößenverteilung, was aufgrund der damit zusammenhängenden spezifischen Oberfläche einen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit hat.

Eine Eigenschaft, welche den Celluloseabbau zusätzlich erschwert ist, dass ein Großteil der Cellulose in nachwachsenden Rohstoffen als Teil der pflanzlichen Zellwand in enger Vernetzung mit Lignin und Hemicellulosen, als Lignocellulose, auftritt. Nur in wenigen Fällen, wie beispielsweise bei Baumwollfasern, kommt Cellulose ohne Lignin und mit nur einem geringen Anteil an Hemicellulosen vor (Mohanty et al., 2000). Die Hürden beim Abbau von Lignocellulose bestehen darin, die Cellulose für den mikrobiellen Abbau verfügbar zu machen, indem die Ligninstruktur aufgebrochen wird und die Hemicellulosen in Lösung gebracht werden. Um das zu gewährleisten, wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, welche unter möglichst geringem finanziellem und energetischem Aufwand und ohne Bildung von Inhibitoren für nachfolgende Fermentationen das Substrat zerkleinern, die Oberfläche vergrößern und die Zugänglichkeit zu den Cellulosefasern verbessern. Dabei soll eine offene, hydratisierte, für Enzyme zugängliche Oberfläche mit vergrößertem Porenvolumen entstehen. Zu den Standardanwendungen zählen Dampfexplosion, Vorbehandlung mit heißem Wasser und die Vorbehandlung mit organischen Lösungsmitteln (Bornscheuer et al., 2014).

### 2.2.3 Mikrobieller Abbau von Cellulose

Um die Biogaserzeugung aus pflanzlichen Materialien möglichst effizient zu betreiben, ist es wichtig, die Cellulose trotz ihrer Stabilität und Abbauresistenz rasch und möglichst vollständig zu zerlegen. Das Potential hierfür ist in der Natur vorhanden und wird beispielsweise bei aeroben Pilzen der Gattungen *Trichoderma* und *Aspergillus* gefunden (Juturu und Wu, 2014). Ferner wurde auch schon bei *Crenarchaeota* cellulolytische Aktivität nachgewiesen. Beispiele mit anaerober Lebensweise hierfür sind *Desulfurococcus fermentans* (Perevalova et al., 2005) und *Thermogladius cellulolyticus* (Mardanov et al., 2012). Auch in der Domäne der Bakterien findet sich cellulolytische Aktivität, hier zeigen sich vor allem bei den Clostridien ein großes Potential zum anaeroben Abbau von kristalliner Cellulose (Koeck et al., 2014a).

Ein Überblick, welche Vertreter der Mikroorganismen auch eine Rolle beim Celluloseabbau in Biogasanlagen spielen, ist in Tabelle 1 gegeben. Hier ist zusammengefasst, welche Mikroorganismen bereits erfolgreich in Biogasanlagen identifiziert wurden. Die Betriebsparameter dieser Anlagen waren in der Arbeit von Schluter et al. (2008) 41 °C und ein pH-Wert von 7,7 mit einer Mischung aus Maissilage (63 %), Grünroggen (35 %) und Hühnermist (2 %) als Substrat. Das Substrat in der von Wirth et al. (2012) im Labormaßstab betriebenen Anlage bestand aus Maissilage und Schweinegülle in einem unbekanntem Mischungsverhältnis und die Betriebsparameter waren ein pH-Wert von 7,9 bis 8,4 und eine Temperatur von 37 °C. Die von Qiao et al. (2013) analysierte Anlage wurde mit unbehandeltem Maisstroh bei 35 °C und einem pH-Wert von 7,0 betrieben, somit waren die Betriebsparameter (35 °C und pH = 7,0) identisch zu der von Li et al. (2013) beprobten Biogasanlage, lediglich das Substrat war mit einer Mischung aus Küchenabfällen (15 %), Schweinegülle (42,5 %) und Faulschlamm (42,5 %) ein gänzlich anderes. Die letzte aufgeführte Biogasanlage wurde von Stolze et al. (2015) analysiert und wurde bei 40 °C, einem pH-Wert von 7,8 und einer Substratmischung von 72 % Maissilage und 28 % Schweinegülle betrieben.

Tabelle 1: Überblick über bereits in Biogasanlagen nachgewiesenen Mikroorganismen (Li et al., 2013; Qiao et al., 2013; Schluter et al., 2008; Stolze et al., 2015; Wirth et al., 2012). Die Betriebsparameter der untersuchten Biogasanlagen waren: Schluter et al. (2008) pH= 7,7 T= 41 °C Substrat= Maissilage (63 %), Grünroggen (35 %) und Hühnermist (2 %); Wirth et al. (2012) pH= 7,9-8,4 T= 37 °C Substrat= Maissilage und Schweinegülle; Qiao et al. (2013) pH= 7,0 T= 35 °C Substrat= Maisstroh; Li et al. (2013) pH= 7,0 T= 35 °C Substrat= Küchenabfälle (15 %), Schweinegülle (42,5 %) und Faulschlamm (42,5 %); Stolze et al. (2015) pH= 7,8 T= 40 °C Substrat= 72 % Maissilage und 28 % Schweinegülle. Ein ✓ kennzeichnet den Nachweis in einer Anlage und ein hinterlegen mit grüner Farbe markiert Vertreter, welche auf kristalliner Cellulose als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können (Koeck et al., 2014a).

	(Schluter et al., 2008)	(Wirth et al., 2012)	(Qiao et al., 2013)	(Li et al., 2013)	(Stolze et al., 2015)
<i>Acetivibrio multivorans</i>			✓		
<i>Acholeplasma laidlawii</i>		✓			
<i>Alistipes shahii</i>				✓	
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	✓	✓		✓	
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	✓			✓	
<i>Aminobacterium colombiense</i>				✓	
<i>Anaerococcus prevotii</i>				✓	
<i>Anaerosporeobacter mobilis</i>			✓		
<i>Anaerotruncus colihominis</i>		✓			
<i>Bacillus cereus</i>		✓			
<i>Bacillus coagulans</i> 36D1	✓				
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	✓				
<i>Bacillus megaterium</i>				✓	
<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	✓				
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>			✓		
<i>Bacillus thuringiensis</i>		✓			
<i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185	✓				
<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799	✓	✓			

<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	✓				
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	✓	✓		✓	
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	✓			✓	
<i>Bifidobacterium longum</i>		✓			
<i>Butyrivibrio fibriosolvens</i>			✓		
<i>Butyrivibrio hungatei</i>			✓		
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>		✓			
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	✓	✓			
<i>Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae</i>				✓	
<i>Candidatus Cloacamonas acidaminovorans</i>		✓			
<i>Candidatus Methanoregula boonei</i> 6A8	✓				
<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i> Z-2901	✓	✓			
<i>Catabacter hongkongensis</i>			✓		
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	✓	✓		✓	
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>			✓		
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	✓			✓	
<i>Clostridium carboxidivorans</i>		✓			
<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	✓	✓		✓	✓
<i>Clostridium cellulosi</i>			✓		
<i>Clostridium cellulovorans</i>					✓
<i>Clostridium clariflavum</i>					✓
<i>Clostridium difficile</i>		✓			✓
<i>Clostridium ganghwense</i>			✓		
<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	✓	✓		✓	✓
<i>Clostridium novyi</i> NT	✓			✓	
<i>Clostridium perfringens</i>		✓			
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	✓			✓	
<i>Clostridium saccharolyticum</i>		✓			
<i>Clostridium tetani</i> E88	✓			✓	
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i>			✓		
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	✓	✓			
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	✓			✓	
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>				✓	
<i>Desulfosporosinus auripigmenti</i>			✓		
<i>Desulfotomaculum carboxydivorans</i>					✓
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	✓	✓			
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Cloacae</i>				✓	
<i>Enterococcus faecalis</i>		✓		✓	
<i>Enterococcus faecium</i>		✓			
<i>Escherichia coli</i>		✓			
<i>Eubacterium ventriosum</i> ATCC 27560	✓				
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		✓		✓	
<i>Fingoldia magna</i>		✓		✓	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Nucleatum</i>				✓	
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	✓				

<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	✓				
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	✓			✓	
<i>Heliobacterium modesticaldum</i>		✓		✓	
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>				✓	
<i>Kosmotoga olearia</i>				✓	
<i>Leuconostoc garlicum</i>			✓		
<i>Listeria monocytogenes</i>		✓			
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>				✓	
<i>Mahella australiensis</i>					✓
<i>Methanoculleus bourgensis</i>					✓
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	✓			✓	✓
<i>Methanosaeta thermopila</i>				✓	
<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	✓			✓	
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro	✓			✓	
<i>Methanosarcina mazei</i>				✓	
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	✓				
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	✓	✓	✓		
<i>Papillibacter cinnamivorans</i>			✓		
<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	✓	✓		✓	
<i>Parabacteroides merdae</i> ATCC 43184	✓				
<i>Parasporobacterium paucivorans</i>			✓		
<i>Pedobacter heparinus</i>				✓	
<i>Pelotomaculum isophthalicicum</i>			✓		
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	✓	✓			✓
<i>Petrotoga mobilis</i> SJ95	✓			✓	
<i>Pirellula staleyii</i>				✓	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	✓				
<i>Prevotella ruminicola</i>				✓	
<i>Pseudobutyrvibrio Ruminis</i>			✓		
<i>Psychrobacter arcticus</i>				✓	
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>				✓	
<i>Robinsoniella peoriensis</i>			✓		
<i>Roseiflexus castenholzii</i>				✓	
<i>Ruminococcus albus</i>		✓			
<i>Ruminococcus bromii</i>			✓		
<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	✓				
<i>Ruminococcus obeum</i> ATCC 29174	✓				
<i>Ruminococcus torques</i> ATCC 27756	✓				
<i>Sedimentibacter hongkongensis</i>			✓		
<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>			✓		
<i>Slackia heliotrinireducens</i>		✓			
<i>Sporobacter termitidis</i>			✓		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		✓			
<i>Streptococcus agalactiae</i>		✓			
<i>Streptococcus gallolyticus</i>				✓	✓
<i>Streptococcus henryi</i>			✓		

<i>Streptococcus macedonicus</i>					✓
<i>Streptococcus pasteurianus</i>					✓
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		✓			
<i>Streptococcus infantarius</i>					✓
<i>Streptococcus suis</i>		✓			✓
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>			✓		
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	✓			✓	
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>				✓	
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> str. Goettingen	✓	✓		✓	✓
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>					
<i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i> ATCC 33223	✓				
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	✓				
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	✓			✓	
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>		✓			✓
<i>Thermoanaerovibrio acidaminovorans</i>				✓	✓
<i>Thermosinus carboxydivorans</i> Nor1	✓				
<i>Thermotoga lettingae</i> TMO	✓				
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405	✓				
<i>Trichococcus collinsii</i>			✓		
<i>Victivallis vadensis</i> ATCC BAA-548	✓				

Zur Identifikation der Mikroorganismen mit cellulolytischer Aktivität sind in Tabelle 1 alle Vertreter grün hinterlegt, welche auf kristalliner Cellulose als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen können (Koeck et al., 2014a). Von den in Biogasanlagen bestätigten Mikroorganismen zählen somit neun zu den celluloseabbauenden, wovon sechs Clostridien sind. Folglich lässt sich aus diesen Ergebnissen deren dominante Stellung innerhalb der celluloseabbauenden Mikroorganismen in Biogas ableiten, weshalb diese für genaueres Monitoring in Betracht gezogen wurden. Im speziellen wurde der Focus auf die Vertreter *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans* und *C. thermocellum* gelegt, da deren cellulolytisches Potential und die dazugehörigen Regulationsmechanismen bereits in wissenschaftlicher Literatur beschrieben und dokumentiert sind (siehe auch Abschnitt 2.3).

Beim Celluloseabbau wird zwischen 2 Mechanismen unterschieden. Beim ersten Mechanismus erfolgt die Hydrolyse unter Sekretion von individuellen Endoglucanasen, Exoglucanasen und Hilfsenzymen, welche in die Umgebung der Mikroorganismen segregiert werden, wo diese dann synergistisch zusammenwirken, um die die Cellulose der pflanzlichen Zellwand abzubauen. Zu den am besten untersuchten Spezies mit dieser Art von Celluloseabbau gehört der aerobe Pilz *Trichoderma reesei*.

Anaerobe Mikroorganismen verfolgen meist eine andere Strategie zum Abbau von Cellulose. Diese produzieren sehr große (>1 000 kDa) Multienzymkomplexe, sogenannte Cellulosome, welche an die Zelloberfläche der Anaerobier gebunden sind. Ein schematischer Aufbau eines Cellulosoms, die zu den größten extracellulären Enzymkomplexen überhaupt zählen, ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

Diese extracellulären Enzymkomplexe wurden erstmals 1985 bei *C. thermocellum* als Protuberanzen der Zelloberfläche beschrieben (Bayer et al., 1985). Auch damals war schon bekannt, dass es sich beim Cellulosom nicht um ein einzelnes Protein, sondern um einen Proteinkomplex mit verschiedenen Bestandteilen handelt. Das Rückgrad eines Cellulosoms bildet ein Gerüstprotein (Scaffoldin) an welchem unterschiedliche Enzyme angelagert sind. Darüber hinaus weist das Scaffoldin, neben den



Bindungsstellen für Cellulasen, auch Bindungsstellen für das Substrat und für zellwandgebundene Proteine auf.

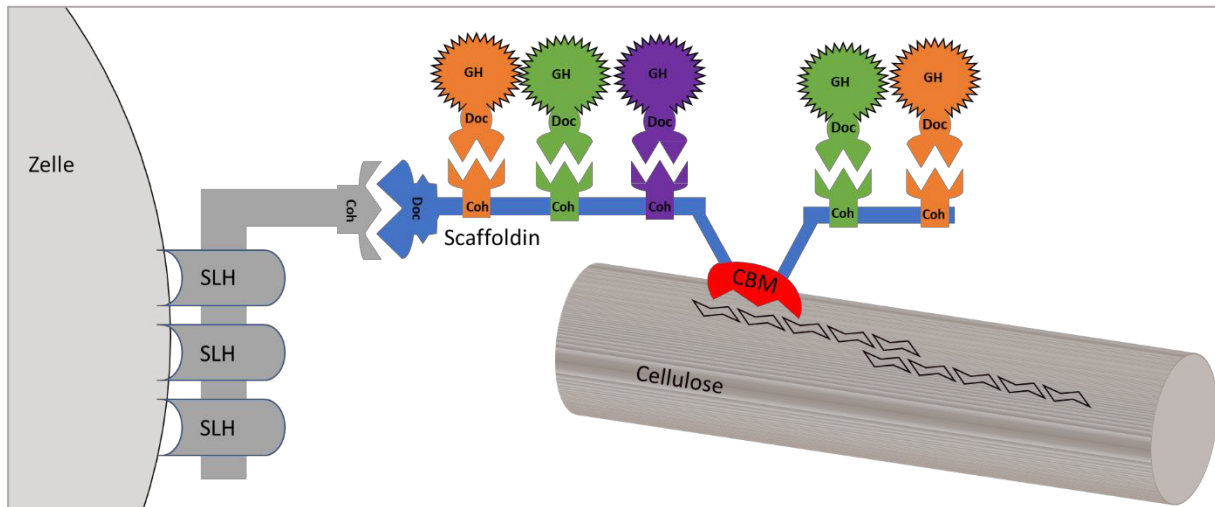


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Cellulosoms mit kohlenhydratbindendem Modul (CBM), Gerüstprotein (Scaffolding) mit Cohesindomänen und Glycosidhydrolasen mit Dockerindomänen. Die Verankerung an die Zellwand erfolgt über surface layer homology (SLH) Module. modifiziert, nach Yaniv et al. (2014)

Für Bindungen mit anderen Proteinen, wie den Cellulasen und zu zellwandgebundenen Proteinen sind die im Scaffolding vorhandenen Cohesindomänen verantwortlich. Die zuerst beschriebene Gruppe von Cohesinen werden als Typ I bezeichnet und als dann in weiteren Studien nicht zu Gruppe I homologe Cohesindomänen entdeckt wurden, wurden diese als Typ II und Typ III bezeichnet (Ding et al., 2001; Leibovitz und Béguin, 1996). An diese Cohesindomänen können Enzyme mit Dockerindomänen binden, wobei die unterschiedlichen Typen nicht zueinander kompatibel sind. Die Cohesindomänen unterschiedlicher Spezies weisen zwar homologe Elemente auf, sind aber, wie im Versuch mit *C. thermocellum* und *C. cellulolyticum* gezeigt wurde, ebenfalls untereinander nicht kompatibel (Pagès et al., 1997). Bei *C. thermocellum* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Verankerung an der Zelloberfläche über surface layer homology (SLH) Module erfolgt und Bindung durch ein Cohesin Typ II stattfindet (Lemaire et al., 1995). Diese Beispiele zeigen wie spezifisch die Cohesindomänen des Scaffolding sind und somit einen spezifischen Aufbau des Cellulosoms erlauben.

Die nächste wichtige Funktion des Scaffolding ist das Erkennen und das Binden an das Substrat. Das erfolgt über das kohlenhydratbindende Modul (carbohydrate binding module – CBM) des Gerüstproteins. Ursprünglich wurden diese als Cellulose bindende Domänen (CBD) bezeichnet, da die ersten beschriebenen spezifisch an kristalline Cellulose gebunden haben. Als dann im Zuge weiterer Forschungsarbeit eine größere Breite an Bindungspartnern entdeckt wurde, war eine Umbenennung nur konsequent. Heute sind über 183 000 CBMs bekannt und werden anhand von Kriterien wie Aminosäuresequenz, funktionellen Gruppen oder evolutionären Verwandtschaften in 85 Familien eingeteilt (Henrissat, 2019). Die kohlenhydratbindenden Module grenzen sich zu Lektinen durch eine vorhandene enzymatische Aktivität ab, welche entweder am gleichen Protein oder im Falle des Cellulosoms im gleichen Proteinkomplex vorhanden ist. Die Bindungsspezifität der CBMs erstreckt sich über kristalline und nicht kristalline Cellulose, Chitin und  $\beta$ -1,3 Glucanen bis hin zu Xylan, Mannan, Stärke und anderen Kohlenhydraten (Boraston et al., 2004). Aufgrund der Vielfalt von Substraten werden die CBMs auch nach Substratspezifität eingeteilt, so zählen Module zum Binden an kristalline Polysaccharide zu Typ A, CBMs, welche an einzelne Polysaccharide binden, zum Typ B und CBMs, welche an kleine Zuckermoleküle binden, zu Typ C. Folglich zählen die CBM von kristalliner Cellulose abbauenden Clostridien zum Typ A, und gehören zu den Familien 1, 2a, 3, 5, und 10. Sie weisen an der ungewöhnlich flachen, plattformartigen Oberfläche aromatische Aminosäuren auf und passen sehr gut zu den flachen Oberflächen von Cellulose oder Chitinkristallen (McLean et al., 2000; Tormo et al.,

1996), können aber an lösliche Kohlenhydrate nur schwer oder gar nicht binden (Nagy et al., 1998). Das zeigt, dass die Faltung und somit die Topographie des Kohlenhydrat bindenden Moduls die wichtigste Eigenschaft für die Bindungsspezifität ist.

Der letzte und wichtigste Bestandteil eines Cellulosoms sind die hydrolytischen Enzyme, wobei hier nicht nur Cellulasen auftreten, sondern auch Hemicellulasen, Pectinasen, Chitinasen und ergänzende Enzyme. Diese Bandbreite ist notwendig, da in der pflanzlichen Zellwand die Cellulosefasern im Verbund mit Hemicellulosen, wie Xylan oder Mannan, auftreten und für den Abbau folglich ein breites Spektrum an Enzymen zum Einsatz kommt. In manchen Publikationen wird daher das Cellulosom als gesamter Komplex ausgestattet mit unterschiedlichsten Enzymen als „Zellwandase“ bezeichnet. (Murashima et al., 2002). Die Vielseitigkeit eines Cellulosoms wird aber nicht nur durch die Anzahl der unterschiedlichen Enzyme sichergestellt, sondern durch den flexiblen Aufbau gewährleistet. So bilden die gleichen Zellen beim Wachstum auf unterschiedlichen Substraten auch unterschiedliche Cellulosome aus (Han et al., 2003). Dieser flexible Aufbau wird durch die Cohesindomänen im Scaffoldin ermöglicht, denn alle cellulosomal Enzyme weisen eine 22 Aminosäuren lange duplizierte Sequenz, das sogenannte Dockerin, auf (Bayer et al., 1994). Mit diesem können die exprimierten Enzyme flexibel an die Cohesindomänen des Scaffoldins binden und in enger räumlicher Anordnung gezielt das jeweilige Substrat abbauen, wobei Synergieeffekte optimal genutzt werden.

Der hier beschriebene Aufbau des Cellulosoms mit Scaffoldin, den dazugehörigen CBMs und den an die über das Cohesin/Dockerin System gebundenen Enzymen entspricht dem generellen Aufbau des Cellulosoms. Allerdings gibt es auch wesentlich komplexere Cellulosomstrukturen so hat *Acetivibrio cellulolyticus* 2 primäre Scaffoldins *ScaA* und *ScaC*, sowie ein adaptives Scaffoldin *ScaB*, welches die beiden primären Scaffoldins verbindet. Mit diesem Aufbau ist es möglich bis zu 96 cellulosomale Proteine zu einem großen Komplex zusammenzubringen, welche nur an einer Stelle über *ScaC* mit der Zellwand verbunden sind (Xu et al., 2003). Auch verfügen nicht alle Cellulosome über die gleichen Bestandteile, so finden sich beispielsweise im Cellulosom von *C. thermocellum* spezielle Dockerindomänen, welche sich von den anderen unterscheiden und als Dockerin II bezeichnet werden. Diese binden an Cohesin II Domänen, welche in den Proteinen *SdbA*, *ORF2p* und *OlpB* vorkommen, die wiederum an S-Schicht Proteine binden können und das Cellulosom somit der Zelloberfläche verbinden (Leibovitz et al., 1997). Diese speziellen Dockerindomänen kommen in mesophilen Zellen nicht vor, weshalb in diesen Fällen von einem anderen Mechanismus ausgegangen werden muss.

## 2.3 Die wichtigsten Vertreter der Domäne Bacteriaceae mit cellulolytischer Aktivität und deren Genregulation

### 2.3.1 *Clostridium cellulolyticum*

*C. cellulolyticum* ist ein Modelorganismus für mesophile celluloseabbauende Clostridien. Es wurde von verrottendem Gras isoliert, zählt nicht zu den im Pansen vorkommenden Mikroorganismen und verfügt wie viele cellulolytische *Clostridien* über ein extrazelluläres Cellulosom (Desvaux, 2005). *C. cellulolyticum* kommt in der Biozönose von Biogasanlagen vor und konnte über im Metagenom vorhandene spezifische Eisenhydrogenasegene nachgewiesen werden (Pap et al., 2015).

Die für den Celluloseabbau verantwortlichen Gene in *C. cellulolyticum* wurden von Xu et al. (2013) untersucht und aufgrund deren Anordnung im Bakterienchromosom in 4 Gruppen eingeteilt. Die Einteilung und die wesentlichen Ergebnisse von Xu et al. (2013) sind nachfolgend dargestellt:

1. Der cip-cel Cluster kodiert für die wesentlichen Bestandteile des Cellulosoms; die Cellulasen und das Scaffoldin.
2. Der Xyl-doc Cluster, kodiert speziell für Hemicellulose abbauende Enzyme.
3. Drei kleine Cluster mit weiteren Proteinen des Cellulosoms.

#### 4. Zwei Cluster mit cellulosomalenen und nicht cellulosomalenen Genen.

Die Proteinexpression in Gruppe 1 wird vermutlich durch Katabolitrepression reguliert, da ein cre ähnliches (cre = cAMP response element) Motiv vorgelagert vom cip-cel Cluster identifiziert wurde. Des Weiteren wurde für das Protein *Ccel\_1005* eine 55 %ige Ähnlichkeit mit dem Catabolite control protein A (CcpA) in *Bacillus subtilis* festgestellt. Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass auch cre-Sequenzen gefunden wurden, welche von CcpA-unabhängigen Sequenzen reguliert werden.

Ein weiterer vermuteter Mechanismus zur Regulation der Proteinexpression in *C. cellulolyticum* ist die Regulation mittels Two-Component-System (TCS), da sich im Genom 37 vermeintliche Gene in unmittelbarer Nähe zu Gruppe 2 und Gruppe 3 CAZymes, sowie von mutmaßlichen ABC Transportern befinden. Die an diesen Stellen vorhandenen CAZyme-Gene zeigen im Experiment ähnliche Expressionniveaus wie die ABC-transporter Gene.

Zusammenfassend wird aufgrund der Expressionslevel der einzelnen Proteine bei den oben genannten Kohlenhydraten für Gene im Zusammenhang mit dem Celluloseabbau ein durch carbon catabolite repression gesteuerter Mechanismus vorgeschlagen, welcher bei schwer abbaubaren Kohlenstoffquellen aktiv ist und durch Cellobiose und Xylose unterdrückt wird. Andererseits bewirkt die TCS-Regulierung der Hemicellulasen des Xyl-doc Clusters und der ABC Transporter eine substratabhängige Induktion der Proteinexpression.

Bei den Versuchen zur Genexpression zeigten die zum Celluloseabbau nötigen Gene ein vierfach erhöhtes Expressionslevel beim Wachstum auf Glucose im Vergleich zu Cellobiose, Xylose oder Xylanen. Dieses Verhalten lässt auf eine Induktion von zumindest einigen für den Celluloseabbau verantwortlichen Genen schließen und konnte auch durch Experimente belegt werden. Wie in Abbildung 3A erkennbar, bewirkt die Zugabe von Glucose einen rascheren Beginn des Celluloseabbaus. Dieser Effekt tritt am stärksten bei geringen Glucosekonzentrationen auf, da die höchste Abbaugeschwindigkeit bei einer Konzentration von  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  Glucose zu beobachten ist und sich bei stufenweiser Erhöhung der Glucosekonzentration verschlechtert (Abbildung 3B).

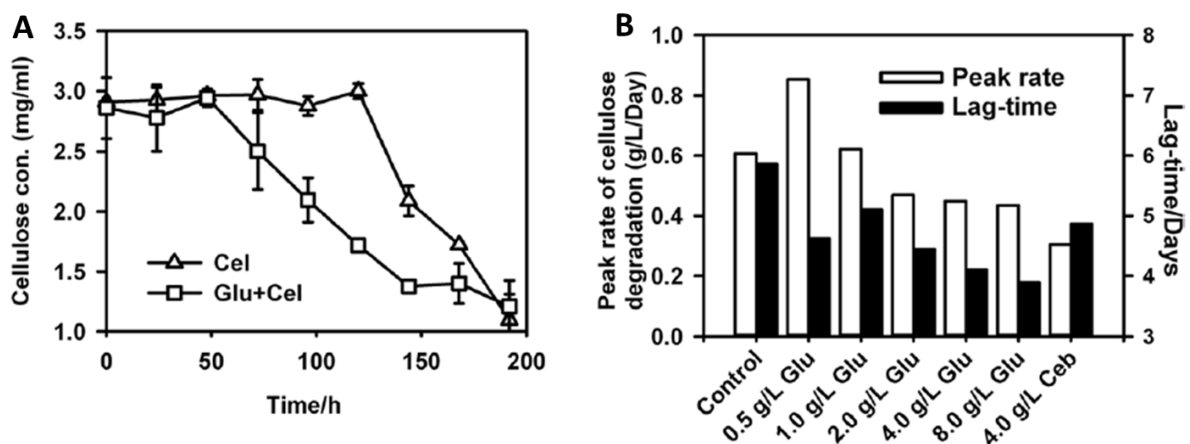


Abbildung 3: A: Cellulosekonzentration bei Wachstum von *C. cellulolyticum* auf Cellulose mit und ohne Zusatz von  $3 \text{ g l}^{-1}$ . B: Die maximale Celluloseabbaurate, sowie die Versuchsdauer im diese zu erreichen in Abhängigkeit der Konzentration an Glucose und Cellobiose. (Xu et al., 2013)

Die oben angeführten Beobachtungen werden in dem auch in Abbildung 4 dargestellten Modell zur Regulation des Cellulosoms zusammengeführt. Das vorgeschlagene Modell umfasst 3 funktionelle Klassen von Proteinen: CAZymes, welche den Celluloseabbau katalysieren, ABC-Transporter, die für den Transport der durch den Celluloseabbau freigesetzten löslichen Zucker verantwortlich sind und Signalübermittlungssysteme (CCR- carbon catabolite repression und TCS- two component system).

Wächst *C. cellulolyticum* nun auf einem mineralischen Medium mit Lignocellulose als Substrat, bewirkt die niedrige Konzentration von Metaboliten der Glykolyse die Freisetzung des CCR- Mechanismus (A). Somit bleibt das Phosphatcarrierprotein (Crh) dephosphoryliert, wodurch ein CcpA ähnliches Protein nicht aktiviert und die Expression für den Celluloseabbau verantwortlicher Gene nicht inhibiert werden. Deren Expression führt zum Ausbilden des an die Zelle gekoppelten Cellulosoms, welches die Hydrolyse der Lignocellulose katalysiert (B). Die entstehenden löslichen Zucker docken nun an die zuckerbindenden Proteine (SBP) und bewirken durch die folgende Phosphorylierung eines Responderregulators (RR), des TCS (C), die Transkription der CAZymes sowie der ABC Transportergene. Die entstandenen CAZymes könnten den Celluloseabbau und die Freisetzung löslicher Zucker weiter beschleunigen (D), während die ABC Transporter die Zucker ins Zellinnere transportieren und der Glykolyse zuführen (E), wodurch sich durch Inhibierung der Expression cellulosomalere Gene über carbon catabolite repression der Regelkreis schließt.

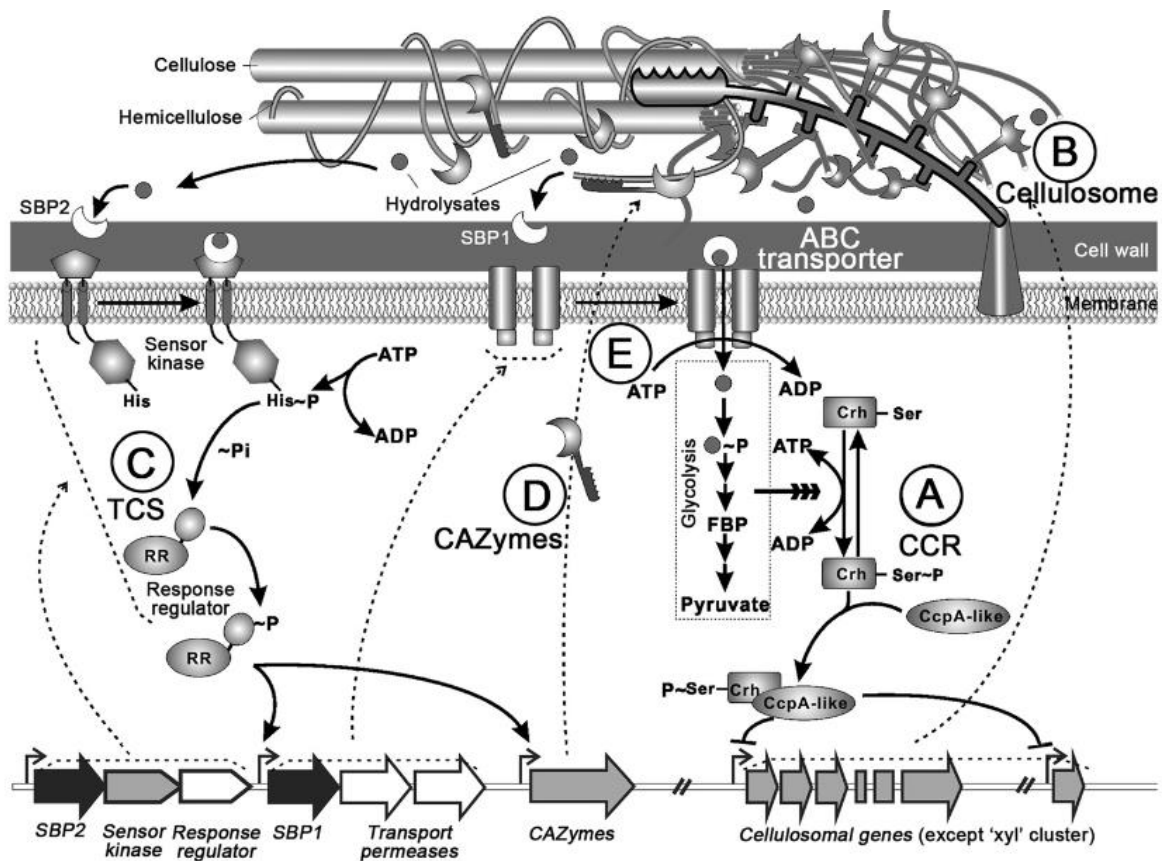


Abbildung 4: Modell der Regulation des Celluloseabbaus in *C. cellulolyticum*

Das CCR System (A) der Zelle steuert die Expression von celluloseabbauenden Enzymen (B), während das TCS (C) auf extrazelluläre Zucker reagiert und die Freisetzung der entsprechenden CAZymes (D) und Transporter (E) reguliert (Xu et al., 2013).

Das Besondere an diesem Mechanismus ist, dass Glucose die Expression von cellulosehydrolysierenden Enzymen verstärkt und nicht aufgrund der Katabolitrepression die Nutzung eines anderen Kohlenhydrats unterdrückt, wie dies bei bekannten CCR Modellen in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* der Fall ist. Vermutlich tritt dieses Phänomen deshalb nicht auf, da wie bei *C. thermocellum* nicht Glucose, sondern Cellobiose die bevorzugte C-Quelle ist (Demain et al., 2005) und Glucose eher als Signal für nahegelegene cellulolytische Aktivität wirkt.

### 2.3.2 *Clostridium thermocellum*

In einer Studie wurde *C. thermocellum* in 9 von 9 untersuchten Biogasanlagen nach vorhergehender Anreicherung mit Cellulose als einzige Kohlenstoffquelle nachgewiesen. Von den Biogasanlagen

wurden sechs im mesophilen und eine im thermophilen Temperaturbereich betrieben. Zwei Anlagen wurden in einem 2-stufigen Verfahren betrieben. Als Substrat wurde Silage von Mais, Gras oder Zuckerrübe allein oder unter Zusatz von Dung verwendet (Koeck et al., 2014b). Weiter wurde *C. thermocellum* aus einem Biogasprozess mit Maissilage über die Eisenhydrogenase im Metagenom nachgewiesen (Pap et al., 2015).

In *C. thermocellum* wurden sechs vermeintliche Operons identifiziert, welche für alternative  $\sigma$ -Faktoren sowie die dazugehörigen membranassoziierten Anti- $\sigma$ -Faktoren kodieren und eine Homologie zum bekannten *B. subtilis* alternativen  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^I$  und zum zugehörigen Anti- $\sigma^I$ -Faktor *RsgI* aufweisen. Die außerzellulären Module dieser Proteine verfügen über zucker- und kohlenhydratbindende Elemente (CBM). Bindet nun ein CBM an ein passendes Polysaccharid, so wird durch eine Konformationsänderung in der zellinneren Domäne des Anti- $\sigma$ -Faktors der  $\sigma$ -Faktor freigesetzt. Dieser bewirkt anschließend durch Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription der cellulosomal sowie der eigenen bicistronischen Gene (Nataf et al., 2010)

Nach dem oben und in Abbildung 5 vorgestellten Mechanismus bewirkt die Freisetzung eines  $\sigma$ -Faktors nicht nur die Expression von Strukturgenen, sondern auch eine verstärkte Expression der eigenen Gene, wodurch es möglich ist, vom Expressionslevel des  $\sigma$ -Faktors abzuleiten, ob dieser an den Anti- $\sigma$ -Faktor gebunden ist oder nicht. Dies ermöglicht es festzustellen, welche externen Stimuli am CBM die Freisetzung des  $\sigma$ -Faktors bewirken. In Abbildung 6 ist der Einfluss von Cellulose und Xylanen auf die relative Expression dargestellt. Nach den Ergebnissen lassen sich die  $\sigma$ -Faktoren in 3 Gruppen unterteilen: *sig11* und *sig12* werden in Anwesenheit von Cellulose freigesetzt und durch Xylane nicht beeinflusst, während *sig13*, *sig15* und *sig16* fast ausschließlich von Xylanen beeinflusst werden. Auffallend ist die dritte Gruppe bestehend aus *sig14* und *sig24C*, weil hier die Expression durch Cellulose bewirkt und durch Xylane weiter verstärkt wird, obwohl die kohlenhydratbindenden Module CBM3 und GH5 Cellulose als Zielpolysaccharid haben. Möglicherweise kann durch diesen Effekt der Celluloseabbau durch *C. thermocellum* beschleunigt werden.

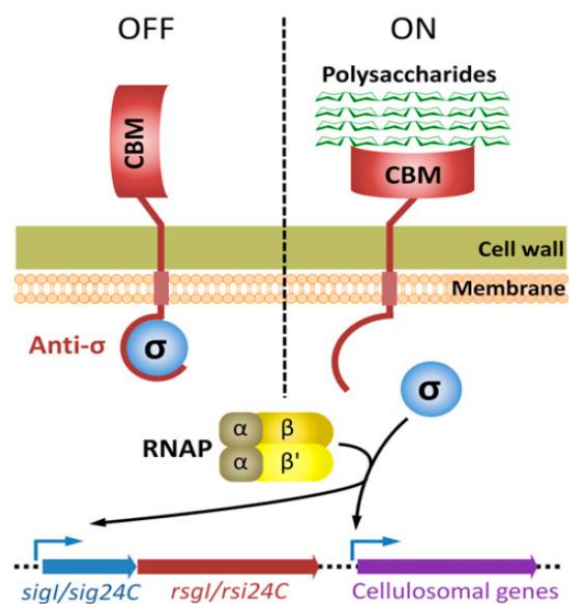


Abbildung 5: Vorgeschlagene Genregulation der cellulosomal Genexpression

Bei Kontakt mit einem passenden Polysaccharid wird der  $\sigma$ -Faktor freigesetzt und bewirkt die Transkription cellulosomal Genexpression (Nataf et al., 2010)

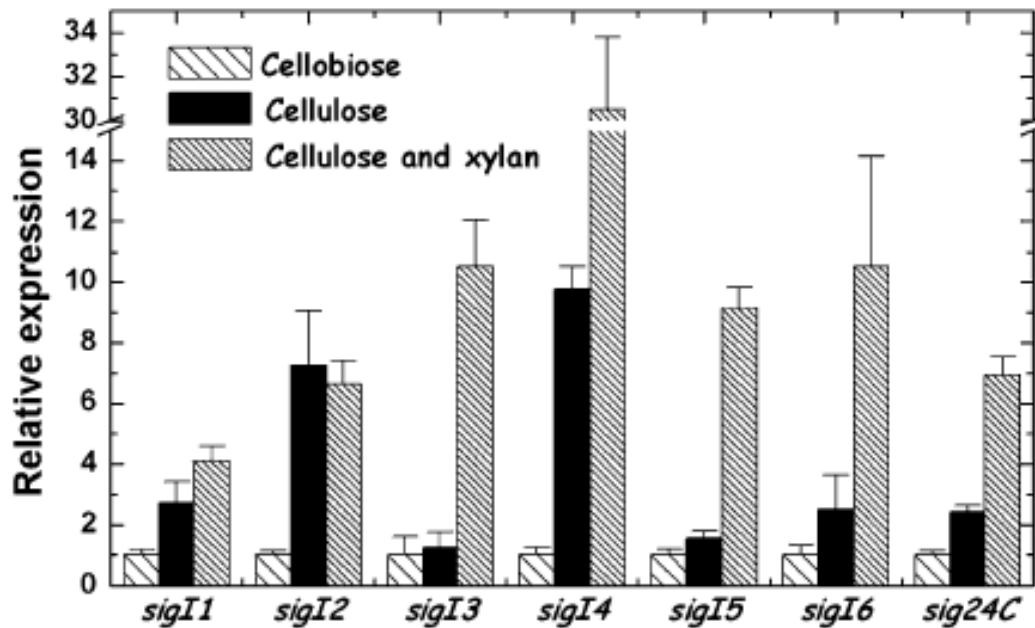


Abbildung 6: RT-PCR Analyse der Genexpression von  $\sigma$ -Faktoren  
Bestimmt bei Wachstum auf Cellobiose, Cellulose oder Cellulose mit Xylan (Nataf et al., 2010)

Ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Regulation der Cellulaseproduktion von *C. thermocellum* ist mit der Aufklärung der Strukturen dreier Polysaccharid-Sensor-CBM gelungen (Yaniv et al., 2014). Diese ähneln den bereits in 1996 publizierten Strukturen des CBM des *C. thermocellum* Scaffoldings (Tormo et al., 1996) und verfügen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die der Stabilisierung der Struktur dienen. An der Bindungsstelle für Cellulose verfügt dabei das erste untersuchte Polysaccharid-Sensor-CBM über einen 32,5 Å langen planaren Abschnitt aus vier aromatischen Aminosäuren (Tyr60, Phe61, Tyr109 und Trp113), welcher bei einem Abstand von 5,2 Å zwischen den Glucoseeinheiten im Cellulosemolekül etwa 6 Glucose-Ringen Platz bieten würde (Abbildung 7). Das zweite Polysaccharid-Sensor-CBM bindet an amorphe und kristalline Cellulose und verfügt über eine Bindungstasche mit einer Länge von 16,5 Å (Arg110, Asp61 und Trp62), womit ca. 3 Glucose-Ringe in die Tasche passen. Das dritte untersuchte Polysaccharid-Sensor-CBM bindet lediglich schwach an Xyloglucan und nicht an Cellulose.

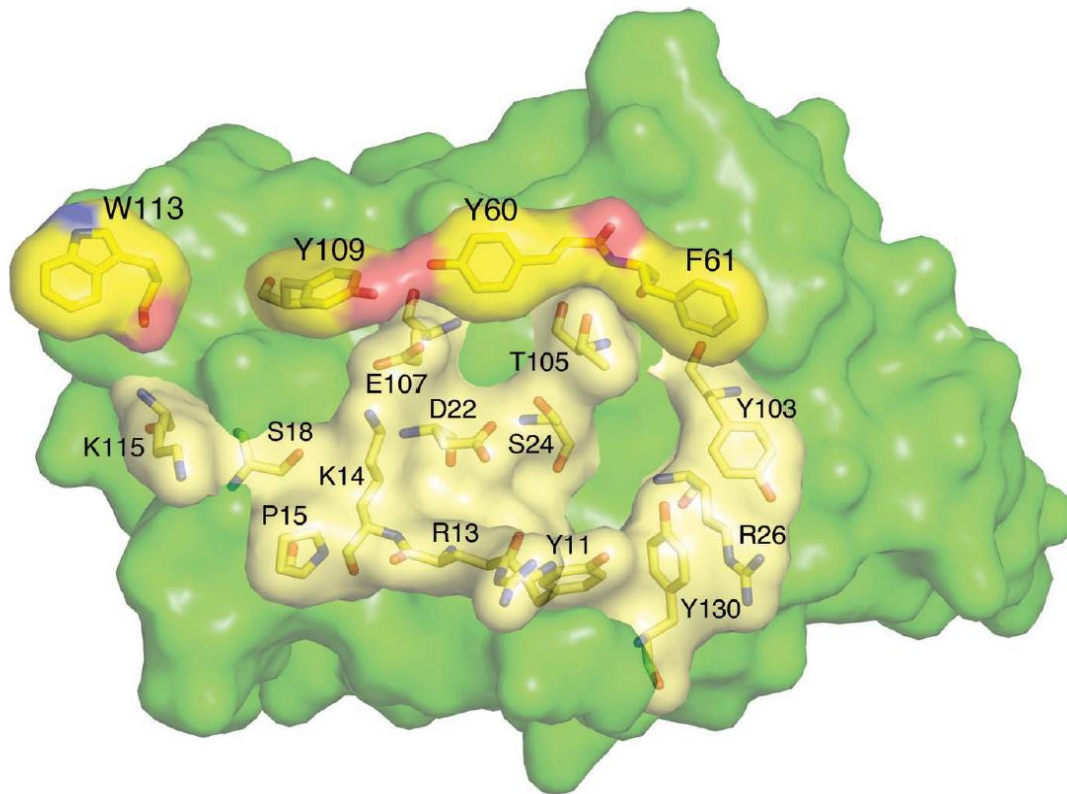


Abbildung 7: Abbildung der Cellulose bindenden Region des RsgI-CBM3 Moduls 0059CBM3b, mit den mutmaßlichen cellulosebindenden Bereichen gelb hervorgehoben. Die einzelnen Atome der beteiligten Aminosäuren sind farblich gekennzeichnet; Kohlenstoff, gelb; Sauerstoff, rot; Stickstoff, blau. Abbildung entnommen aus Yaniv et al. (2014).

### 2.3.3 *Clostridium cellulovorans*

*Clostridium cellulovorans* gehört zu den celluloseabbauenden Clostridien. Erstmals beschrieben wurde *C. cellulovorans* 1984, als eine Verdünnungsreihe aus einer anaeroben Vergärung von Pappelholz angelegt wurde und in Hungateröhrchen mit gemahlener Cellulose bebrütet wurde. Hier zeigten sich nach 24 bis 48 h klare Höfe um die Kolonien, was auf einen Celluloseabbau hinwies. Neben Cellulose kann Xylan, Pektin, Cellobiose, Glucose, Maltose, Galactose, Saccharose und Mannose als Substrat verstoffwechselt werden. Die optimalen Wachstumsbedingungen wurden bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,0 ermittelt (Sleat et al., 1984).

Der Abbau von Cellulose erfolgt wiederum mithilfe eines extracellulären Proteinkomplexes, dem Cellulosom. Dieses besteht aus den, auch bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen vorhandenen, Hauptbestandteilen: Scaffolding Protein *CbpA*, den Endoglucanasen *EngE* und *EngK*, der Cellobiohydrolase *ExgS*, der Xylanase *XynA*, der Mannase *ManA* und drei weiteren Proteinen (Murashima et al., 2002). Neben diesen offenbar permanent vorhandenen Bestandteilen können weitere hydrolytische Enzyme bei Induktion durch bestimmte Substrate zusätzlich exprimiert werden. So konnte durch Analyse des Exoproteoms gezeigt werden, dass sich beim Wachstum auf Cellobiose, Xylan, Pektin und phosphorsauer geschwollener Cellulose die Zusammensetzung verändert. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass 81 % der extracellulären Proteine nicht im Cellulosom vorkommen, sondern zu den nichtcellulosomalen Proteinen zählen. Zwar sind im Genom von *C. cellulovorans* im Vergleich zu anderen celluloseabbauenden Clostridien anteilig mehr nichtcellulosomale Glycosylhydrolasen und polysaccharolytische Lyasen kodiert, dass sich dieser Überhang aber auch auf die Proteinebene durchschlägt, ist bemerkenswert. Auch deuten die Daten dieser Studie darauf hin, dass die cellulosomalen Proteine als Basalproteine exprimiert werden,

während das Expressionsniveau der substratspezifischen freien Enzyme viel stärker mit den entsprechenden Substraten variiert. Im Experiment überstieg der Anteil der nichtcellulosomalen substratspezifischen Enzyme das der cellulosomalen um den Faktor 4. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass das Cellulosom permanent vorhanden ist, um eine wichtige Rolle beim Substratabbau zu spielen, während nichtcellulosomale Proteine in *C. cellulovorans* eher spezifisch produziert werden, um einen effizienten Abbau von unterschiedlichsten Biomassen zu ermöglichen (Matsui et al., 2013).

Eine Abhängigkeit der Expression der Cellulasegene vom verfügbaren Substrat wurde in *C. cellulovorans* auch schon an anderer Stelle beobachtet. Es wurde gezeigt, dass beim Wachstum auf Pektin, Cellulose und Xylan eine Vielzahl der hydrolytischen Gene stark transkribiert wurden, wohingegen beim Wachstum auf Glucose, Mannose, Galactose, Lactose, Saccharose und Maltose, keine Expression beobachtet werden konnte. Wurde Fructose oder Cellobiose als C-Quelle verwendet, konnte ein mittleres Expressionsniveau beobachtet werden. Auch wurden einige Gene (darunter die das Cellulasegen *engE*) unter fast allen Kulturbedingungen transkribiert. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus in Abhängigkeit vom vorhandenen Substrat unterstützen die Hypothese, dass die Expression einiger Cellulasen und Hemicellulasen in *C. cellulovorans* unter der Kontrolle eines katabolitrepressionsartigen Mechanismus stehen (Han et al., 2003).

#### 2.3.4 Überblick über bereits bekannte Mechanismen zur Anregung der cellulolytischen Aktivität im anaeroben Milieu

Zur Analyse der Induzierbarkeit der cellulolytischen Aktivität anaerober Mikroorganismen wurden schon länger Untersuchungen mit verschiedenen C-Quellen durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass das Substrat einen Einfluss auf das Expressionsniveau der Gene *cex* und *cenA* in *Cellulomonas firmi* hat. Bei Wachstum auf Carboxymethylcellulose wurde in diesem fakultativ anaeroben Bodenbakterium mRNA des *cex*-Gens detektiert, welche beim Wachstum auf Glycerol oder Glucose nicht zu beobachten war. Ebenso konnte eine höhere Konzentration der *cenA* Transkripte bei Carboxymethylcellulose als Substrat als bei Glycerol oder Glucose nachgewiesen werden. Somit wird die Transkription der beiden Gene, welche für Glucanasen kodieren durch Carboxymethylcellulose induziert (Greenberg et al., 1987). Zu diesen Ergebnissen passend konnte anderswo gezeigt werden, dass die PFase (filterpaperase) Aktivität von zellfreiem Überstand aus *Cellulomonas biazotea* von der Kohlenstoffquelle beeinflusst wird. Beim Wachstum auf cellulosehaltigen Substraten wurde bei  $\alpha$ -Cellulose die höchste und beim Wachstum auf *Leptochloa fusca*, einem braunen Dünngas, die zweithöchste Aktivität gemessen (Rajoka und Malik, 1997). Im Unterschied dazu wurde bei den celluloseabbauenden Pansenbakterien *Ruminococcus albus* und *Ruminococcus flavefaciens*, nachgewiesen, dass Cellulasen konstitutiv produziert werden und zwar sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Wachstumsphase. Darüber hinaus erfolgte der Abbau von Cellulose und löslichen Kohlenhydraten gleichzeitig, was ebenfalls auf die konstitutive Expression von Cellulasen schließen lässt (Hiltner und Dehority, 1983). Wie bei anderen anaeroben celluloseabbauenden Mikroorganismen, scheinen die Cellulasen von *Ruminococcus* an die Zellwand gebunden zu sein, da zellfreie Extrakte eine geringere cellulolytische Aktivität aufweisen (Stack und Hungate, 1984).

In einem weiteren Pansenbakterium *Bacteroides succinogenes* treten die Cellulasen ebenfalls zellwandgebunden in Form eines Multienzymkomplexes auf und wie auch bei *Clostridien* ist eine Bindung dessen an Cellulose zu beobachten (Ponpium et al., 2000). Anders als bei *Clostridien* und ähnlich zu *Ruminococcus* erfolgt die Cellulaseproduktion in *B. succinogenes* konstitutiv und wird nicht durch Glucose oder Cellobiose reprimiert (Hiltner und Dehority, 1983).

Ähnlich zu *Bacteroides* und *Clostridien* wurde auch bei *Acetovibrio species* ein extracelluläres Cellulasesystem zum Abbau von kristalliner Cellulose detektiert (MacKenzie und Bilous, 1982).



Verglichen mit *C. thermocellum* ist der cellulolytische Multienzymkomplex des anaeroben aus Faulschlamm isolierten *Acetovibrio cellulolyticus* vermutlich sogar komplexer aufgebaut, da im Genom doppelt so viele Proteine mit Cohesin- und Dockerindomänen vorhanden sind (Dassa et al., 2012). Die Regulation der Cellulaseexpression in *A. cellulolyticus* scheint sowohl durch Induktion, als auch Repression reguliert zu werden, da beim Wachstum auf den löslichen Substraten Cellobiose und Salicin eine Endoglucanaseproduktion festgestellt werden konnte. Die Expression der Exoglucanaseproduktion, gemessen als Avicel-Abbaugeschwindigkeit, hingegen war beim Wachstum auf Avicel höher als beim Wachstum auf Glucose oder Cellobiose. Ein bemerkenswerter Effekt ist zu beobachten, wenn beim Verwenden von Cellulose als C-Quelle zusätzlich Cellobiose oder Glucose hinzugefügt werden. Dann erfolgt bei Cellobiose eine Erhöhung der Endoglucanase-Aktivität, während die Endoglucanase-Aktivität bei Zugabe von Glucose reduziert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass Glucose einen regulatorischen Einfluss hat, obwohl diese von *A. cellulolyticus* als Substrat genutzt werden kann (Saddler et al., 1980).

Eine frühe Arbeit zur Induktion der cellulolytischen Aktivität befasst sich mit *C. thermocellum*, in welcher ein Effekt beim Wechsel des Mediums auf eine nicht bevorzugte Kohlenstoffquelle postuliert wurde. In dieser Arbeit wird von einer Erhöhung der Cellulasekonzentration berichtet, wenn ein angepasstes Innokulum von *C. thermocellum* auf ein Medium mit Fructose oder Sorbitol überimpft wird, wobei allerdings wie bei allen oben zusammengefassten Effekten keine Aussage über den Wirkungsmechanismus getroffen wurde (Johnson, 1983). Die bereits postulierten Mechanismen zur Regulation in *Clostridien* basieren einerseits auf CCR- carbon catabolite repression und TCS- two component system (Abschnitt 2.3.1) und könnten durch Glucose aktiviert werden (Xu et al., 2013) oder nutzen die Signalübertragung durch  $\sigma$ -Faktoren, welche durch das Binden eines passenden Polysaccharids an das CBM gesteuert werden. In der Literatur findet sich hier der Hinweis auf eine mögliche Steigerung der cellulolytischen Aktivität durch das Binden von Xylan (Nataf et al., 2010). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass an Cellulose bindende Polysaccharid-Sensor-CBM eine planare Oberfläche aufweisen, welche groß genug ist, um Verbindungen aus 3 oder 6 Glucoseringen aufzunehmen (Yaniv et al., 2014) (Abschnitt 2.3.2). Verknüpft mit der Beobachtung, dass die typische Schnittlänge der Exoglucanase des *C. thermocellum* 4 Glucoseeinheiten beträgt (Mayer et al., 1987) und bereits experimentell nachgewiesen werden konnte, dass beim Wachstum auf Cellulose hauptsächlich C4 bis C6-Einheiten als Zwischenprodukte produziert werden (Zhang und Lynd, 2005), kommen auch Oligosaccharide mit einer Länge von 3 bis 6 Zuckereinheiten als möglicher Elicitor in Betracht.

## 2.4 Die Modellierung des Substratabbaus

Modelle sind simplifizierte Abbilder realer Vorgänge, welche diese in Form einer verkürzten Abbildung darstellen und meist nur unter bestimmten Einschränkungen wiedergeben können (Stachowiak, 1973). In den Naturwissenschaften werden oft ausgehend von Beobachtungen und Versuchsergebnissen Modelle zur Untersuchung von Phänomenen erstellt, um dann durch Vereinfachung und Reduzierung ein fokussiertes Bild zu erhalten, welches den Blick auf das Wesentliche lenkt. Dadurch wird eine Erklärung möglich.

### 2.4.1 Das *Anaerobe Digestion Model 1* (ADM1)

So wurden auch zur Beschreibung des komplexen Vorgangs der Biogasproduktion eine Vielzahl an Modellen erstellt, welche aber meist sehr unterschiedlicher Natur und oft nur für einen sehr spezifischen Zweck angepasst waren. Folglich konnten diese nur in einem beschränkten Umfang eingesetzt werden und ein Vergleich der Ergebnisse war ebenfalls nicht ohne weiteres möglich. Ein einheitlicher Modellstandard wurde mit dem *Anaerobe Digestion Model 1* (ADM1), welches sich auch auf bereits bestehende Modelle stützt, geschaffen (Batstone et al., 2002). Die Autoren versprechen durch die zur Verfügung gestellte einheitliche Plattform Vorteile bei:

1. der Anwendung im großtechnischen Anlagenbau
2. der Entwicklungsarbeit und Prozessoptimierung zur gezielten Anwendung in großtechnischen Prozessen und deren direkter Implementierung
3. kommenden Entwicklungs- und Validierungsschritten durch das Aufbauen auf einer gemeinsamen Basis
4. Technologietransfers von der Forschung zur Industrie

Das ADM1 basiert dabei auf 2 unterschiedlichen Reaktionstypen: Biochemischen Reaktionen, welche durch intra- oder extrazelluläre Enzyme katalysiert werden und mit verfügbarem, biologischem Material ablaufen. Dazu zählen beispielsweise Hydrolysereaktionen des Substrats. Der 2. Reaktionstyp, der im ADM1 abgebildet wird, sind physikalisch-chemische Reaktionen, diese sind nicht biologisch katalysiert und umfassen physikalische Vorgänge wie Assoziation/Dissoziation und Gas/Flüssig Transfer. Für den Substratabbau sind, bis auf wenige Ausnahmen wie pH-Wert, vor allem die biochemischen Reaktionen von Bedeutung.

Von allen Biogasproduktionsschritten werden Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese als biochemische intrazelluläre Reaktionen behandelt und nur die Hydrolyse wird als extrazelluläre Zerfallsreaktion behandelt. Eine Besonderheit stellt der Desintegrationsschritt, also das Zerfallen und Dispergieren des Substrats dar. Dieser Schritt wird als teilweise nicht biologisch behandelt, da beispielsweise der Zerfall durch Scherkräfte eine Rolle spielt. Die Desintegration stellt die Vorstufe zur Hydrolyse dar und setzt sich aus einer Summe von Prozessen (Lyse, nicht-enzymatischer Zerfall, Phasentrennung...) zusammen. Das ist besonders bei komplexen Substraten wie Klärschlamm von Bedeutung.

Den Übergang von den extrazellulären zu den intrazellulären Reaktionen bildet die Substrataufnahme, welche im ADM1 der Monod-Kinetik folgt. Ebenfalls Teil der Substrataufnahme ist das Biomassewachstum, während für das Biomasseabsterben eine Reaktion 1. Ordnung angewendet wird.

Im ADM1 stehen 3 Inhibierungsmechanismen zu Verfügung. Die wohl wichtigste Inhibierung stellt die Inhibierung durch zu hohe und zu niedrige pH-Werte dar. Hier sind zur Modellierung 2 empirische Gleichungen enthalten, wobei eine sowohl den Einfluss von hohen, als auch niedrigen pH-Werten abbilden kann, die zweite Gleichung allerdings spezifisch nur für zu niedrige pH-Werte gilt. Andere Inhibierungen, wie beispielsweise Wasserstoff/freies Ammonium und gesamt Ammonium Inhibierung werden als nichtkompetitive Hemmung dargestellt.

Die physikalisch-chemischen Prozesse sind für den Substratabbau nur von untergeordneter Bedeutung, trotzdem sind sie für das Abbilden des Gesamtprozesses aufgrund der berechneten flüssig/flüssig Reaktionen (Assoziation/Dissoziation), gas/flüssig Transfers und fest/flüssig Transfers sehr wichtig. Diese Reaktionen finden Eingang in die Berechnung von pH-Wert, freien Säuren und Gaslöslichkeiten. Die größte Bedeutung haben physikalisch-chemische Prozesse bei der Berechnung der gelösten Karbonate und der damit verbundenen CO<sub>2</sub>-Löslichkeit. Auch der pH-Wert hat eine große Bedeutung, da dieser neben der Inhibierung auch beim Betrieb von Biogasanlagen, sofern mit starken Säuren oder Basen geregelt, eine hohe wirtschaftliche Bedeutung hat. Präzipitation wird hingegen im ADM1 nicht abgebildet.

Für die vorliegende Arbeit ist ein komplexes Modell, wie das ADM1 nicht geeignet, da neben der Hydrolysereaktion, eine Vielzahl der abgebildeten Reaktionen nicht für das Modellieren der Cellulosehydrolyse relevant sind. Diese Hydrolysereaktion ist als Reaktion erster Ordnung (Gleichung [1]) implementiert, da diese nach Batstone et al. (2002) ausreichend ist, wobei in der Literatur auch andere Ansätze Anwendung finden.

### 2.4.2 Reaktionskinetik 1. Ordnung

Im ADM1 Modell und auch ansonsten wird weithin angenommen, dass die Hydrolyse den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt (Batstone et al., 2002), allerdings wird auch oft darauf hingewiesen, dass die Hydrolyse auch der am wenigsten definierte Schritt ist (Gavala et al., 2003; Miron et al., 2000). Dabei können eine ganze Reihe von Eigenschaften, wie Löslichkeiten, Phasenübergänge, Menge und Aktivität des Inokulums oder Substrateigenschaften die Hydrolyse beeinflussen, sodass andere Modelle in Spezialfällen eine bessere Anwendung erlauben (Vavilin et al., 2008).

Im Reaktionsmechanismus 1. Ordnung wird mithilfe der Reaktionskonstante  $k$  die Geschwindigkeit der Hydrolyse, also des Substratabbaus beschrieben. In dieser Konstanten fassen sich alle Einflussfaktoren im Fermenter zusammen und somit wird eine einfache Beschreibung des komplexen und vielschichtigen Vorgangs der Hydrolyse möglich. Die Kehrseite dieser Zusammenfassung ist, dass der Einfluss wichtiger Faktoren wie Biomassekonzentration, Temperatur oder Substratqualität nicht direkt aus dem Modell entnommen werden können. Gleichung [1] beschreibt die oben beschriebene Abbaukinetik 1. Ordnung mit der Reaktionskonstanten  $[k]$  und der Substratkonzentration  $[S]$ .

$$\frac{dS}{dt} = -kS \quad \text{Gleichung [1]}$$

Dabei ist:  $k =$  Reaktionskonstante 1. Ordnung [ $d^{-1}$ ]  
 $S =$  Substratkonzentration [ $kg\ m^{-3}$ ]  
 $t =$  Zeit [ $d$ ]

Nicht immer kann dabei die Substratkonzentration direkt erfasst werden, sodass auch Ansätze existieren, bei welchen anstatt der Substratkonzentration die Produktkonzentration zum Ermitteln der Hydrolysegeschwindigkeit herangezogen wird. Ein solcher Ansatz ist in Gleichung [2] dargestellt (Vavilin et al., 2008), wo wie in Gleichung [1] die Hydrolysekonstante 1. Ordnung  $[k]$  die Abbaugeschwindigkeit des Substrats beschreibt. Allerdings wird hier die Substratkonzentration  $[S]$  über die Produktkonzentration  $[P]$  erfasst, was die Einführung eines Substrat-zu-Produkt-Konversionsfaktors  $\alpha$  notwendig macht.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha kS \quad \text{Gleichung [2]}$$

Dabei ist:  $k =$  Reaktionskonstante 1. Ordnung [ $d^{-1}$ ]  
 $S =$  Substratkonzentration [ $kg\ m^{-3}$ ]  
 $t =$  Zeit [ $d$ ]  
 $\alpha =$  Konversionsfaktor [Produkt/Substrat]

Basierend auf der produktorientierten Kinetikermittlung wurde beispielsweise schon anhand der freigesetzten Menge an Ammonium die Abbaugeschwindigkeit von Gelatine modelliert und dabei übereinstimmende Ergebnisse zur Verwendung eines komplexeren Modells ermittelt (Flotats et al.,

2006; Vavilin et al., 2008). Einen Spezialfall stellt hier die Untersuchung der Hydrolysegeschwindigkeit unter Verwendung der freigesetzten Menge an Methangas dar. Dieses ist kein Produkt der Hydrolyse, sondern wird erst nach Acidogenese und Acetogenese im Zuge der Methanogenese als Endprodukt der anaeroben Vergärung gebildet. Somit haben auch alle beteiligten Reaktionsschritte einen Einfluss auf die Bildung des Methangases. Die Vereinfachung ist zulässig, wenn die Hydrolyse im Vergleich zu den anderen Schritten den langsamsten und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Dies wird auch vom Verein Deutscher Ingenieure in der Richtlinie 4630 genutzt, da auch in dieser Richtlinie zur Vergärung organischer Stoffe die Abbaukinetik im Batchversuch, ebenfalls unter der Einschränkung einer zum Substratverbrauch proportionalen Gasbildung, über das produzierte Biogas ermittelt wird. Der verwendete mathematische Ansatz ist in Gleichung [3] (VDI-Richtlinie 4630) wiedergegeben Nm.

$$Y_{BG} = Y_{BG,max} * [1 - e^{-kt}] \quad \text{Gleichung [3]}$$

Dabei ist:	$Y_{BG} =$	Biogausausbeute [ $\text{Nm}^3 \text{t}^{-1}$ ]
	$Y_{BG,max} =$	Maximale Biogausausbeute [ $\text{Nm}^3 \text{t}^{-1}$ ]
	$k =$	Reaktionskonstante [ $\text{d}^{-1}$ ]
	$t =$	Zeit [d]

Das VDI Modell in Gleichung [3] zählt zu den produktorientierten Ansätzen, da hier die maximale Biogausausbeute  $Y_{BG,max}$  den Substrat-zu-Produkt-Konversionsfaktors  $\alpha$  und die Produktkonzentration [P] zusammenfasst.

Auch der Einfluss der Temperatur auf den Substratabbau wurde bereits untersucht, so konnte anhand von 6 ausgewählten Modellsubstraten gezeigt werden, dass der Abbaugrad im Unterschied zur Reaktionskonstante 1. Ordnung nicht von der Temperatur abhängig ist. Jedoch nahm die Abbaugeschwindigkeit mit steigender Abbaubarkeit zu, sodass vermutet wird, dass die Hydrolyse des Substrats auch von der Adsorption der hydrolytischen Enzyme an geeignete Oberflächen beeinflusst wird. Dazu passt, dass die Reaktionskonstante bei Temperaturänderung ein arrheniusartiges Verhalten mit einer Aktivierungsenergie von  $64 \text{ kJ mol}^{-1}$  zeigt (Veeken und Hamelers, 1999).

### 2.4.3 Spezialfälle der Reaktion 1. Ordnung

Die oben beschriebenen Modelle mit Reaktionskonstanten 1. Ordnung können vor allem eingesetzt werden, wenn die Bioverfügbarkeit oder abbaubarkeitsrelevante Phänomene keinen Einfluss haben, da diese im Standardmodell nicht abgebildet werden können. Die Abbaubarkeit und somit auch das Biogaspotential ist eine wichtige Eigenschaft des Rohmaterials und wird vom Anteil an abbaubaren Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen bestimmt (Angelidaki und Sanders, 2004). Wichtige Einflussfaktoren auf die Abbaubarkeit des Substrats sind speziell bei cellulosereichem Substrat der Ligningehalt und die Struktur des Lignocellulosekomplexes, während die Abbaugeschwindigkeit eher von der Enzymaktivität und den physikochemischen Eigenschaften der Cellulosemoleküle beeinflusst wird (Chandler et al., 1980; South et al., 1995).

Eine Möglichkeit, um einen unvollständigen Substratabbau in die Berechnung mit einzubeziehen, ist das Verwenden eines Korrekturfaktors, wie in Gleichung [4]:

$$\frac{dS}{dt} = -k * (S - \beta S_0) \quad \text{Gleichung [4]}$$

Dabei ist:	S =	Substratkonzentration [kg m <sup>-3</sup> ]
	S <sub>0</sub> =	Anfangssubstratkonzentration [kg m <sup>-3</sup> ]
	k =	Reaktionskonstante 1. Ordnung [d <sup>-1</sup> ]
	β=	Anteil der nicht abbaubaren Substratfraktion []

Die oben beschriebene Gleichung stellt einen Spezialfall von Gleichung [1] dar. Es handelt sich zwar ebenfalls um eine Reaktionskinetik 1. Ordnung, allerdings wird die Substratmenge durch das Anwenden des dimensionslosen Faktors β in eine abbaubare [S] und nicht abbaubare Fraktion [βS<sub>0</sub>] aufgeteilt, um somit die in den Prozessbedingungen nicht zu hydrolysierenden Substratbestandteile, wie zum Beispiel Lignin, zu berücksichtigen (Vavilin et al., 2008). Diese Funktion geht somit nicht mehr gegen 0, sondern nähert sich an die nicht abbaubare Substratkonzentration an.

Ein weiterer wichtiger Faktor neben der Substratbeschaffenheit, ist die Aktivität der am Abbau beteiligten Biomasse. Deren Ursprung und Anpassung an das Substrat bestimmt maßgeblich die Geschwindigkeit der Hydrolyse (Gavala et al., 1999). So entscheidet sich bereits bei der Auswahl des Inokulums, ob die für den Substratabbau notwendigen Mikroorganismen mit dem erforderlichen Enzymapparat überhaupt vorhanden sind. Deshalb wird auch für anaerobe Gärversuche nach der VDI Richtlinie 4630 unbehandelter Faulschlamm als bevorzugtes Inokulum empfohlen, da dieser mit einer Vielzahl von Substanzen in Kontakt kommt und somit auch eine breit gefächerte Biozönose enthält (VDI-Richtlinie 4630). Auch eine ausreichende Anpassung an die gewählten Prozessbedingungen, wie zum Beispiel an das Substrat, unterstützt die vorzeitige Expression der erforderlichen Enzyme und vermindert längere lag-Phasen zu Beginn des Experiments. Neben der Anpassung an das Substrat ist in vielen Fällen auch eine Anpassung an die Fermentationstemperatur erforderlich, sodass ein Temperaturschock zu Beginn des Experiments vermieden wird.

Der Einfluss der Biomasse und deren Aktivität wird in einem Ansatz wie in Gleichung [5] dargestellt (Vavilin et al., 2008):

$$\frac{dS}{dt} = -\hat{k} * X^n (S - \beta S_0) \quad \text{Gleichung [5]}$$

Dabei ist:	S =	Substratkonzentration [kg m <sup>-3</sup> ]
	S <sub>0</sub> =	Anfangssubstratkonzentration [kg m <sup>-3</sup> ]
	ĥ =	Reaktionskonstante 1. Ordnung [d <sup>-1</sup> ]
	β=	Anteil der nicht abbaubaren Substratfraktion []
	X=	Biomassekonzentration [kg kg <sup>-1</sup> ]
	n=	Potenzfaktor []

Dieser Ansatz basiert im Wesentlichen auf Gleichung [4], wurde aber um den Wert der Biomassekonzentration  $X$  erweitert und durch Anwenden des Potenzfaktors  $n$  kann auch die biologische Aktivität der Biomasse berücksichtigt werden.

#### 2.4.4 Michaelis-Menten Kinetik

Die Michaelis-Menten Kinetik beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen im Bezug auf die Substratkonzentration. Auch die Hydrolyse zählt zu den enzymatisch katalysierten Reaktionen, bei welchen sich je nach Ansatz:

1. Mikroorganismen an Substratpartikel anlagern, um dann hydrolytische Enzyme in die unmittelbare Umgebung zu segregieren, die dann eine meist hydrolytische Spaltung katalysieren. Die gebildeten löslichen, enzymatischen Produkte werden dann von den beteiligten Mikroorganismen aufgenommen.
2. Mikroorganismen nicht direkt an Substratpartikel anlagern, sondern hydrolytische Enzyme in die Fermenterbrühe segregieren, welche dann an unlösliche oder lösliche Substrate binden und hydrolytische Reaktionen katalysieren (Jain et al., 1992).

Die mathematische Formulierung der Hydrolyse durch Michaelis-Menten Kinetik ist für beide Ansätze gleich, und in Gleichung [6] wiedergegeben.

$$\frac{dS}{dt} = k * E * \frac{S}{K_m + S} = v_m * \frac{S}{K_m + S} \quad \text{Gleichung [6]}$$

Dabei ist:	$S =$	Substratkonzentration [ $\text{mol m}^{-3}$ ]
	$E =$	Enzymkonzentration [ $\text{mol m}^{-3}$ ]
	$v_m = kE =$	maximale Hydrolyserate [ $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ]
	$K_m =$	Michaelis Konstante [ $\text{mol m}^{-3}$ ]

Dieser Ansatz beschreibt den enzymatischen Reaktionsmechanismus nach Michaelis und Menten, in welchem das Enzym an das Substrat bindet und einen Enzym-Substrat-Komplex bildet. Dieser Komplex zerfällt in einem irreversiblen Schritt in das wieder freie Enzym und die Reaktionsprodukte, somit wird die maximale Geschwindigkeit der Reaktion erreicht, wenn die gesamte Enzymmenge an das Substrat gebunden ist. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit oder Hydrolyserate wird vereinfacht in dem Wert  $v_m$  zusammengefasst und kann nur erreicht werden, wenn die Substratkonzentration in hohem Überschuss vorliegt. Um die Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit in Form einer Sättigungsfunktion darzustellen, wird der  $K_m$  Werts verwendet. Dieser ist per Definition die Substratkonzentration, bei welcher die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Die Werte  $v_m$  und  $K_m$  sind experimentell bestimmt und können für alle Reaktionen der gleichen Form ermittelt werden (Nič et al., 2009).

Für Reaktionen der Hydrolyse von Substrat kann die Michaelis-Menten-Kinetik aufgrund der Betonung des Enzym-Substratkomplexes nur angewandt werden, wenn das gesamte Substrat für enzymatische Reaktionen zur Verfügung steht und somit vollständig gelöst vorliegt. Dies konnte bereits im Experiment mit löslicher Stärke als Substrat bestätigt werden (Goel et al., 1998).

### 2.4.5 Modell 2. Ordnung

Wie oben beschrieben, hat die Biomasse einen großen Einfluss auf den Substratabbau, so ist es naheliegend, dass mit höheren Biomasse- und somit auch Enzymkonzentrationen das verfügbare Substrat schneller hydrolysiert werden kann. Dabei ist zu beachten, dass im typischen Verlauf eines Batch-Prozesses die Biomassekonzentration nicht konstant bleibt, sondern, dass aus dem abgebauten Substrat neue Biomasse entsteht. Somit entsteht eine Reaktion der 1. Ordnung im Bezug auf den Substratabbau und ebenfalls 1. Ordnung im Bezug auf den Biomasseaufbau, sodass insgesamt die in Gleichung [7] dargestellte Reaktion 2. Ordnung entsteht.

$$\frac{dS}{dt} = k_2 SX \quad \text{Gleichung [7]}$$

Dabei ist:  $k_2$ = Reaktionskonstante 2. Ordnung [ $\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]

$S$  = Substratkonzentration [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$X$ = Biomassekonzentration [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

Die Entwickler dieses Ansatzes verbinden den Biomasseaufbau nur über einen Ausbeutekoeffizienten mit dem Substratabbau, weshalb dieses Modell als deskriptiver Ansatz anzusehen ist und nicht tiefer in den Mechanismus des Biomasseaufbaus eindringt. Auch werden hier Wechselwirkungen zwischen Biomasse und Substrat, wie beispielsweise die Anlagerung von Biomasse an die Substratoberfläche oder die Enzymexpression in Abhängigkeit vom Substrat, nicht berücksichtigt. Trotzdem lassen sich mit diesem Modell im Experiment beim Abbau von mikrokristalliner Cellulose mit *C. thermocellum* im Batchversuch bessere Ergebnisse erzielen, als mit aus der Literatur bekannten Modellen 1. Ordnung (Holwerda und Lynd, 2013).

### 2.4.6 Oberflächen bezogene und 2-Phasen Modelle

Die Oberflächenbeschaffenheit der Substrate in Biogasanlagen hat einen großen Einfluss auf deren Abbau, es sind nur die Grenzflächen, an welche sich die hydrolytischen Enzyme anlagern und letztlich die Zerfallsreaktion katalysieren können. Die einfachsten oberflächenbasierten Modelle beschreiben die Abbaugeschwindigkeit als eine Funktion der Partikelgröße. So wurde beispielsweise für die Abbaugeschwindigkeit von Stärkekörnern beobachtet, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Abbaugeschwindigkeit besteht (Sanders, 2001) und daraus die Partikelgröße als eine lineare Funktion der Zeit abgeleitet (Gleichung [8]).

$$R = R_0 - \frac{kt}{\rho} \quad \text{Gleichung [8]}$$

Dabei ist:	R =	Partikelradius [m]
	R <sub>0</sub> =	ursprünglicher Partikelradius [m]
	k =	oberflächenabhängige Reaktionskonstante [kg m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ]
	t =	Zeit [d]
	ρ =	Dichte des Substrats [kg m <sup>-3</sup> ]

Im gezeigten Modell in Gleichung [8] wird von sphärischen Partikeln ausgegangen. Jedoch kann nicht in allen Fällen von einem kugelförmigen Substrat ausgegangen werden, sodass zur besseren Anpassung flexiblere Modelle notwendig sind. Darüber hinaus ist nicht nur die Form des Substrats allein zu berücksichtigen, auch die Form der Mikroorganismen hat einen Einfluss auf die Anlagerung an das Substrat und somit auch auf die Abbaugeschwindigkeit. Ein solches Modell für die Hydrolysegeschwindigkeit ist in Gleichung [9] (Vavilin et al., 1996) dargestellt.

In diesem Modell wird die Geometrie des Substrats durch die Ordnungskonstante n berücksichtigt. Diese ist 2/3 für sphärische Partikel und 1/2 für zylindrische Partikel. Für den Fall, dass plattenförmige Partikel angenommen werden, würde mit einer Ordnungskonstanten von 0 der Ansatz auf eine Reaktionskinetik 0. Ordnung zurückfallen. Die Form der Mikroorganismen geht in Gleichung [9] in Form der Reaktionskonstante k ein. Bei dieser wird die maximale spezifische Hydrolysegeschwindigkeit  $r_m$  vom Verhältnis der Dichten des Substrats und der Biomasse sowie von den Partikeldurchmessern und der Biofilmdicke bestimmt. Es handelt sich hier um ein komplexes Modell, aber auch hier gilt wie für die anderen Modelle, welche sich auf die Partikelgröße beziehen, dass Abbaugeschwindigkeit und Partikelgröße unterschiedlich proportional sind.



$$r = kS_F^{1-n}S^n \quad \text{Gleichung [9]}$$

Mit:  $k = 6r_m \frac{\rho_x \delta}{\rho_S d_S}$  für sphärische Partikel

$k = 4r_m \frac{\rho_x \delta}{\rho_S d_S}$  für zylindrische Partikel

Dabei ist:

$k =$	Reaktionskonstante $[(\text{kg m}^{-3})^{-1} \text{d}^{-1}]$
$r_m =$	Maximale spezifische Hydrolyserate $[(\text{kg m}^{-3})^{-1} \text{d}^{-1}]$
$r =$	Hydrolyserate $[\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}]$
$S_F =$	Anfangssubstratkonzentration $[\text{kg m}^{-3}]$
$S =$	Substratkonzentration $[\text{kg m}^{-3}]$
$\rho_x =$	Dichte der Biomasse $[\text{kg m}^{-3}]$
$\rho_S =$	Dichte des Substrats $[\text{kg m}^{-3}]$
$\delta =$	Dicke des Biomassefilms auf dem Partikel [m]
$d_S =$	Partikeldurchmesser [m]
$n =$	Ordnungsgrad:
	2/3 bei sphärischen Partikeln
	1/2 bei zylindrischen Partikeln
	0 bei plattenförmigen Partikeln

Während des Substratabbaus wird dieses von den beteiligten Mikroorganismen verbraucht und dabei auch zu hydrolytischer Biomasse umgewandelt. Somit kommt es auch zu einer Zunahme der Hydrolysegeschwindigkeit, was von Modellen 1. Ordnung nicht abgebildet werden kann. Diese Zunahme der hydrolytischen Biomasse erfolgt in der ersten Phase durch Bakterien an der Oberfläche von Substratpartikeln oder Bakterien, die sich sehr nahe an diesen befinden, welche hydrolytische Enzyme segregieren und damit das Substrat in dessen Monomere zerlegen. Tochterzellen dieser Biomasse fallen von der Oberfläche in die flüssige Phase ab, um dann erneut an andere, noch unbesiedelte Substratpartikel zu binden. In diesem 2-phasigen System ist die erste Phase der direkten enzymatischen Reaktionen, bei welchen die Oberfläche der Substratpartikeln abgebaut wird, schneller als die Besiedelung von freien Substratpartikeln mit den Tochterzellen der bestehenden Biomasse. Ein solches oberflächenbasiertes Modell ist in Gleichung [10] (Vavilin et al., 1996) dargestellt.

$$\rho = \rho_m \frac{\beta X}{1 + \beta X} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Gleichung [10]}$$

Dabei ist:	$\rho =$	Hydrolyserate [ $\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$ ]
	$\rho_m =$	Maximale spezifische Hydrolyserate [ $\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$ ]
	$\beta =$	Gleichgewichtskonstante [ $\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$ ]
	$X =$	Konzentration an hydrolytischer Biomasse [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
	$S =$	Konzentration an abbaubarem Substrat [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
	$K_S =$	Halbsättigungskonstante [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

Die in Gleichung [10] abgebildete Formel beschreibt die Hydrolyserate in Abhängigkeit von der besiedelten Oberfläche. Die Gleichgewichtskonstante  $\beta$  zeigt wie in der Langmuir-Isothermen das Verhältnis zwischen Adsorption und Desorption der hydrolytischen Biomasse  $X$  an und wird benutzt, um den Besiedelungsgrad des Substrats anzuzeigen. Daneben wird die Halbsättigungskonstante  $K_S$  wie in der Michaelis-Menten Kinetik benutzt, um den Einfluss der Substratkonzentration  $S$  auf die maximale Hydrolysegeschwindigkeit  $\rho_m$  zu berechnen.

Eine weitere bekannte Funktion um das Wachstum von Mikroorganismen in Abhängigkeit von deren aktueller Konzentration und der Substratkonzentration zu ermitteln, ist die Contois-Gleichung (Gleichung [11]) (Contois, 1959). Ähnlich zur Monod-Gleichung wurde auch diese empirisch und ohne mechanistisches Modell entwickelt. In der Erweiterung zur Monod-Gleichung ist hier nicht nur die Substratkonzentration  $S$  ausschlaggebend, sondern auch die Biomassekonzentration  $X$  wird berücksichtigt, um die Wachstumsrate  $\mu$  mit Hilfe eines Koeffizienten  $K_C$  von der maximalen Wachstumsrate  $\mu_m$  abzuleiten. Obwohl eigentlich für lösliche Substrate entwickelt, findet diese weitgehend Anwendung für Systeme mit unlöslichen Substraten und bietet Vorteile, wenn in Suspension befindliche Zellen im Vergleich zu am Substrat angelagerten Zellen verminderten Zugang zum Substrat haben. Ist das unlösliche Substrat im Überschuss vorhanden, reduziert sich dieses Modell zum Monod-Ansatz (Wang und Li, 2014).

Die Contois-Gleichung ist ähnlich zu Gleichung [10] und zeigt im Experiment in adaptierter Form für den Substratabbau vergleichbar gute Ergebnisse, auch wenn ein Term zum Beschreiben der Absorption und Desorption nicht enthalten ist (Vavilin et al., 1996).

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_C X + S} \quad \text{Gleichung [11]}$$

Dabei ist:	$\mu =$	Wachstumsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
	$\mu_{max} =$	Maximale spezifische Wachstumsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
	$X =$	Biomassekonzentration [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
	$S =$	Substratkonzentration [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
	$K_C =$	Wachstumskoeffizient [ ]

## 2.5 Quantifizierung der cellulolytischen Leitspezies

### 2.5.1 Grundlagen der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Für den Nachweis von einzelnen Mikroorganismenspezies sowie deren Quantifizierung aus einer bestehenden Biozönose hat sich in den letzten Jahren die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction – qPCR) als Standardmethode durchgesetzt (Bandelj et al., 2013; Singh et al., 2014; Tang et al., 2015). Bei der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Weiterentwicklung der von Kary Banks Mullis entwickelten Methode der Polymerase-Kettenreaktion, für welche der Entdecker 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Saiki et al., 1985).

In der ursprünglich von Mullis entwickelten Methode wird die DNA durch Erhitzung zu Einzelsträngen denaturiert, um in einer anschließenden Phase spezifische ca. 20 bp lange DNA-Fragmente, sogenannte Primer, an die Einzelstränge anlagern zu können. An die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Abschnitte kann dann eine thermostabile DNA-Polymerase binden, welche in einem darauffolgenden Schritt dann den einzelsträngigen DNA Strang mit einem komplementären Strang ergänzt, sodass wieder eine vollständige doppelsträngige DNA-Helix entsteht. Durch Wiederholung des oben beschriebenen Prozesses und geschicktes Primerdesign, können so nahezu beliebig viele Kopien eines DNA-Abschnittes erzeugt werden, welche dann für molekularbiologische oder diagnostische Zwecke verwendbar sind (Mullis et al., 1994).

Ein Nachteil der konventionellen PCR besteht darin, dass hier nur eine Endpunktkontrolle möglich ist. So werden die PCR-Produkte üblicherweise nach der Amplifikation durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert. Hier werden diese im elektrischen Feld in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und durch Vergleich mit einem Standard kann auf die Zielbande geschlossen werden. Nach erfolgtem Ausschneiden aus dem Gel und der entsprechenden Aufreinigung kann mit Hilfe einer Quantifizierungsmethode wie einer photometrischen Messung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes auf die produzierte DNA-Menge geschlossen werden. Diese Information alleine gibt allerdings keine Auskunft über die Anfangskonzentration eines Gens in einem PCR-Ansatz.

Um das herauszufinden, ist eine genauere Methode, die quantitative PCR (qPCR), notwendig. Bei dieser Methode wird es durch die zusätzliche Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich, die

Zunahme der DNA-Konzentration nach jedem Amplifikationszyklus der PCR zu ermitteln. Somit kann die Veränderung der DNA Menge in Echtzeit verfolgt werden, sodass die quantitative PCR auch als real-time PCR bezeichnet wird. Diese Bezeichnung ist wegen der Abkürzung RT-PCR irreführend, da diese leicht mit der reversen Transkriptase PCR, bei welcher die Genexpression auf RNA Ebene untersucht wird, verwechselt werden kann. Zu den bei der qPCR verwendeten interkalierenden Fluoreszenz Reportern zählt vor allem das SYBR-Green 1, welches in Abbildung 8 dargestellt ist. Dieses SYBR-Green 1 bildet mit doppelsträngiger, aber nicht mit einzelsträngiger DNA einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, welcher nach erfolgter Anregung bei einer Wellenlänge von 521 nm grünes Licht emittiert. Somit

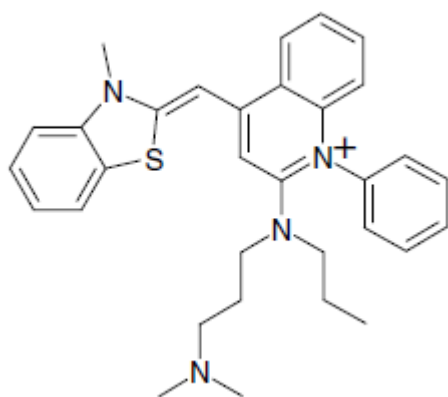


Abbildung 8: Strukturformel von SYBR-green  
Das abgebildete SYBR-green ist ein interkalierender DNA-Farbstoff zum Nachweis von doppelsträngiger DNA (Kubista et al., 2006)

kann durch Fluoreszenzmessungen zwischen den einzelnen Amplifikationszyklen gezielt anhand der Zunahme der Fluoreszenz auf die Zunahme der doppelsträngigen DNA geschlossen werden (Holzapfel und Wickert, 2007; Saunders und Lee, 2013).

Ein typischer Ablauf eines qPCR Laufes ist in Abbildung 9 wiedergegeben. Zu Beginn im Schritt 1 wird die template DNA durch einen längeren Erhitzungsschritt bei 95 °C denaturiert. Werden Hot-Start Polymerasen verwendet, werden diese auch im Zuge dieser längeren Erhitzung aktiviert. Im Anschluss folgt nach einem weiteren Erhitzungsschritt 2 der wichtigste Schritt 3, bei welchem die DNA vervielfältigt wird. Eine Besonderheit der qPCR ist das Fehlen eines eigenen Elongations-Schrittes, bei welchem wie oben beschrieben die DNA-Polymerase an die doppelsträngigen DNA-Primer Komplexe bindet und anschließend wieder zu einer doppelsträngigen DNA ergänzt. Dieser ist bei der qPCR nicht erforderlich, da in der Regel die zu polymerisierenden DNA-Abschnitte mit maximal 200 bp Länge sehr kurz sind und somit die Polymerisation in einem Schritt mit dem Annealing, also dem Anlagern der Primer an den komplementären Genabschnitt erfolgt. Die einzige Bedingung dabei ist, dass die Primer so gewählt werden müssen, dass die Annealingtemperatur nahe beim Temperaturoptimum liegen sollte, um eine optimale Effizienz zu gewährleisten. Nach diesem kombinierten Annealing und Polymerisationsschritt, liegt das von den Primern definierte Zielgen in doppelsträngiger Form vor, sodass der Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA einen fluoreszierenden Komplex bilden und durch die am Ende vom Schritt 3 erfolgte Fluoreszenzmessung erfasst werden kann. Im Anschluss daran wird im Zuge von einer üblicherweise 40 Wiederholungen umfassenden Schleife erneut zu Schritt 2 zurückgesprungen, wodurch die doppelsträngigen PCR-Produkte erneut zu Einzelsträngen denaturiert und durch den ebenfalls in der Schleife enthaltenen Schritt 3 weiter polymerisiert werden. Die Zunahme der doppelsträngigen DNA-Konzentration wird durch die ebenfalls wiederholten Fluoreszenzmessungen verfolgt.

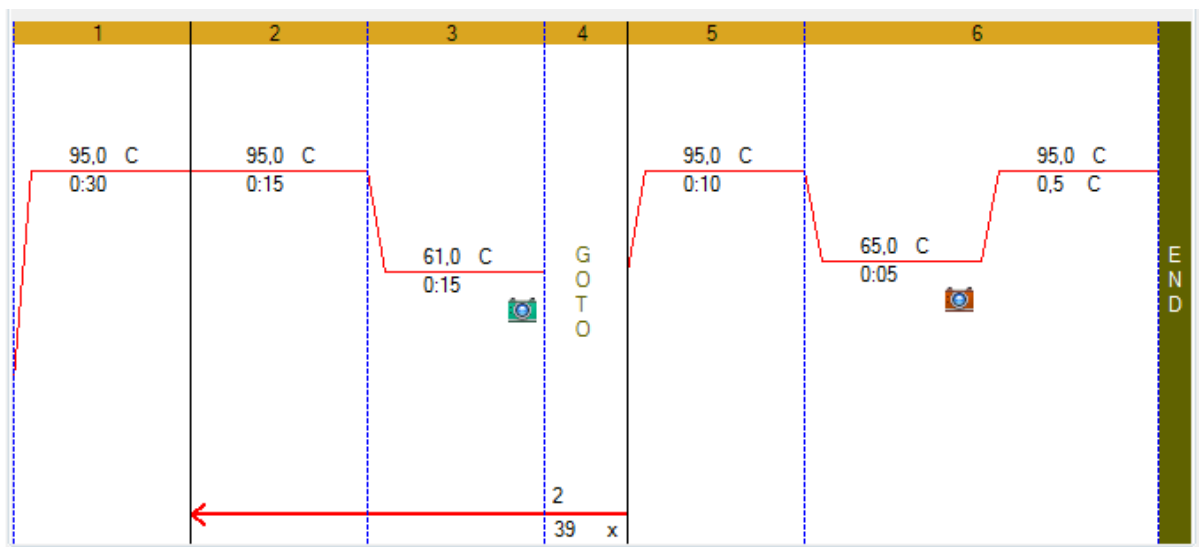


Abbildung 9: Schema eines qPCR-Laufes erstellt mit der CFX Manager™ Software (Bio-Rad, USA) Version 3.1.1517.0823. Gezeigt ist ein schrittweiser Ablauf eines qPCR-Laufes mit 40 Zyklen und der Aufnahme einer Heizkurve am Ende.

Nach dem letzten Annealing/Polymerisationsschritt erfolgt im Abschnitt 5 des Ablaufschemas in Abbildung 9 ein Erhitzungsschritt, in welchem die doppelsträngigen DNA Moleküle nochmals denaturiert werden, um abschließend eine Schmelzkurve aufnehmen zu können. Dabei wird ausgehend von der Starttemperatur von üblicherweise 65 °C die Temperatur schrittweise (z.B.: 0,5 °C alle 5 s) erhöht, wobei nach jedem Schritt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes gemessen wird. Zu Beginn der Schmelzkurve wird eine hohe Fluoreszenz gemessen, da die DNA bei niedrigeren Temperaturen als Doppelstrang vorliegt und somit mit dem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff, wie bereits erwähnt, einen fluoreszierenden Komplex bildet. Mit steigender Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen instabiler und diese denaturieren zu Einzelsträngen, wodurch auch die Fluoreszenz verloren geht. Somit kann von der Temperatur, an welcher das gemessene Fluoreszenzsignal am stärksten abnimmt, direkt auf den Schmelzpunkt geschlossen werden. Der Schmelzpunkt ist dabei von der Länge und der Sequenz des DNA-Fragments

abhängig, sodass idente DNA-Fragmente auch immer den gleichen Schmelzpunkt aufweisen. Aufgrund der Unspezifität des interkalierenden DNA-Farbstoffes, welcher an jede Form von doppelsträngiger DNA bindet, muss diese Schmelzpunktermittlung ein fester Bestandteil eines qPCR Laufes sein, um unspezifische Produkte, Nebenprodukte und Kontaminationen ausschließen zu können. Als zusätzliche Kontrolle der PCR-Produkt kann auch eine Analyse mittels Gelelektrophorese herangezogen werden (Filion, 2012; Kubista et al., 2006).

Neben der Schmelzpunktanalyse stehen zur Qualitätskontrolle noch zwei weitere Indikatoren zur Verfügung. Zuerst steht wie bei allen Regressionsanalysen, zu denen die qPCR zählt, der Korrelationskoeffizient eine wichtige Größe dar. Speziell bei der qPCR von Wichtigkeit ist die Amplifikationseffizienz der PCR-Reaktion, anhand welcher festgestellt werden kann, ob die Polymerisationsreaktion frei von Störungen abgelaufen ist. In diesem Fall muss sich die Anzahl der Abschnitte des Zielgens mit jedem Polymerisationszyklus verdoppeln, wird diese Zahl nicht erreicht, so ist von einem ungenügenden Reaktionssetup mit schlecht gewählten Primern, nicht optimaler Temperatur oder unpassenden Reaktionskomponenten auszugehen. Wird die DNA-Konzentration mit jedem Polymerisationsschritt mehr als verdoppelt, ist es wahrscheinlich, dass unspezifische Produkte oder Primerdimere entstehen. In beiden Fällen ist eine Verwendung des Systems für eine Quantifizierung ungeeignet, sodass die Effizienz der Polymerisationsreaktion ermittelt werden muss. Dies geschieht anhand der Steigung der Regressionsgeraden (Bio-Rad Laboratories, 2006; Kubista et al., 2006).

Eine solche Regressionsgerade ist in Abbildung 10 rechts abgebildet. Diese basiert auf den  $c_q$ -Werten einer Verdünnungsreihe von qPCR Ansätzen mit bekannter Konzentration des Zielgens. Die  $c_q$ -Werte beschreiben dabei die Anzahl an PCR-Zyklen, welche notwendig sind, damit die Fluoreszenz einen Schwellwert erreicht, welcher deutlich über der Basislinie liegt, aber noch innerhalb der exponentiellen Zunahme des Signals. Diese  $c_q$ -Werte werden dann gegen die Anfangskonzentrationen des Zielgens in der Verdünnungsreihe in logarithmischer Darstellung aufgetragen, sodass eine halblogarithmische Kalibrationsgerade entsteht.

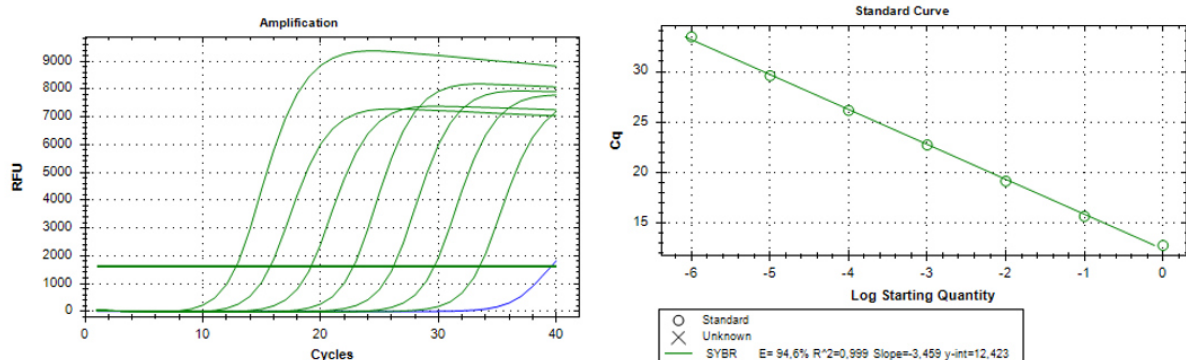


Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrationsgeraden einer qPCR. In der linken Abbildung ist die Zunahme der Fluoreszenz (in rfu = relative fluorescence units) der einzelnen Standards zur Ermittlung der  $c_q$ -Werte dargestellt. Der dazu notwendige Schwellwert wird durch die Gerade bei ca. 1800 rfu sichtbar gemacht. Die aus den  $c_q$ -Werten und den bekannten Zielgenkonzentrationen erstellte Kalibrationsgerade befindet sich in der rechten Abbildung. Diese ist durch die logarithmische Auftragung der Anfangskonzentrationen halblogarithmisch.

Die für die qPCR wichtige Effizienz kann aus der Kalibrationsgeraden abgeleitet werden. In der halblogarithmischen Darstellung entspricht eine Verzehnfachung der Anfangskonzentration aufgrund der logarithmischen Rechenregeln einer Einheit. Um diese Verzehnfachung auch in der y-Achse abzubilden, sind bei idealem PCR-Verlauf 3,32 Verdopplungen notwendig, da  $2^{3,32} \approx 10$  gilt. Folglich entspricht eine Steigung von -3,32 einer Effizienz von 100 %. Die genaue Berechnung der Effizienz erfolgt nach Ableitung aus der Geradengleichung anhand von Gleichung [12] (Bio-Rad Laboratories,

2006). Nach dieser Berechnungsmethode ergibt sich für die in Abbildung 10 gezeigte Kalibriergerade mit einer Steigung von 3,459 eine Effizienz von 1,945 also 94,5 %.

$$E = 10^{\frac{-1}{k}} \quad \text{Gleichung [12]}$$

Dabei ist: E = Effizienz der qPCR- Reaktion []  
 k = Steigung der Regressionsgeraden []

### 2.5.2 Aktuelle Anwendungsbeispiele und Stand des Wissens zur qPCR

Die qPCR gehört heute zur Standardmethode, um Expressionsniveaus von Genen und Quantifizierung von Mikroorganismen durchzuführen. Schon vor über 10 Jahren waren eine Vielzahl von Publikationen dazu verfügbar, jedoch fehlte ein einheitlicher Standard, wie qPCR-Experimente durchgeführt werden. Zusätzlich waren die erforderlichen experimentellen Details in den Publikationen nicht immer enthalten, was die Möglichkeit einer kritischen Beurteilung der Ergebnisse durch den Leser stark einschränkt. Ein wichtiger Beitrag wurde 2009 geleistet, als Bustin et al. (2009) die „MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ formulierte. Durch dieses Werk steht nun ein Leitfaden für die Publikation von qPCR Ergebnissen zur Verfügung, welcher bessere experimentelle Praxis fördert und eine zuverlässigere und eindeutige Interpretation der qPCR-Ergebnisse ermöglicht. Jedoch bedauern die Autoren wiederholt, dass, obwohl im Jahr 2014 die MIQE – Leitlinien bereits über 3000 mal zitiert wurden, immer noch zu viele Publikationen keinen Bezug darauf nehmen und daher möglicherweise falsche Ergebnisse und Schlussfolgerungen publizieren. Dies ist besonders bei Reverse-Transkriptase qPCR Experimenten von Bedeutung (Bustin, 2014; Bustin und Nolan, 2017).

Es sind bereits einige Arbeiten verfügbar, welche sich mit der Quantifizierung von Mikroorganismen aus komplexen Biozönosen befassen, als Standardmethode findet auch hier die qPCR Einsatz. So wurde beispielsweise gezeigt, wie sich die Futterzusammensetzung von Wasserbüffeln auf die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Pansen auswirkt. Dazu wurde die metagenomische DNA aus dem Panseninhalt extrahiert und mittels qPCR die Konzentration des Zielgens auf der 16s rDNA der zu quantifizierten fibrolytischen und nicht fibrolytischen Bakterien ermittelt. Für die Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden Plasmide aus dem Vektor *PTZ57T/R* und spezifischen 16s rDNA Abschnitten erstellt und die Ergebnisse in Gen-Kopien/ml Rumenfluid präsentiert (Singh et al., 2014). Ein ähnlicher Zugang wird bei der Quantifizierung von *C. thermocellum* in Lignocellulose verwendet. Auch hier wird mit einer Plasmidverdünnungsreihe die Kopienzahl des Zielgens aus metagenomischer DNA bestimmt, wobei als Zielgen nicht ein spezifischer 16s rDNA Abschnitt sondern das zum Cellulosom gehörende *cipA*-Gen dient (Tang et al., 2015).

Ein Kritikpunkt bei den oben beschriebenen Arbeiten ist das Heranziehen der Zielgen – Kopienzahl als Indikator für die Biomassekonzentration. Dies ist meist eine vage Angelegenheit, da dabei die Extraktionseffizienz der genomischen DNA eine große Rolle spielt und diese meist nicht bekannt ist. Durch Verwenden von Biomasseverdünnungsreihen als Kalibrationsstandards kann dies umgangen werden, da so, unter der Voraussetzung reproduzierbarer DNA-Extraktion, ein direkter Bezug zwischen Biomasse und qPCR-Signal hergestellt wird (Junicke et al., 2014).

Diesem Beispiel folgend wurde zur Quantifizierung von *Clostridium difficile* in Rinderexkrementen mittels qPCR zum Erstellen der Kalibrationsgeraden eine Verdünnungsreihe aus Stuhlproben mit bekannter *C. difficile* Konzentration verwendet. Die genaue Zellzahl einer Reinkultur wurde dafür

durch Zählung in einer Neubauerkammer ermittelt und anschließend entsprechende Verdünnungen in *C. difficile* negativen Stuhlproben eingebracht, sodass durch die gleichartige Probenmatrix bei Standards und Analysenprobe das Problem der ungleichen Extraktionseffizienz umgangen werden konnte. Als Zielgen wurde die 16s rDNA verwendet, welche in Standards und Analysenprobe aus der metagenomischen DNA quantifiziert wurde (Bandelj et al., 2013).

Eine andere Methode, um den Fehler durch die Extraktionseffizienz auszugleichen, wurde von Junicke et al. (2014) angewandt. Diese verwendeten zur absoluten Quantifizierung von *Methanospirillum hungatei* und *Desulfovibrio sp.* aus einer methanogenen Cokultur Verdünnungsreihen der Reinkulturen, zu welchen vor dem Zellaufschluss zur DNA-Extraktion DNA aus *Heringsperma* zugegeben wurde. Diese DNA erfüllte eine ausgleichende Funktion bei der Elution der genomischen DNA von der Filtermembran, welche im Zuge der Extraktion mit dem verwendeten Kit „UltraClean microbial DNA isolation kit“ (Mo Bio, Carlsbad, USA) zum Einsatz kommt. Durch die zusätzliche DNA konnte die Elutionseffizienz verbessert und die Qualität der Kalibrationsgeraden erhöht werden. Die Quantifizierung erfolgte auf Basis der ermittelten 16s rDNA Konzentrationen in Proben und Standards.

### 3 Zielsetzung

Die moderne Bioenergie zählt zu den wichtigsten Sektoren der erneuerbaren Energie überhaupt. Dabei stellt die Nutzung von Bioenergie zur Stromerzeugung und auch zur Nutzung als alternativer Kraftstoff im Transportsektor, einen großen Wachstumsmarkt dar. In diesen beiden Anwendungsgebieten kommt auch Cellulose als Substrat für die Biogasproduktion zum Einsatz und leistet somit einen wichtigen Beitrag zum Übergang zu einem weniger kohlenstoffintensiven nachhaltigerem Energiesystem. Aufgrund der weltweiten Anwendungsmöglichkeit und dem Anteil im globalen Energiemix erzielen selbst kleine Verbesserungen bei Ausbeute, Produktivität oder Effizienz eine enorme Wirkung und können so zu großen ökonomischen und ökologischen Einsparungen führen. Aus diesem Grund bestand die Motivation dieser Arbeit darin, einen kleinen Beitrag zur Verbesserung der Biogastechnologie von Cellulose zu leisten und damit bei der Dekarbonisierung unseres Energiesystems mitzuhelfen.

Für schwer abbaubare Substrate wie Cellulose in nachwachsenden Rohstoffen stellt die Hydrolyse des Ausgangsmaterials den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die dafür verantwortliche Eigenschaft ist Zusammenlagerung der einzelnen Cellulosemoleküle zu einer kristallinen Form, welche eine hohe Stabilität aufweist. Ein weiterer Effekt dieser kristallinen Form ist, dass eine sehr kompakte Struktur entsteht, welche nur schwer angreifbar ist. Deshalb wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, für nachfolgende Fermentationen das Substrat zerkleinern, die Oberfläche vergrößern und die Zugänglichkeit zu den Cellulosefasern verbessern.

Allerdings findet sich auch in der Domäne der Bakterien cellulolytische Aktivität, mit welcher kristalline Cellulose anaerob abgebaut werden kann. Hier zeigen vor allem Clostridien ein großes Potential. Es wurde bereits in früheren Arbeiten versucht dieses Potential zu nutzen und die cellulolytische Aktivität gezielt zu steigern. Dabei wurde einerseits festgestellt, dass die für den Celluloseabbau erforderlichen Cellulasen konstitutiv exprimiert werden, andererseits wurde in einzelnen Publikationen von einer Steigerung der cellulolytischen Aktivität in Anwesenheit von bestimmten Kohlenhydraten berichtet.

Ziel dieser Arbeit war es, diese bereits publizierten Elicitoren, aber auch neue Induktionsmöglichkeiten der cellulolytischen Aktivität von in Biogasanlagen vorkommenden Clostridien unter reproduzierbaren Bedingungen und in einer vollständig funktionsfähigen anaeroben biogasproduzierenden Biozönose zu testen. Dazu war folgendes Vorgehen geplant:

- Um reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten, sollte eine kontinuierliche Cellulosemonofermentation mit synthetischem Medium angestrebt werden.
- Eine kontinuierliche Fermentation mit synthetischem Medium wurde nach Kenntnis des Autors noch nie zuvor realisiert. Folglich war die Entwicklung eines entsprechenden Mediums und der Beweis auf die Eignung für langfristige realitätsnahe Biogasproduktion beabsichtigt.
- Mit oben beschriebenem System sollte die Wirksamkeit der Elicitoren anhand von Veränderungen der Hydrolysegeschwindigkeit von Cellulose gezeigt werden.
- Bei Elicitoren mit nachweisbar positivem Einfluss auf die Cellulosehydrolyse wurde durch chemische Modifikation ein reduzierter biologischer Abbau angestrebt, um so die Verweilzeit im Reaktor zu verlängern.
- Im Zuge dessen sollte auch eine eventuelle Anpassung der für den Celluloseabbau verantwortlichen Clostridien an die Kultivierung im synthetischen Medium als auch an die unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Elicitoren untersucht werden. Dazu war geplant, nach aktuellem Standard die metagenomische DNA zu extrahieren, um die Biomassekonzentration der cellulolytischen Leitspezies, durch Vergleich der Anzahl speziesspezifischer Gene mit bekannten Standards, zu ermitteln.



## 4 Material

### 4.1 Geräte

<b>Laborutensilien</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav: Varioklav 135S	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Bioreaktoren BTP3	Umwelt- und Ingenieurtechnik GmbH, Dresden, Deutschland
mit MilliGascounter	Ritter Apparatebau, Bochum, Deutschland
mit Schlauchquetschpumpen REGLO ICC	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
mit Gassammelbehälter Säcken 12 l	Restek, Bad Hornburg, Deutschland
Multi-Layer Foil	
<u>Brütschränke</u>	
Klimaschrank KBF 240 E5.1/C	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank Function Line B12	Thermo Scientific, Haeraeus , Waltham, MA, USA
Inkubationsraum 37 °C	Albert GmbH, Rain, Deutschland
<u>Chromatographische Trennsysteme</u>	
Gaschromatographen Clarus 580 Spezifikation Arnel 4016	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Säule1: 7'HayeSep N60/80, 1/8"	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
sulfiniert 150°C	
Säule2: 9' Molecular Sieve 375 °C	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
gasdichte Spritze 25 ml	Hamilton Company, Reno, Nevada, US
HPLC-System	Dionex®, Sunnyvale, CA, USA
mit Brechungsindex Detektor RI 101	Shodex, Tokyo, Japan
mit PDA-Detektor	Dionex®, Sunnyvale, CA, USA
mit Rezex ROA-H+ Säule	Phenomenex®, Torrance CA, USA
Elementaranalysator EuroEA 3000	HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland
<u>Gefriertruhen/Schränke</u>	
Freezer -20 °C	Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland
Freezer -80 °C Forma 906 -86°C ULT	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gefriertrocknung Alpha 2-4 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
mit Vakuumpumpe RC 6	VACUUBRAND GmbH + Co. KG, Wertheim am Main, Deutschland

Gelelektrophorese

Netzteil PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Agarose Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Geldokumentation Gel iX Imager Intas	Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizschrank Function Line T12	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kolbenprober 100ml	Poulten&Graf, Wertheim am Main, Deutschland
mit gasdichter Schlauch RAUCLAIR-E	REHAU, Rehau, Deutschland
mit Baysilon mittelviskos	Kurt Obermeier GmbH, Bad-Berleburg, Deutschland
Kugelmühle MM400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland

Magnetrührer

MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
VMS-C7	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Variomag Telesystem	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Metalblock Thermostat	VLM, Bielefeld, Deutschland
Labormuffelofen LM-312.27	Linn High Therm GmbH, Eschenfelden, Deutschland

PCR-Cycler

MJ Mini™ Personal Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
CFX96 Touch	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Multiplate™ 48-Well PCR Plates white	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
0,2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA

pH-Meter mit Elektroden:

FiveGo™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
FiveEasy™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
InLab® Expert Pro pH 0-14, 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
InLab® Micro Pro pH 0-14, 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Reinstwassersystem PURELAB Classic	ELGA LabWater, High Wycombe, Großbritannien
Serumflaschen 100 ml	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA

mit Bördelkappen ROTILABO® butyl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Büchi Rotavapor R-210	BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Mit Büchi Membranpumpe V-700	BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Mit Büchi Vakuumcontroller V-850	BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Spritzenvorsatzfilter 0,2-µm PVDF	Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Transferpette® S: 10 -10000 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim am Main, Deutschland

### Waagen

Analysenwaage AW320	AS Wägetechnik GmbH, Garching, Deutschland
Pioneer™ Ohaus	Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
TE6101	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
TE1502S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

### UV-VIS Spektrometer

Epoch 2	Winooski, VT, USA
Multiskan Spectrum®	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
NanoPhotometer® P330	IMPLEN, München, Deutschland
NOVA 60 A Spectroquant®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mit Spectroquant®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammonium-Küvettestest	
Varioskan®	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Vortex-Schüttler, Disruptor Genie® digital Bohemia, NY, USA

### Zentrifugen

Sorvall RC 6+	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Rotor F9-4x1000y	Piramoontechnologies Inc, Santa Clara, USA
Rotor SH-3000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

## 4.2 Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermoc Scientific, Waltham, MA, USA
DNeasy® PowerSoil® Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
pJET1.2/blunt	Thermoc Scientific, Waltham, MA, USA

## 4.3 Stämme

Stamm	Quelle
<i>C. cellulolyticum</i>	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>C. cellulovorans</i>	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>C. thermocellum</i>	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
NEB® Turbo Competent E. coli	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Heringssperma (D-7290)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 4.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller
<i>Glucose Oxidase</i> aus <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Peroxidase</i> aus Meerrettich	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA

## 4.5 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-log ladder	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
AE-Puffer	<u>20 mM Na-Acetat</u> : Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland <u>1 mM EDTA</u> : Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose SERVA Wide Range	Serva, Heidelberg, Germany
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA

Primer	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
Phusion® HF Buffer	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Stain Clear G	Serva, Heidelberg, Deutschland
TAE-Puffer	<u>40 mM Tris Base</u> : Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland <u>1 mM EDTA</u> : Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland <u>0,5 mM Acetat</u> : Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 4.6 Medien

Alle hitzestabilen Medien, bzw. deren Bestandteile wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121 °C autoklaviert. War eine Hitzesterilisation nicht möglich, so erfolgte eine Sterilfiltration (0,2 µm PTFE Filter, steril).

Die im Folgenden zusammengefassten verwendeten Nährmedien sind mit der Endkonzentration im fertigen Medium angegeben. Die Lieferanten sind in den Tabellen nur in verkürzter Form angegeben und sind: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), Megazyme (Wicklow, Irland), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

### 4.6.1 Celluloseauswahl

Der wichtigste Punkt in den verwendeten Medien stellt die verwendete Cellulose dar. Diese sollte möglichst stabil gegen mikrobiellen Abbau sein, um Veränderungen der Abbaugeschwindigkeit besser sichtbar zu machen. Darüber hinaus wurde noch Langzeitstabilität im Medium vorausgesetzt, um durch Vorbereitung des Mediums mit Cellulose eine effiziente Arbeitsweise anwenden zu können. Die letzte Anforderung, die an die verwendete Cellulose gestellt wurde, waren günstige rheologische Eigenschaften in der Suspension, damit die Celluloselösung reproduzierbar durch Pumpenförderung in die Fermenter eingebracht werden konnte.

Die Langzeitstabilität im Medium wurde durch Inkubation der Cellulosen mit MJ-Medium (Abschnitt 4.6.3) bei 37 °C überprüft. Dabei konnte, wie in den Chromatogrammen in Abbildung 11 wiedergegeben, bei keiner der getesteten Cellulosen:  $\alpha$ -Cellulose (Sigma-Aldrich, 6429), Cellulosepulver Avicel (Macherey Nagel, 815290.1) und mikrokristalline Cellulose (Sigma-Aldrich, 435236) lösliche Monosaccharide mittels HPLC-Analytik (Abschnitt 5.5.3) nachgewiesen werden. Das bedeutete, dass diese sich im Medium nicht zersetzen. Da jedoch die getestete  $\alpha$ -Cellulose amorphe und somit leichter mikrobiologisch abbaubare Bestandteile enthält, und die mikrokristalline Cellulose zu Verblockungen im Schlauchsystem der Feedpumpen führte, wurde das Cellulosepulver Avicel als Substrat in den Medien verwendet.

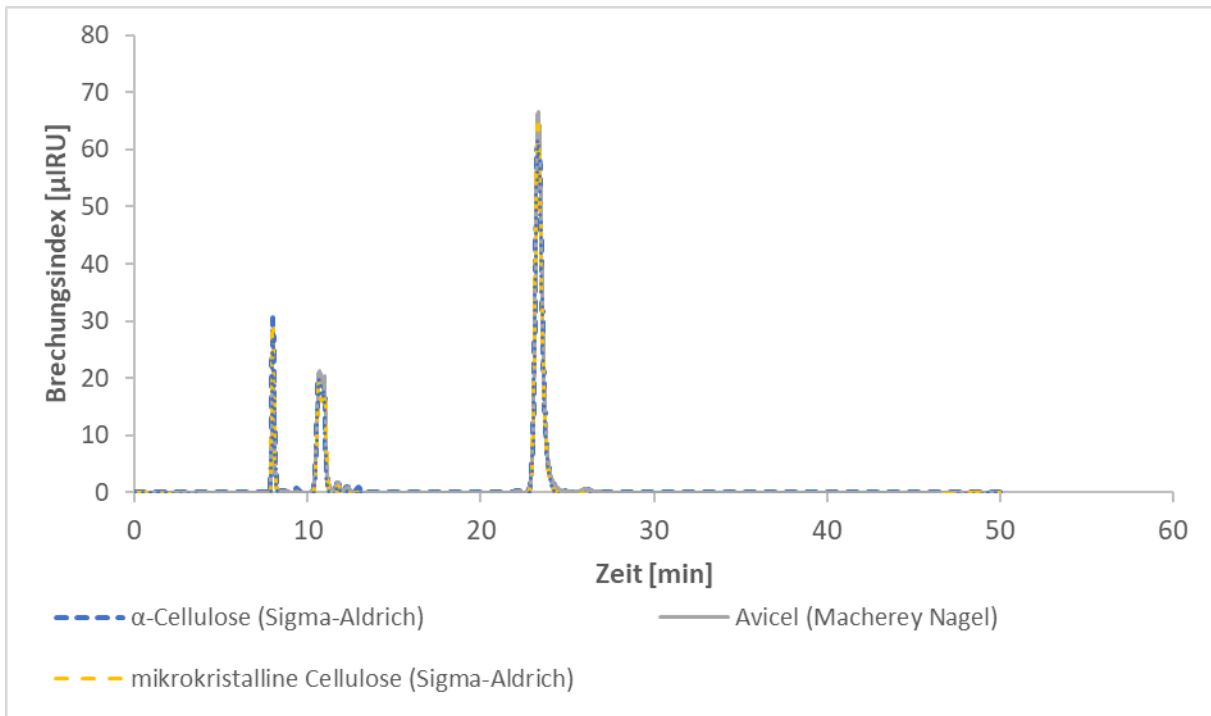


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der getesteten Substrate  $\alpha$ -Cellulose (Sigma-Aldrich, 6429), Cellulosepulver Avicel (Macherey Nagel, 815290.1) und mikrokristalline Cellulose (Sigma-Aldrich, 435236) nach Inkubation bei 37 °C in MJ-Medium.

#### 4.6.1.1 Methylcellulose

Für Vorversuche zur Modifikationsstrategie im Batchversuch wurde zusätzlich zu Cellulose als C-Quelle auch Methylcellulose eingesetzt. Deren Bezugsquelle war die VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland), Bestellnummer 43147.22. Eine zusätzliche Spezifikation dieser Methylcellulose war eine Viskosität von 400 cp in 2 %iger wässriger Lösung.

#### 4.6.2 L47 Medium

Tabelle 2: Zusammensetzung des L47 Mediums; einem Medium zur Bestimmung der vollständigen anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Faulschlamm (DIN EN ISO 11734:1998-11, 1998).

Komponente	Konzentration [gl <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit [%]
NH <sub>4</sub> Cl	0,53	Roth	K298.1	≥ 99,7 %
Resazurin	0,001	Sigma-Aldrich	199303	Dye content: 75%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27	Roth	3904.1	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,44	Roth	P030.1	≥ 99 %
FeCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,02	Applichem	A3584.0250	≥ 99 %
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,20	VWR	1058861000	≥ 99,5 %
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,15	Roth	5239.1	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	0,10	Sigma-Aldrich	208043-5g	≥ 95 %
Cellulose	5,00	VWR	MANA815290.5	≥ 95 %

## 4.6.3 MJ-Medium

Tabelle 3: Zusammensetzung des MJ Mediums; einem Medium zur Anzucht von Clostridien; angepasst (Johnson et al., 1981).

\* Zugabe des Spurenelementstocks erfolgte nur beim Medium MJ+Spurenelemente

Komponente	Konzentration [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit [%]
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,90	Roth	3904.1	≥ 99 %
Resazurin	0,002	Sigma-Aldrich	199303	Dye content: 75%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50	Roth	3904.1	≥ 99 %
Harnstoff	2,10	VWR	8187105000	≥ 99 %
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	10,00	Roth	6979.4	≥ 99,5 %
NaCitrat*2H <sub>2</sub> O	3,00	VWR	27830294	≥ 99 %
RPMI 1640 Vitamin Lösung	20,00 ml	Sigma-Aldrich	R7256	
L-Methionin	0,07	Roth	1702.2	≥ 99 %
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,00	VWR	1058861000	≥ 99,5 %
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,00134	VWR	SIAL31236-100G	≥ 99,5 %
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,15	Roth	5239.1	≥ 99 %
L-Cystein*H <sub>2</sub> O	0,77	Roth	1694.2	≥ 99 %
Spurenelementlsg aus M141*	1 %	Siehe Tabelle 7		
Cellulose	5,00	VWR	MANA815290.5	≥ 95 %

## 4.6.4 141 Methanogenium Medium (M141)

Tabelle 4: Zusammensetzung des 141 Methanogenium Mediums, einem Medium empfohlen zur Anzucht von methanogenen Mikroorganismen (DSMZ, 2015).

Komponente	Konzentration [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit [%]
KCl	0,34	Roth	6781.1	≥ 99,5 %
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	4,00	Roth	2189.1	≥ 99%
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3,45	VWR	1.05886.1000	≥ 99,5 %
NH <sub>4</sub> Cl	0,25	Roth	K298.1	≥ 99,7 %
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,14	Roth	5239.1	≥ 99 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,14	Roth	3904.1	≥ 99 %
NaCl	18,00	Roth	P029.3	≥ 99 %
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,002	Roth	P728.1	≥ 99 %
Na-Acetat	1,00	Roth	X891.1	≥ 98,5 %
Resazurin	0,001	Sigma-Aldrich	199303	Dye content: 75%
L-Cystein	0,345	Roth	1694.2	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	0,50	Sigma-Aldrich	208043-5g	≥ 95 %
Cellulose	5,00	VWR	MANA815290.5	≥ 95 %
Trypton/Pepton aus Casein	4,00	Roth	8952.5	

## 4.6.5 Synthetisches Fermentermedium

Tabelle 5: Zusammensetzung des in dieser Arbeit zur kontinuierlichen Biogasproduktion entwickelten synthetischen Fermentermediums

Komponente	Konzentration [gl <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit
KCl	0,28	Roth	6781.1	≥ 99,5 %
NH <sub>4</sub> Cl	9,00	Roth	K298.1	≥ 99,7 %
NaCl	9,00	Roth	P029.3	≥ 99 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,26	Roth	P749.3	≥ 99 %
Harnstoff	1,75	VWR	8187105000	≥ 99 %
Natriumcitrat*2H <sub>2</sub> O	1,00	VWR	27830294	≥ 99 %
Resazurin	0,002	Sigma-Aldrich	199303	Dye content: 75%
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,42	VWR	1058861000	≥ 99,5 %
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,77	Roth	5239.1	≥ 99 %
41,75 gl <sup>-1</sup> Stammlösung von Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	2,78 ml	Roth	P728.1	≥ 99 %
	in 0,19 M EDTA	Roth	8040.2	≥ 99 %
Cellulose	83,33	VWR	MANA815290.5	≥ 95 %
mod. Spurenelementlösung (DSMZ, 2015)	83 ml	Zusammensetzung in Tabelle 6		
mod. Vitaminlösung (DSMZ, 2015)	16,5 ml	Zusammensetzung in Tabelle 7		

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Vitaminlösung; Adaption aus der Vitaminlösung des 141 Methanogenium Mediums (DSMZ, 2015)

Komponente	Konzentration [mg l <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit
Biotin	20	Roth	3822.2	≥ 98,5 %
Pyridoxamin 2 HCl	200	VWR	J62679.27	≥ 95 %
Thiamin HCl	5	Roth	T911.2	≥ 98,5 %
Riboflavin	5	VWR	A11764.14	≥ 98 %
Nicotinamid	5	VWR	ALFAA15970.22	≥ 99 %
D-Pantothensäure hemicalciumsalz	5	VWR	SAFS21210-5G-F	≥ 98 %
Vitamin B12	20	Roth	T915.1	≥ 96 %
4-Aminobenzoessäure	40	VWR	A12673.18	≥ 98 %
(±)-α-Liponsäure	5	VWR	SAFST5625-500MG	≥ 99 %
Choline chlorid	300	VWR	SAFSC7527-100G	≥ 98 %
Folsäure	100	VWR	1039840005	≥ 97 %
myo-Inositol	3500	Sigma-Aldrich	I5125-50G	≥ 99 %



Tabelle 7: Zusammensetzung der Spurenelementlösung; Adaption aus der Spurenelementlösung des 141 Methanogenium Mediums (DSMZ, 2015)

Komponente	Konzentration [g <sup>-1</sup> ]	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit
Nitritotriessigsäure	1,50	VWR	SIAL72560-100G	≥ 99,0 %
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3,00	VWR	1.05886.1000	≥ 99,5 %
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,50	Merck	1.059.410.250	≥ 98%
NaCl	1,00	Roth	P029.3	≥ 99 %
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,10	VWR	SIAL31236-100G	≥ 99,5 %
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,15	VWR	ALFAA16346.0B	≥ 98%
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,10	Roth	5239.1	≥ 99 %
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,18	Merck	1.088.831.000	≥ 99,5 %
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,01	Fluka	61245	≥ 99,0 %
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> *18H <sub>2</sub> O	0,03	Sigma-Aldrich	101.102	≥ 99,0 %
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01	Sigma-Aldrich	B7901	≥ 99,5 %
Na <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,01	Sigma-Aldrich	M1651	≥ 99,5%
NiCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,40	Merck	106.727	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,06	Sigma-Aldrich	214485	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,06	Sigma-Aldrich	223336	≥ 99 %

#### 4.6.6 520 Ruminoclostridium cellulolyticum Medium (CM3)

Tabelle 8: Zusammensetzung des 520 Ruminoclostridium cellulolyticum (CM3) Mediums, welches zur Kultivierung von C. cellulolyticum und C. cellulovorans empfohlen ist (DSMZ, 2015)

Komponente	Konzentration [g <sup>-1</sup> ]	Bezug	Bestellnummer	Reinheit
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,30	VWR	A1032.5000	≥ 99,5 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50	Roth	3904.1	≥ 99 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,21	Roth	P749.3	≥ 99 %
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O Lösung (0,1% w/v in 0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1,25 ml	Sigma	F8633-250G	≥ 99 %
Hefeextrakt	2,0	Roth	2363.4	
Resazurin	0,002	Sigma-Aldrich	199303	Dye content: 75%
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,20	VWR	1058861000	≥ 99,5 %
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,0075	Roth	5239.1	≥ 99 %
L-Cystein-HCl*H <sub>2</sub> O	0,50	Roth	1694.2	≥ 99 %
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,50	Roth	8563.1	≥ 99 %
Cellulose	5,00	Sigma	22150-250G	≥ 99 %
mod. Spurenelementlösung (DSMZ, 2015)	1 ml	Zusammensetzung in Tabelle 7		

## 4.6.7 LB-Agarplatten mit Ampicillin

Tabelle 9: Zusammensetzung von LB-Agar mit Ampicillin

Komponente	Konzentration	Lieferant	Artikelnummer	Reinheit
Trypton/Pepton aus Casein	10 g l <sup>-1</sup>	Roth	8952.5	
Hefeextrakt	5 g l <sup>-1</sup>	Roth	2363.4	
NaCl	10 g l <sup>-1</sup>	Roth	P029.3	≥ 99 %
Agar-Agar	15 g l <sup>-1</sup>	Roth	5210.2	
Ampicillin	100 µg ml <sup>-1</sup>	Roth	K029.2	≥ 99%
pH-Wert	7,0			

## 4.6.8 LB-Medium mit Ampicillin

Tabelle 10: Zusammensetzung des LB-Mediums mit Ampicillin

Komponente	Konzentration	Lieferant	Artikelnummer	Reinheit
Trypton/Pepton aus Casein	10 g l <sup>-1</sup>	Roth	8952.5	
Hefeextrakt	5 g l <sup>-1</sup>	Roth	2363.4	
NaCl	10 g l <sup>-1</sup>	Roth	P029.3	≥ 99 %
Ampicillin	100 µg ml <sup>-1</sup>	Roth	K029.2	≥ 99%
pH-Wert	7,0			

## 4.6.9 SOC-Medium

Tabelle 11: Zusammensetzung des SOC-Mediums

Komponente	Konzentration	Lieferant	Artikelnummer	Reinheit
Trypton/Pepton aus Casein	20 g l <sup>-1</sup>	Roth	8952.5	
Hefeextrakt	5 g l <sup>-1</sup>	Roth	2363.4	
NaCl	0,5 g l <sup>-1</sup>	Roth	P029.3	≥ 99 %
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	10 mM	VWR	1.05886.1000	≥ 99,5 %
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	10 mM	Roth	2189.1	≥ 99%
KCl	2,5 mM	Roth	6781.1	≥ 99,5 %
Glucosemonohydrat	22 mM	Roth	6887.5	für Mikrobiologie

Zugabe von MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl und Glucose aus sterilem Stock nach autoklavieren.

#### 4.7 Software und Datenbanken

<b>Software / Datenbank</b>	<b>Hersteller</b>
Blast	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, US
CFX Manager Software Version: 3.1.1517.0823	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Chromeleon	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, WA, US
Primer3 web version 4.00	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, US
SnapGene	GSL Biotech LLC, San Diego, CA, US
TestPrime 1.0 Tools des SILVA rRNA database project	Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, Deutschland
Totalchrom	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

#### 4.8 Primer

Die verwendeten Primer wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Überblick über die verwendeten Primer, designt wie in Abschnitt 5.8.2 beschrieben

Primer	Sequenz 5'>3'	Annealing/ Elongation	Konzentration	Beschreibung	Referenz
<i>C.cel for</i>	GGAGCAATTCGGTGACA GAT	60 °C / 30 s	200 nM	Selektiv für <i>C. cellulolyticum</i> 16s rDNA; für qPCR	diese Arbeit
<i>C.cel rev</i>	GCCGATCAACCTCTCAGT TC				
<i>C.vor for</i>	GAGGTGACAGGAAGAC AGGT	60 °C / 60 s	400 nM	Selektiv für <i>C. cellulovorans</i> 16s rDNA; für qPCR	diese Arbeit
<i>C.vor rev</i>	CAATAAGGGTTGCGCTC GTTG				
<i>C.th for</i>	TTTACCGGAAGTATATCCTA G	60 °C / 30 s	400 nM	Selektiv für <i>C. thermocellum</i> 16s rDNA; für qPCR	(Köllmeie r, 2014)
<i>C.th rev</i>	TTTGATAACAGGACGATGC C				
<i>Eub338</i>	ACTCCTACGGGAGGCAG	60 °C / 30 s u. 60 s	100 nM	Selektiv für <i>Bacteria</i> 16S rDNA, für qPCR	(Fierer et al., 2005)
<i>Eub518</i>	ATTACCGCGGCTGCTGG				
<i>Ccel_prod_gibbson for</i>	CTCACTATAGGGAGAGG A GCAATTCGGTGACAGAT GG	60 °C / 20 s 72 °C / 90 s	500 nM	Generierung von Überhängen am qPCR Produkt <i>C.cel</i> für Gibbson Assembly	diese Arbeit
<i>Ccel_prod_gibbson rev</i>	GAATAAAAGAAGAACGC C GATCAACCTCTCAGTTCC G CTAC				
<i>Ext-Cvor_I_fwd</i>	CGACTCACTATAGGGAG AGCGGCCGCCAGATCTT CCGGATGGCTCGAGTTT TTCAGCAAGATGAGGTG ACAGGAAGACAGGT	60 °C/20 s 72 °C/30 s	500 nM	Generierung von Überhängen am qPCR Produkt <i>C.vor</i> zur Sequenzierung	diese Arbeit
<i>Ext-Cvor_I_rev</i>	AAGAACATCGATTTTCCA TGGCAGCTGAGAATATT GTAGGAGATCTTCTAGA AAGATCAATAAGGGTTG CGCTCGTTG				
<i>pJet gibbson for</i>	GAGAGGTTGATCGGCCT TCTTCTTTTATTCTCTCAA GATT	60 °C / 20 s 72 °C / 90 s	500 nM	Generierung von Überhängen am <i>pJet</i> Vector für Gibbson Assembly	diese Arbeit
<i>pJet gibbson rev</i>	TCACCGAATTGCTCCTCT CCCTATAGTGAGTCGTAT TACGCC				
<i>pJet Gib seq fwd</i>	TGTCCAATTAGTAGCAT CACG	-	-	Sequenzierungsprim er	diese Arbeit
<i>pJet Gib seq rev</i>	ATTGCCAAGAAAACCCA CGC	-	-		

## 5 Methoden

### 5.1 Inokula

Die Inokula wurden vom Projektpartner Agraferm Technologies AG zur Verfügung gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass in den beprobten Anlagen nur zu einem geringen Teil Maissilage und zum überwiegenden Teil (ligno)cellulosehaltige Substrate eingesetzt wurden und somit die Mikroorganismen an die Verwertung von Cellulose angepasst waren. Die Anlagen befanden sich in Scharssig (Luxemburg) und Hohenwart (Deutschland). Bei der Eingangskontrolle wurden TS, oTS, Aschegehalt, pH-Wert, NH<sub>4</sub>-N und der Phosphatgehalt bestimmt.

Zur weiteren Kultivierung wurden die Inokula gasdicht aufbewahrt und die gebildete Gasmenge mit Hilfe von Milligascountern bestimmt. Die Kultivierung des Inokulums erfolgte, wie auch im Fermenter vorgesehen, bei 44°C. Die Biogasmenge wurde täglich an Werktagen kontrolliert und dabei das Inokulum, gemäß üblicher Vorgehensweise (VDI-Richtlinie 4630), durch Schütteln durchmischt. Nahm die täglich gebildete Biogasmenge zu sehr ab, wurde frisches Substrat in Form von getrockneter Grassilage mit einem Aliquot Wasser zugegeben. Das Aliquot wurde dabei so gewählt, dass der Trockenverlust der Grassilage ausgeglichen und somit die Zugabe von frischer Grassilage simuliert wurde. Diese Fütterung war in ungefähr monatlichen Abständen erforderlich und betrug < 0,2 g oTS l<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

### 5.2 Batchtest mit Kolbenprober

#### 5.2.1 Batchtests mit Kolbenprober, allgemeine Vorgehensweise

Die Batchtest mit Kolbenprobern erfolgten analog zum Hohenheimer Biogasertragstest (Helffrich und Oechsner, 2003). Dazu wurde auf den Kapillaransatz eines Kolbenprobers 100ml (Poulten&Graf, Wertheim, Deutschland) ein Stück gasdichter Schlauch RAUCLAIR-E (REHAU, Rehau, Deutschland) aufgesetzt und mit einer Schlauchklemme verschlossen. Vor der Verwendung wurde der dazugehörige Kolben mit Gleitfett (Baysilon) versehen. Zum Versuchsstart wurden 100 mg Cellulose und ggf. Additive in einen Kolbenprober (100ml) vorgelegt und mit 20 ml des entsprechenden Inokulums (Tabelle 13) ergänzt. Aus dem befüllten Kolbenprober wurden mit dem Kolben vorhandene Luftblasen herausgedrückt und anschließend verschlossen. Pro Ansatz wurde immer eine Dreifachbestimmung angesetzt und zum Vergleich Blindwerte ohne Cellulose mitbestimmt. Die Bebrütung der Kolbenprober erfolgte bei 44°C bis die tägliche Gasbildung stagnierte, wobei die Kolbenprober abweichend zum Hohenheimer Biogasertragstest zur Durchmischung statt in einen motorbetriebenen Rotor bewegt zu werden, an Werktagen manuell aufgeschüttelt wurden. Dabei wurde die Gasbildung kontrolliert.

Tabelle 13: Überblick über die Batchversuche im Kolbenprober. Aufgeführt sind alle Batch-Versuche im Kolbenprober mit dem verwendeten Inokulum und einem eventuell verwendetem Verdünnungsmedium sowie Additiven.

Versuch	Inokulum	Verdünnungsmedium	Additiv
Medienentwicklung Überimpfung Vorkultur	Inokula (Abschnitt 5.1) nach Abtrennung größerer Bestandteile mittels Sieb (Maschenweite = 1 mm)	1:10 verdünnt mit den Medien: L47, MJ und M141	ohne
Medienentwicklung Überimpfung1	Gärrest aus Batch 1 Medienentwicklung	1:10 verdünnt mit den Medien: L47, MJ und M141	ohne
Medienentwicklung Überimpfung2 bis 4	Gärrest aus vorhergehendem Batch der Medienentwicklung	1:5 verdünnt mit den Medien: L47, MJ, M141 und MJ+Spurenelemente	ohne
Vorversuche mit Methylcellulose	Fermenterbrühe mit Elicitoren	3:1 verdünnt mit Fermentermedium	Methylcellulose; 0,01 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> und 1,0 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
Vorversuche mit chlorierter Cellobiose	Fermenterbrühe mit Elicitoren	3:1 verdünnt mit Fermentermedium	chlorierte Cellobiose; 0,08 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> und 0,5 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
Vorversuche mit chlorierten Cellooligosacchariden (Chlorgehalt = 12,12 %)	Fermenterbrühe ohne Elicitoren	unverdünnt	Chlorierte Cellooligosaccharide: 0,2 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ; 1,0 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ; 5,0 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ; 25 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> und 50 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ;
Vorversuche mit chlorierten Cellooligosacchariden (Chlorgehalt = 7,25 %)	Fermenterbrühe ohne Elicitoren	unverdünnt	Chlorierte Cellooligosaccharide: 5,0 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> und 50 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
Celluloseabbaukinetik Fermenterbrühe	Fermenterbrühe ohne Elicitoren	5:1 verdünnt mit Fermentermedium	ohne
Celluloseabbaukinetik Inokula	Inokula (Abschnitt 5.1) nach Abtrennung größerer Bestandteile mittels Sieb (Maschenweite = 1 mm)	unverdünnt	Ohne

**Anmerkung:** Die Bezeichnung „Fermenterbrühe mit und ohne Elicitoren“, bezieht sich auf den Status der Fermenter, aus welchen das Inokulum entnommen wurde. Also ob zu diesem Zeitpunkt Elicitortests durchgeführt wurden. Bei allen Versuchen wurde der mögliche Einfluss eventuell vorhandener Elicitoren durch Berücksichtigung eines Blindwerts ausgeschlossen.

### 5.2.2 Batchtests mit Kolbenprober zur Medienentwicklung des synthetischen Mediums

Einen eigenen Ablauf hatten die Vorversuche zur Evaluierung des synthetischen Fermentermediums. Hier wurden die nach einem ersten Batchversuch mit den ausgegorenen Inokula aus Abschnitt 5.1 für den darauffolgenden Batch 1/10 des Gärrests vom Vorversuch als Inokulum verwendet. Bei den darauffolgenden Überimpfungen wurde dann jeweils 1/5 verwendet (siehe auch Tabelle 13) und mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Es wurden insgesamt 5 wiederholte Batchansätze für je 20 Tage durchgeführt.

Für diese Vorversuche wurden 3 verschiedene Medien getestet. Das erste Medium, als L47 bezeichnet, stammt aus der Analyse der Wasserbeschaffenheit (DIN EN ISO 11734:1998-11, 1998) und ist das simpelste der zu testenden Medien. Darüber hinaus wurde das MJ-Medium getestet, welches in der Literatur zur Anzucht von Clostridien verwendet wird (Johnson et al., 1981). Da jedoch für die Biogasbildung nicht nur cellulolytische Clostridien, sondern auch methanbildende Mikroorganismen notwendig sind, wurde auch das M141 Medium verwendet, welches sich speziell für die Kultivierung von Methanogenen eignet (DSMZ, 2015). Ab der 2. Überimpfung wurde zusätzlich noch eine weitere Variante des MJ Mediums verwendet, zu welcher 1 % Spurenelementlösung (Tabelle 7) zugegeben wurde.

Zur Herstellung der Medien wurden beim L47 Medium  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  und  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  und beim MJ-Medium zusätzlich noch  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  als getrennter Stock autoklaviert (121 °C, 20 min) und erst danach mit dem ebenfalls sterilisierten (121 °C, 20 min) Grundmedium vereint. Die getrennte Sterilisation war erforderlich, um ein Ausfällen der Calcium-, Eisen- und Magnesiumsalze zu verhindern. Am Tag der Verwendung wurden alle Medien, um Sauerstofffreiheit sicherzustellen im Wasserbad auf 75 °C erhitzt und für 20 min mit Argon begast. Erst anschließend wurden die reduzierenden Bestandteile (L-Cystein und  $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) ebenfalls als Stocklösung zugegeben.

### 5.3 Fermenterbetrieb

Zur Fermentation wurden 3 gasdichte Bioreaktoren BTP3 (Umwelt- und Ingenieurtechnik GmbH, Dresden, Germany) mit einem Arbeitsvolumen von 2 l, ausgerüstet mit der Datenerfassungs- und Steuerbaugruppe SENSOControl (Umwelt- und Ingenieurtechnik GmbH, Dresden, Deutschland) verwendet. Durch diese Datenerfassungsgruppe wurden die Fermenter- sowie, Gastemperatur, Gasfluss, Rührergeschwindigkeit, Pumpenvolumen und der pH-Wert in einem Intervall von 15 min aufgezeichnet. Die Temperatur wurde durch die im System vorhandenen elektrischen Heizdecken auf 44 °C eingestellt, die Rührergeschwindigkeit auf 60 rpm geregelt und die produzierte Menge an Biogas mit Hilfe von MilliGascountern (Ritter Apparatebau, Bochum, Deutschland) quantifiziert. Die Umrechnung der produzierten Gasmenge in ihr Normvolumen erfolgte nach den Vorgaben des Vereins deutscher Ingenieure (VDI-Richtlinie 4630) und die Zusammensetzung des Gases wurde nach der Sammlung in Gassäcken batchweise in einem Gaschromatographen analysiert (Abschnitt 5.5.1). Der pH-Wert wurde durch täglich durch manuelle Zugabe von 10 M NaOH auf einen Wert von 7,2 eingestellt und die organischen Säuren wurden mittels HPLC quantifiziert (Abschnitt 5.5.3).

Zu Beginn der Fermentation wurde aus einer Mischung der beiden Inokula (1 Teil Gärrest der Anlage in Hohenwart und 3 Teile der Anlage in Schrässig) mit dem synthetischen Fermentermedium auf das 4-fache Volumen ergänzt und nach Abtrennen der Faserbestandteile durch ein Sieb mit der Maschenweite 1 mm in den Fermenter überführt. Das synthetische Fermentermedium stellte die einzige Substratquelle über die gesamte Laufzeit dar und dessen finale Zusammensetzung ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Dieses Medium wurde über eine Pumpe (REGLO ICC, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) über 2 unabhängige Kanäle zugegeben, wobei der erste Kanal dazu verwendet wurde, um die löslichen Bestandteile des Mediums ( $1,68 \text{ g l}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $54,00 \text{ g l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $54,00 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $10,5 \text{ g l}^{-1} \text{ Harnstoff}$ ,  $6,00 \text{ g l}^{-1} \text{ Natriumcitrat} \cdot 2H_2O$ ,  $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Resazurin}$ ,  $498 \text{ ml l}^{-1} \text{ modifizierte Spurenelementlösung DMSZ 141}$  (DSMZ, 2015) und  $16,5 \text{ ml l}^{-1} \text{ modifizierte Vitaminlösung DMSZ 141}$  (DSMZ, 2015)) zuzugeben und über den zweiten Kanal wurden die Cellulose und das Phosphat ( $6,31 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$  und  $100 \text{ g l}^{-1} \text{ Cellulose mikrokristallin AVICEL}$ ) zugefügt. Aufgrund der unlöslichen Cellulose wurde das zweite Teilmedium permanent mittels Magnetrührer bei 450 rpm gerührt um eine homogene Suspension sicherzustellen.

Die Zufuhr des Substrats erfolgte in Intervallen, welche gleichmäßig über den Tag verteilt waren und jeweils die Zugabe von je 2 ml Teilmedium 1 und 10 ml Teilmedium 2 bedeuteten. Die Intervallzahl

wurde durch die täglich zugegebene Medienmenge bestimmt, so wurden beispielsweise bei einer OLR von  $4,8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und einer HRT von 16,6 d 10 Teilmengen im Abstand von 2,4 h gepumpt. Zusätzlich zur automatischen Zugabe des Mediums wurde gleichzeitig zur täglichen pH-Korrektur ein Aliquot von  $33,3 \mu\text{l}$  Eisenstammllösung ( $41,75 \text{ g l}^{-1} \text{ Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in  $0,19 \text{ M}$  EDTA) je Pumpenintervall zugegeben. Als im Laufe des Experiments die organische Raumbelastung erhöht und die hydraulische Verweilzeit verringert wurde, wurden dazu die Pumpenintervalle verkürzt bis zu einer maximalen Zugabemenge von 30 ml Teilmedium1 und 150 ml Teilmedium 2. Bei Fermenter 3 wurde zusätzlich noch das Gesamtvolumen von 2 l auf bis zu 1,15 l reduziert, um die täglich umgesetzten Flüssigkeitsvolumen, sowie die produzierten Biogasmengen einfacher handhaben zu können.

Die Probennahme erfolgte durch ein Tauchrohr, wobei die Analysen der organischen Säuren sofort durchgeführt wurden, während Proben zur Analyse der Restsubstratkonzentration bis zur weiteren Verwendung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurden.

Die Zugabe der ausgewählten Elicitoren erfolgte jeweils 1 Woche vor der Kinetikermittlung, wobei die Fermenter durch manuelle Pulszugabe des ausgewählten Elicitors auf die gewählte Konzentration eingestellt wurden. Die Elicitoren und Konzentrationsstufen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.:

Tabelle 14: Überblick über die getesteten Elicitoren mit den eingesetzten Konzentrationen, Bezugsquellen und den eingesetzten Reinheitsgraden.

Komponente	Konzentration [ $\text{mg g}^{-1}$ Cellulose]	Bezug	Bestellnummer	Reinheit
Glucose	0,1; 1,0 und 10	SERVA	22720.02	> 99,5 %
Cellobiose	0,2	Sigma- Aldrich	22150-250G	≥ 99 %
Fructose	0,06 und 6,0	Roth	4981.2	≥ 99,5 %
Xylose	0,06 und 6,0	Roth	5537.2	≥ 99 %
Sorbitol	0,06 und 6,0	Roth	6213.2	≥ 98 %
Cellooligosaccharidmischung	0,06; 0,1; 0,6; 1,0; 6,0 und 10	diese Arbeit		Siehe 6.5.2
Cellooligosaccharidmischung mit niedrigem Chlorierungsgrad	0,01; 0,06 und 0,6	ChiroBlock® GmbH		Siehe 6.5.3
Cellooligosaccharidmischung mit hohem Chlorierungsgrad	0,01; 0,06; 0,3	ChiroBlock® GmbH		Siehe 6.5.3
Chitosan	0,06 und 6,0	Sigma- Aldrich	419419	≥ 75 %, deacetylated
Lichenan	6,0	Megazyme	P-LICHN	≥ 80 %, from Islandic moss
Xylan	0,1; 1,0 und 10	Sigma- Aldrich	X0502	≥ 90 %

Nach dem Einstellen mittels Pulszugabe wurde das Konzentrationsniveau des Elicitors durch Zudosierung über Pumpenkanal 2, gemeinsam mit der Cellulosesuspension, weiter konstant gehalten.

#### 5.4 Kultivierung von Clostridien in Reinkultur

*C. cellulolyticum*, *C. thermocellum* und *C. cellulovorans* wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  in 53 % Glycerin gelagert. Zur Kultivierung in Reinkulturen wurde ein Aliquot von 1 ml der gefrorenen Kulturen in eine mit 50 ml anoxischem 520 Ruminoclostridium cellulolyticum (CM3)



Medium befüllten und mit PTFE-Septum verschlossenen Serumflasche (100 ml) überführt und bei 37 °C kultiviert.

Der pH-Wert des Mediums wurde mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 7,2 gestellt und bereits vor der Sterilisation in die Serumflaschen (100 ml) portioniert und mit dem PTFE-Septum verschlossen. Anschließend wurde das Medium im Wasserbad auf 75 °C erhitzt und dabei durch eine Kanüle für 20 min mit Argon begast. Nach dem Begasen wurde das L-Cystein aus einem frisch hergestellten Stock zugegeben und das Medium sterilisiert (121 °C, 20 min). Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von Cellobiose, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O aus Stocklösungen unter Verwendung einer Kanüle sowie eines Sterilfilters. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 8 zusammengefasst und weicht bezüglich der verwendeten Spurenelementlösung und des verwendeten Gases zum Austreiben des Sauerstoffs von der DSMZ Vorgabe ab. Es wurde Argon anstelle von 80 % N<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> verwendet.

## 5.5 Analytische Methoden

### 5.5.1 Biogasanalyse

Das in den Fermentern produzierte Biogas wurde in Gassammelbehälter Säcken (12 l Multi-Layer Foil, Restek, Bad Hornburg, Deutschland) gesammelt und dreimal wöchentlich analysiert. Dazu wurde ein Aliquot von 25 ml Biogas mittels gasdichter Spritze (Hamilton Company, Reno, Nevada, US) in die 1 ml Probenschleife eines Clarus580 in der Spezifikation Arnel 4016 eingespritzt. Die überschüssige Probenmenge wurde verwendet, um die Probenschleife zu spülen. Als Trägergas wurde Argon mit einem Fluss von 90 ml / min eingesetzt und die verwendeten Säulen waren: 7'HayeSep N60/80, 1/8" sulfiniert 150°C und 9' Molecular Sieve 375 °C. Beide Säulen wurden während der Analyse im Säulenofen konstant auf 60°C erwärmt. Die Detektion erfolgte mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Die Messgrenzen dieses Systems mit Argon als Trägergas betragen für CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> N<sub>2</sub> sowie CH<sub>4</sub> 0,1 – 100 % und für H<sub>2</sub> 0,001- 100 %.

### 5.5.2 Trockensubstanzbestimmung und Restsubstratanalyse

In einer Dreifachbestimmung wurden je 2 ml aufgetauter Fermenterprobe in Mikroreaktionsgefäße (2 ml) eingewogen und bei 105 °C für 72 h getrocknet. Der Gewichtsverlust wurde mittels Analysenwaage AW320 (AS Wägetechnik GmbH, Garching, Deutschland) ermittelt und daraus die Trockensubstanz berechnet. Zur weiteren Analyse wurden die getrockneten Proben mit der Kugelmühle MM400 (Retsch, Haan, Deutschland) bei 30 Hz für 120 s in den Mikroreaktionsgefäßen mit einem 5 mm Zirkoniumoxidball homogenisiert.

Zur Quantifizierung des nicht verbrauchten Substrats wurden 35 mg der getrockneten und homogenisierten Fermenterprobe für 75 min mit 348 µl 72 %iger Schwefelsäure bei 30 °C inkubiert, anschließend 10 ml Reinstwasser zugegeben und bei 121 °C für 60 min in einem Metallblock Thermostat (VLM, Bielefeld, Germany) hydrolysiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Hydrolysat mit einer Vorlage von BaCO<sub>3</sub> neutralisiert und nach dem Abtrennen des Niederschlags durch Zentrifugieren (4800 g, 15 min) wurde das vorhandene Restsubstrat als Glucose mittels HPLC ermittelt. Alternativ erfolgte auch eine Analyse mit enzymatischem Assay (5.5.3).

### 5.5.3 Bestimmung der organischen Säuren und Glucose

Zur Bestimmung der organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure im Gärrest, sowie von Glucose (zur Bestimmung der Glucose für die Quantifizierung des Restsubstrates) wurde auf Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zurückgegriffen, was dem allgemeinen Standard entspricht (Liebetrau et al., 2015). Das verwendete HPLC-System (Dionex®, Sunnyvale, CA, USA) war ausgerüstet mit einem Brechungsindex Detektor (RI 101, Shodex, Tokyo, Japan) sowie einem PDA (Phenomenex®, Torrance CA, USA) Detektor. Die Auftrennung der Analyten erfolgte mittels Rezex ROA-H<sup>+</sup> Säule (Phenomenex®, Torrance CA, USA), welche im Säulenofen auf 70 °C temperiert wurde. Als mobile Phase wurde 2,5 mM Schwefelsäure mit einer Flussrate von 0,5 ml min<sup>-1</sup> verwendet. Zur

Probenvorbereitung wurden die Gärreste 1:1 mit mobiler Phase verdünnt und vorhandene Feststoffe durch Zentrifugation (21000 g, 2 min) entfernt und anschließend durch einen 0,2-µm PVDF Spritzenvorsatzfilter (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) filtriert. Zur Analyse der Glucose im Zuge der Restsubstratanalytik wurde der neutralisierte Überstand (Abschnitt 5.5.2) ebenfalls durch einen 0,2 µm PVDF Spritzenvorsatzfilter (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) filtriert.

Alternativ zur Glucosequantifizierung via HPLC wurde auch ein enzymatischer Assay verwendet. Für diesen etablierten Assay (Rühmann et al., 2015) wurde das Hydrolysat anstatt mit BaCO<sub>3</sub> mit NaOH neutralisiert und im gleichen Schritt 1:10 verdünnt. Anschließend wurden auf einer Mikrotiterplatte 50 µl des verdünnten Hydrolysats vorgelegt und mit einem Master Mix (40 mM Natriumphosphat, pH 6,0, 1,5 mM 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), 0,4 U Glucoseoxidase und 0,02 U Meerrettichperoxidase) ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm wurde die optische Dichte bei 418 nm ermittelt und nach Abzug des Hintergrundsignals bei 480 nm wurde auf Basis einer Standardverdünnungsreihe der Glucosegehalt ermittelt.

#### 5.5.4 Bestimmung der Asche und des Gehalts an organischer Trockensubstanz

Für die Aschebestimmung wurden 5 ml der aufgetauten Fermenterprobe bei 105 °C im Porzellantiegel getrocknet und anschließend bei 220 °C für 30 min und bei 550 °C für 120 min verascht (Liebetau et al., 2015). Der Gehalt an organischer Trockensubstanz (oTS) wurde anschließend berechnet.

#### 5.5.5 Phosphatbestimmung

Die Bestimmung des Phosphats wurde aus der Asche durchgeführt. Dazu wurde die eingewogene Asche in 10 ml Königswasser in Mikrowellendruckbehältern bei 1000 W und 10 bar für 43 min aufgeschlossen und feste Bestandteile anschließend abfiltriert (Herr, 2013). Das Filtrat wurde nun für eine photometrische Phosphatbestimmung verwendet, wobei als Färbereagenz Ammoniummolybdat verwendet und die Extinktion der Probelösungen sowie der Standards bei 882 nm bestimmt wurde (Murphy und Riley, 1962).

#### 5.5.6 Elementaranalytik

Die Analyse der Elemente C, H, N und S erfolgte mit dem Elementaranalysator EuroEA 3000 (HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland). Hier wurde eine Einwaage von 2 mg in Zinnkartuschen eingewogen und anschließend mit 12 ml Sauerstoff bei 1000 °C oxidativ aufgeschlossen, wobei der vollständige Aufschluss durch Verwendung eines Wolframtrioxid-Katalysators sichergestellt wurde. Im Anschluss wurde in einer Kupfergranulat Kolonne der überschüssige Sauerstoff gebunden und die entstandenen Stickoxide zu N<sub>2</sub> reduziert. Die so entstandenen Gase CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub> wurden mit Helium als Trägergas im Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert.

#### 5.5.7 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumbestimmung erfolgte mit dem Spectroquant® Ammonium-Küvettest (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dazu wurden 50 g Probe in einem 1000-ml-Messkolben mit Wasser bis zur Marke gefüllt und gut homogenisiert. Nachdem sich die festen Bestandteile abgesetzt hatten, wurden 250 ml Überstand abgenommen und mit 2,5 g Aktivkohle versetzt. Diese Suspension wurde für 10 min gerührt, über ein Faltenfilter filtriert und 1 ml Filtrat nochmals abzentrifugiert (5 min, 13000 g). Das so geklärte Filtrat wurde 1:5 verdünnt und davon 100 µl in die Küvette des Spectroquant® Ammonium-Küvettestes eingebracht. Nach guter Homogenisation und einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Phosphatgehalt am NOVA 60 A Spectroquant® (Merck, Darmstadt, Deutschland) photometrisch ermittelt.

### 5.5.8 Analyse der Celooligosaccharide und chlorierten Celooligosaccharide

Die hergestellten Celooligosaccharide wurden mit einer am Lehrstuhl etablierten Methode (Ortiz-Tena et al., 2016) mit 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatisiert und nach chromatographischer Auftrennung (Säule: Gravity C18, 100 mm Länge, 2 mm i.d., 1,8 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel, Laufmittel: 5mM Ammoniumazetat pH =5,6 mit 15% Acetonitril, 50°C) mittels ESI-MS analysiert. Die chlorierten Celooligosaccharide wurden ohne Derivatisierung analysiert.

### 5.5.9 Datenverarbeitung

Sämtliche Auswertungen und Berechnungen erfolgten mit Microsoft Office (Microsoft, Redmond, WA, US). Kalkulationen erfolgen mit Microsoft Excel und das Erstellen von Abbildungen mit Microsoft PowerPoint. Sofern in den Abbildungen nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich bei den Werten um arithmetische Mittelwerte, bei welchen die Standardabweichung berechnet nach Gleichung [13] als Fehlerindikator angegeben ist.

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Gleichung [13]}$$

Dabei ist:        x = Messwert  
                       $\bar{x}$  = arithmetischer Mittelwert  
                      n = Anzahl der Messwerte

## 5.6 Ermittlung des Celluloseabbaus

### 5.6.1 Ermittlung des Celluloseabbaus anhand der Restsubstratkonzentration

Der erste Ansatz zur Ermittlung der Celluloseabbaugeschwindigkeit basiert auf der Abnahme der Restsubstratkonzentration im Fermenter bei Unterbrechen des Fermenterfeeds. Dazu wurden 2 Versuchsreihen bei unterschiedlich hohen Raumbelastungen und Verweilzeiten durchgeführt. In der ersten Reihe, durchgeführt bei einer Raumbelastung von 2,4 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> und einer Verweilzeit von 20 d, wurde die Substratzufuhr für 49,5 h unterbrochen und in der zweiten Versuchsreihe bei einer OLR von 4,8 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> und einer HRT von 16,7 d für 26 h. Die Abnahme der Restsubstratkonzentration durch Probenahmen wurde zu Beginn und bei 2,4 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> Raumbelastung nach je 3,25 h, 6,5 h, 9,5 h, 23 h, 27 h, 33 h, 49,5 h und bei 4,8 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> Raumbelastung nach je 1,75 h, 3,75 h, 5,75 h, 7,75 h, 10 h, 23,5 h und 26 h nach Feedstop ermittelt. Die gesammelten Proben wurden bei -20 °C gelagert und die Restsubstratkonzentration wie unter Abschnitt 5.5.2 beschrieben bestimmt. Für die Berechnung wurden die in Abschnitt 5.6.2 behandelten Modelle verwendet.

### 5.6.2 Modellierung des Substratabbaus basierend auf der Substratkonzentration

Die mathematische Modellierung der Abnahme der Substrat-Konzentration erfolgt auf Basis der Massenbilanz in Gleichung [14], welche nach dem expliziten Euler-Integrationsverfahren gelöst wird (Greenspan, 2008).

$$s(t_1) = s(t_0) + \frac{ds(t_0)}{dt} \cdot (t_1 - t_0) \quad \text{Gleichung [14]}$$

Dabei ist:        s(t<sub>1</sub>) = Substratkonzentration zu Zeitpunkt 1 [g l<sup>-1</sup>]  
                      s(t<sub>0</sub>) = Substratkonzentration zu Beginn des Zeitintervalls [g l<sup>-1</sup>]  
                      t<sub>1</sub>-t<sub>0</sub> = Zeitintervall festgelegt auf 1 min [min]

Zur Beschreibung der Substratabnahme über die Zeit  $ds(t_0)/dt$  wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Einen Überblick über die unterschiedlichen Modellierungskonzepte gibt es in Tabelle 15. Während Gleichung [15] und Gleichung [16] wie auch in der Einleitung beschrieben verwendet wurden, wurde Gleichung [17] erweitert. Der Term  $x_t$ , also die Biomassekonzentration, wurde ausführlicher definiert und zwar zusammengesetzt aus  $x_0$ , was die Biomassekonzentration zu Beginn der Feedunterbrechung beschreibt und als der Term  $x_t = Y_{x/s}(s_{\text{feed}} - s_0)$ . Dieser beschreibt den Aufbau der Biomasse basierend auf der Biomasseausbeute für den Gesamtprozess und dem Substratverbrauch während der Feedunterbrechung.

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Ansätze zur Modellierung des Substratabbaus

	Modell für Feedstopp	Beschreibung
Gleichung [15]	$\frac{ds}{dt} = -k_1 s_t$	Modell 1. Ordnung (siehe auch Abschnitt 2.4.2)
Gleichung [16]	$\frac{dS}{dt} = -k_1 * (S - \beta S_0)$	Modell 1. Ordnung angepasst für unvollständigen Substratabbau (siehe auch Abschnitt 2.4.3)
Gleichung [17]	$\frac{ds}{dt} = k_2 s_t x_t = -k_2 s_t * [x_0 + Y_{x/s}(s_0 - s_t)]$	Modell 2. Ordnung (siehe auch Abschnitt 2.4.5)
Gleichung [18]	$x_t = Y_{x/s}(s_0 - s_t)$	Beschreibung des Terms $x_t$ zur Berechnung der Biomassekonzentration aus Gleichung [17]

*Dabei ist*

$k_1$	= Reaktionskonstante 1. Ordnung [ $h^{-1}$ ]
$k_2$	= Reaktionskonstante 2. Ordnung [ $l\ g^{-1}h^{-1}$ ]
$s_t$	= Substratkonzentration zum Zeitpunkt t [ $gl^{-1}$ ]
$s_0$	= Substratkonzentration zum Zeitpunkt der Feedunterbrechung [ $gl^{-1}$ ]
$x_t$	= Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t [ $gl^{-1}$ ]
$x_0$	= Biomassekonzentration zum Zeitpunkt der Feedunterbrechung [ $gl^{-1}$ ]; berechnet als organische Trockensubstanz abzüglich Substrat
$\beta$	= Anteil der nicht abbaubaren Substratfraktion
$Y_{x/s}$	= Biomasseausbeute für den Gesamtprozess = 0,08 (VDI-Richtlinie 4630)

Die Koeffizienten der Gleichungen in Tabelle 15  $k_1$ ,  $k_2$  und  $\beta$  wurden anhand der experimentell ermittelten Daten durch Anwendung der Euler'schen Methode der kleinsten Quadrate (Abdulle und Wanner, 2002) ermittelt und darauf basierend der Celluloseabbau bewertet.

### 5.6.3 Ermittlung des Celluloseabbaus anhand der Gasentwicklung

Die Modellierung, basierend auf der Biogasproduktion, erfolgte nach der bereits vorgestellten Standardmethode vom Verein Deutscher Ingenieure (VDI-Richtlinie 4630), welche in Gleichung [3] wiedergegeben wird. Für die Kinetikermittlung aus den im Abschnitt 5.2 beschriebenen Batchversuchen in Kolbenproben wurde das produzierte Normvolumen an Biogas verwendet.

Als Alternative zur Berechnung der Celluloseabbaukinetik über die Konzentration an Restsubstrat wurde der über die Datenerfassungs- und Steuerbaugruppe SENSControl aufgezeichnete

Biogasstrom verwendet. Wie auch bei der Quantifizierung über den Substratabbau erfolgt nach dieser Methode die Modellierung des beobachteten Rückgangs des Biogasvolumenstroms aus dem Reaktor bei Unterbrechen der Substratversorgung. Für die Kinetikermittlung anhand der abnehmenden Biogasproduktion während der Unterbrechung des Substratfeeds wurde, anstatt des Normvolumens, der Volumenstrom an Biogas verwendet und da dieser geringer wurde, anstatt wie das Gesamtvolumen im Batchversuch zuzunehmen, wurden die Vorzeichen angepasst. Dieser abgewandelte Berechnungsansatz ist in Gleichung [19] mathematisch wiedergegeben.

$$\dot{Y}_{BG} = \dot{Y}_{BG,max} * e^{-kt} \quad \text{Gleichung [19]}$$

Dabei ist:  $Y_{BG}$  = Biogasvolumenstrom [Nml min<sup>-1</sup>]

$Y_{BG,max}$  = Biogasvolumenstrom zu Experimentbeginn [Nml min<sup>-1</sup>]

$k$  = Reaktionskonstante [h<sup>-1</sup>]

$t$  = Zeit [h]

#### 5.6.4 Evaluierung der Modelle

Die Beurteilung der Modellqualität erfolgte anhand der Abweichung zwischen den berechneten und beobachteten Daten. Diese wurde durch die mittlere relative Abweichung (mean relative deviation - MRD) und der Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (root mean squared error - RMSE) erfasst. Eine solche Art der Fehlerbeschreibung wurde schon erfolgreich in anderen Arbeiten eingesetzt (Kablan et al., 2008; Melcher et al., 2017).

Die Berechnung des RMSE ist in Gleichung [20] wiedergegeben. Daraus ist ersichtlich, dass sich dieser als Wurzel des Mittelwerts der quadratischen Abweichungen der einzelnen Messwerte von den berechneten Werten berechnet. Eine Eigenschaft, die sich daraus ableitet, ist, dass die Einheit der Messwerte einen Einfluss auf die Fehlergröße hat, somit können die RMSE-Werte nur verglichen werden, wenn diese auf dem gleichen Datensatz basieren. Das bedeutet, dass eine Aussage, ob die Modelle zur Kinetikermittlung basierend auf den Substratkonzentrationen oder der Gasentwicklung besser geeignet sind, mit dem RSME nicht möglich ist. Eine weitere Eigenschaft des RMSE ergibt sich aus der Berechnung anhand der quadratischen Abweichung, denn durch die Quadrierung werden große Fehlerwerte stärker gewichtet. Dies macht diese Art der Fehlerberechnung empfindlich gegenüber einem zufällig auftretenden hohen Fehlerwert.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i^{pred} - y_i^{meas})^2} \quad \text{Gleichung [20]}$$

- Dabei ist:
- RMSE= Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung - root mean square error []
  - n = Anzahl der Messpunkte
  - i = Einzelmessung
  - $y_i^{pred}$  = vom Modell berechnete Restsubstratkonzentration [ $g\cdot l^{-1}$ ]
  - $y_i^{meas}$  = gemessene Restsubstratkonzentration [ $g\cdot l^{-1}$ ]

Die Berechnung der mittleren relativen Abweichung ist in Gleichung [21] abgebildet. Dabei wird die Differenz zwischen beobachteten und berechneten Werten ermittelt, und durch Division durch den Messwert in ein dimensionsloses Verhältnis umgewandelt. Um eine Neutralisation von positiven und negativen Fehlern zu vermeiden wird zur Bildung des Mittelwerts nur der Betrag der Abweichungen verwendet. Somit ergibt die MRD eine einfach zu interpretierende Verhältniszahl, welche auch in Prozent angegeben werden kann. Besondere Vorsicht bei der Berechnung ist bei sehr kleinen Messwerten angebracht, da die Division auch bei in absoluten Werten kleinen Abweichungen, zu relativ großen Fehlerbeträgen führen können. Dieser Eigenschaft kann durch gemeinsame Betrachtung mit dem RMSE entgegengewirkt werden. Durch die unterschiedliche Gewichtung großer und kleiner Werte bei der Fehlerberechnung erlauben die RMSE und MRD eine gute Interpretation der Modellqualität.

$$MRD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i^{pred} - y_i^{meas}}{y_i^{meas}} \right| \quad \text{Gleichung [21]}$$

- Dabei ist:
- MRD= mittlere relative Abweichung - mean relative deviation []
  - n = Anzahl der Messpunkte
  - i = Einzelmessung
  - $y_i^{pred}$  = vom Modell berechnete Restsubstratkonzentration [ $g\cdot l^{-1}$ ]
  - $y_i^{meas}$  = gemessene Restsubstratkonzentration [ $g\cdot l^{-1}$ ]

## 5.7 Herstellung und Modifikation von Cellooligosacchariden

Die in dieser Arbeit verwendeten Cellooligosaccharide wurden wie in Abschnitt 5.7.1 beschrieben, selbst hergestellt. Die damit durchgeführten Modifikationen wurden extern vergeben. Die Vorversuche sowie die Modifikation von Cellobiose erfolgte durch das Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB - Institutsteil BioCat (Straubing, Deutschland). Die Chlorierung der Cellooligosaccharide erfolgte durch die ChiroBlock GmbH (Wolfen, Deutschland).

### 5.7.1 Herstellung von Cellooligosacchariden aus Cellulose

Zur Herstellung von Cellooligosacchariden mit 3-6 Glucoseeinheiten wurde analog zu Akpınar und Penner (2008) eine 10%ige  $\alpha$ -Cellulose (Sigma-Aldrich, Best.Nr. 6429, Darmstadt, Deutschland) Suspension in vorgekühlter rauchender Salzsäure für 10 Minuten auf Eis und anschließend für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser unvollständigen Hydrolyse wurde die nun gelbliche Suspension portionsweise in eine Vorlage von 2-Propanol zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert (5000g, 5 min). Durch anschließendes Waschen mit technischem Ethanol wurden Säurereste sowie lösliche Hydrolyseprodukte (Glucose, Cellobiose) entfernt. Mit kaltem (4°C) Reinstwasser wurden dann wasserlösliche Cellooligosaccharide ausgezogen. Die so gewonnene Lösung an Cellooligosacchariden wurde am Rotationsverdampfer eingengt und durch Gefriertrocknung (-20°C, 1 mbar) der Rest an Feuchtigkeit entfernt. Die Kontrolle der Zusammensetzung der so hergestellten Cellooligosaccharide erfolgte nach der in Abschnitt 5.5.8 beschriebenen Methode.

### 5.7.2 Chlorierung von Cellobiose

Im Zuge der Entwicklung einer Modifikationsstrategie für die hergestellten Cellooligosaccharide wurden vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB - Institutsteil BioCat Cellobiose chloriert. Hierzu wurde Cellobiose (Sigma-Aldrich, Best.Nr. 22150-250G, Darmstadt, Deutschland) in Dimethylformamid gelöst und durch Zugabe von Toluol sowie dessen anschließende destillative Entfernung azeotrop getrocknet. Die getrocknete Cellobiose wurde auf 0 °C gekühlt, mit 1,6 Äquivalenten Arnold-Reagenz ((Chloromethylen)dimethyliminium Chlorid) versetzt und auf 100 °C erhitzt, wobei sich die Lösung bräunlich verfärbte. Ein weiteres Aufheizen auf 110 °C für 2 h führte schließlich zu einer vollständigen Schwarzfärbung. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt mit Essigsäureanhydrid versetzt und bei 40 °C über Nacht gerührt. Nach einer weiteren Stunde unter Rühren bei 50 °C wurde der Reaktionsansatz auf 0 °C abgekühlt und der pH-Wert durch Zugabe von 2 M Natronlauge auf 7 eingestellt. Ein entstehender schwarzer schlammiger Niederschlag wurde abfiltriert und das gequenchte Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert, wobei eine braune Lösung entstand. Diese wurde an Kieselgel mit einem Gradienten aus Hexan und Ethylacetat gesäut, wobei 4 Produktfraktionen erhalten wurden. Für die mengenmäßig größte Produktfraktion wurde mittels NMR-Analyse ein hoher Chlorierungsgrad in Form von 3 verschiedenen siebenfach chlorierten Zuckern nachgewiesen. Diese Fraktion wurde auch für Vorversuche im Kolbenprober verwendet.

### 5.7.3 Modifikation von Cellooligosacchariden

Die unter Abschnitt 5.7.1 hergestellten Cellooligosaccharide wurden von der ChiroBlock GmbH (Wolfen, Deutschland) als Auftragsarbeit chloriert.

Diese löste die getrockneten Cellooligosaccharide in Dimethylformamid bei unter 0 °C und nach Zugabe von (Chloromethylen)dimethyliminiumchlorid wurde die Mischung zuerst bei Raumtemperatur für 1 h und anschließend für 2h bei 110 °C gerührt. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid wurde die Mischung für weitere 12 h bei 40 °C unter Rühren inkubiert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 2N NaOH neutralisiert. Essigsäureethylester wurde zugegeben und die modifizierten Oligosaccharide mit der organischen Phase ausgezogen. Nach der Trocknung wurde Natriummethanolat in methanolischer Lösung zugegeben, die Lösung bei Raumtemperatur für 15 h gerührt und durch Filtration mit einem sauren Ionenaustauscherharz neutralisiert. Das Filtrat wurde unter Vakuum bei 30 °C eingedampft. Aus 2 Reaktionsansätzen mit unterschiedlicher Menge an (Chloromethylen)dimethyliminiumchlorid entstanden 2 Fraktionen mit einer Produktreinheit von 90 % (Verunreinigungen Toluol, Ethylacetat, Dimethylformamid) und einem Chlorgehalt von 7,25 und 12,12 %. Dies entspricht durchschnittlichen Chlorierungsgraden von 0,36 bzw. 0,6 Chloratomen pro Glucoseeinheit. Die Chlorierung der Cellooligosaccharide wurde mit der im Abschnitt 5.5.8 beschriebenen Methode überprüft.

## 5.8 Molekularbiologische Methoden

### 5.8.1 DNA-Aufreinigung

Die für die qPCR Experimente notwendige genomische DNA wurde aus den Reinkulturen gewonnen, während zur Quantifizierung eine Verdünnungsreihe angelegt wurde. Dafür wurde eine Reinkultur von *C. cellulolyticum* oder *C. cellulovorans* mit bekannter Biomassekonzentration mit 0,9 %iger steriler NaCl entsprechend verdünnt. Bei *C. cellulolyticum* wurden 2,5 ml Reinkultur + 7,5 ml 0,9 %iger NaCl gemischt und für die weiteren Verdünnungen ebenso verfahren, sodass die Verdünnungsstufen  $4^{-1}$ ,  $4^{-2}$ ,  $4^{-3}$ ,  $4^{-4}$ ,  $4^{-5}$  und  $4^{-6}$  erhalten wurden, während bei *C. cellulovorans* eine 5 ml + 5 ml Verdünnung gewählt wurde und somit die Verdünnungsstufen  $2^{-1}$ ,  $2^{-2}$ ,  $2^{-3}$ ,  $2^{-4}$ ,  $2^{-5}$  und  $2^{-6}$  erstellt wurden.

Für die Aufreinigung von DNA aus Fermenterproben wurden diese auf Eis aufgetaut und nach dem Abzentrifugieren bei 21000 g für 10 min wurde der Niederschlag dreimal mit AE-Puffer (20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA) gewaschen, um eventuell vorhandene Huminsäuren abzutrennen (Köllmeier, 2014). Alle Standards wurden ebenso behandelt, während für die Gewinnung der genomischen DNA aus Reinkulturen für Vorversuche dieser Waschschrift nicht durchgeführt wurde. Die weitere Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte durch Anwenden des DNeasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande) nach dem wet soil Protokoll. Die Pellets wurden schon beim letzten Waschschrift in die Aufschlussröhrchen überführt und dort aufgrund deren geringeren Stabilität nur bei 15000 g für 10 min und anschließend nochmal bei 21000 g für 3 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet in der Aufschlusslösung suspendiert worden war, wurden abweichend vom Standardprotokoll 5 µl einer 1:10 Verdünnung von DNA aus Heringssperma (D-7290, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugegeben, um die Elutionseffizienz zu verbessern (Junicke et al., 2014). Der Aufschluss erfolgte im Vortex-Schüttler, Disruptor Genie® digital (Bohemia, NY, USA) bei einer Geschwindigkeit von 2450 rpm. Bis auf das Entfernen der Waschlösung C5 in Schritt 17 erfolgten alle weiteren Schritte genau wie im DNeasy® PowerSoil® Kit vorgesehen. Bei Schritt 17 wurde anstelle von einer Zentrifugation bei 10000 g für 30 s, zwei Zentrifugationen bei 10000 g für 60 s angewandt, wobei zwischen den beiden Schritten die Säule um 180 ° gedreht wurde um eine noch bessere Abtrennung zu erreichen. Die Lagerung der gereinigten DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

### 5.8.2 Primerdesign

Die notwendigen Primer für die qPCR wurden mit dem online Tool Primer3 web version 4.00 (Untergasser et al., 2012) unter Verwendung der Standardparameter mit den Abweichungen bei:

- Primerlänge: 18 – 20 bp; opt: 20 bp
- Schmelztemperatur: 58 – 62 °C; opt: 60 °C
- Produktlänge: 75 - 120 bp
- GC-Gehalt: 40 -70 %; opt: 55 %

Als Template wurde dabei die 16S rDNA der entsprechenden Mikroorganismen verwendet (*C. cellulolyticum*: NG\_041947, *C. cellulovorans*: NC\_014393).

Die Evaluierung der Primer wurde mit Hilfe des TestPrime 1.0 Tools des SILVA rRNA database project (Klindworth et al., 2013) durchgeführt.

### 5.8.3 qPCR Messungen

Alle qPCR Analysen wurden mit dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) und dem SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) durchgeführt. Als Reaktionsbehälter wurden Multiplate™ 48-Well PCR Plates white (Bio-Rad, USA) verschlossen mit 0,2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips (Bio-Rad, USA) verwendet. Das Experimentdesign, sowie die Auswertung erfolgte mit der CFX Manager Software (Bio-Rad, USA) Version: 3.1.1517.0823. Das qPCR Reaktionsschema erfolgte nach den Vorgaben des SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix. Ein



qPCR-Lauf begann mit einem initialen Erhitzungsschritt von 3 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Polymerisationszyklen bei 95 °C für 10 s und 60 °C für 30 s (*C. cellulolyticum*) bzw. 60 s (*C. cellulovorans*). Bei jedem qPCR-Lauf wurde nach einem Erhitzungsschritt auf 90 °C für 10 s eine Schmelzkurve von 65 bis 95 °C mit einer Heizrate von 0,5 °C / 5 s aufgenommen. Während der gesamten PCR-Analyse wurde die Deckeltemperatur auf 105 °C gehalten, um Kondenswasserbildung auf den transparenten 8-Cap Strips zu verhindern. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze kann aus Tabelle 16 und die Primerkonzentration aus Tabelle 12 entnommen werden, außerdem wurde bei allen qPCR-Läufen eine Negativkontrolle (NTC - no template control) in Form eines Ansatzes mit nukleasefreiem Wasser anstatt Template mitbestimmt. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammenpipetiert, wobei dabei das Templat vorgelegt und anschließend die weiteren Komponenten als Mastermix zugegeben wurden. Vor dem Start der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mittels Vortexschüttler homogenisiert und mittels Pulsfunktion einer Tischzentrifuge am Boden des Reaktionsgefäßes zusammengeführt.

Tabelle 16: qPCR Reaktionsansätze mit dem SYBR-Green Supermix

	10 µl-Ansatz	20 µl-Ansatz	40 µl-Ansatz
SYBR-Green Supermix	5 µl	10 µl	20 µl
Template DNA	2 µl	4 µl	8 µl
fw-Primer	1 µl	2 µl	4 µl
rev-Primer	1 µl	2 µl	4 µl
Nukleasefreies Wasser	1 µl	2 µl	4 µl

#### 5.8.4 Ermittlung der Primerspezifität

Die Speziespezifität der qPCR-Primer wurden neben der in silico Überprüfung auch durch qPCR Tests kontrolliert. Dazu wurde ein einfacher Reaktionsansatz mit den zu testenden Primern durchgeführt und als Template-DNA wurden  $\approx 4,5 \text{ ng ml}^{-1}$  verwandter Mikroorganismen verwendet. Zur Kontrolle der Speziespezifität der qPCR Primer für *C. cellulolyticum* wurde als Template *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum* und *C. acetobutylicum* und für die Kontrolle von *C. cellulovorans* wurden *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* und *C. thermocellum* verwendet. Als Positivkontrolle wurden die gewählten Templates auch mit den Bakterien spezifischen Primern *Eub 338* und *Eub 518* durchgeführt.

#### 5.8.5 Optimierung der Annealingtemperatur

Die Optimierung der Annealingtemperatur für die qPCR Primer erfolgte anhand eines Temperaturgradienten, welcher von 58,0 °C bis 62,2 °C gewählt wurde (genaue Stufen: 58,0 °C; 59,0 °C; 60,0 °C; 61,2 °C und 62,2 °C). Als Reaktionsansatz wurden 10 µl gewählt mit einer Templatkonzentration von 5,4 ng ml<sup>-1</sup> genomischer DNA und einer Primerkonzentration von 300 ng ml<sup>-1</sup>.

#### 5.8.6 Optimierung Primerkonzentration

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurden 10 µl Ansätze und eine Templatkonzentration von 1,08 ng µl<sup>-1</sup> gewählt. Die Primeroptimierung erfolgte bei 60 °C und es wurden Primerkonzentrationen von 200, 300, 400, 500 nmol l<sup>-1</sup> gewählt.

#### 5.8.7 Ermittlung der qPCR Effizienz

Um die ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen zu überprüfen wurde genomische DNA mit nukleasefreiem Wasser in 10er Schritten bis zu 10<sup>-6</sup> verdünnt. Mit dieser Verdünnungsreihe konnte

eine qPCR Analyse wie unter Abschnitt 5.8.3 beschrieben durchgeführt und basierend auf der Steigung der erstellten Geraden die Effizienz berechnet werden (Abschnitt 2.5).

#### 5.8.8 Quantifizierung von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans*

Die Quantifizierung von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* erfolgte nach dem unter Abschnitt 5.8.3 beschriebenen Ansatz bei optimierten Bedingungen mit 10 µl für *C. cellulolyticum* und 20 µl für *C. cellulovorans*.

Als Standards wurden genomische DNA aus den Reinkulturen von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* unter Zugabe von DNA aus Heringsperma, wie in Abschnitt 5.8.1 beschrieben, verwendet. Von jeder der in Triplets aufgereinigten DNA aus Biomasseverdünnungen wird eine Doppelbestimmung durchgeführt, woraus ein 6-fach Bestimmung resultiert. Die Proben selbst werden wie bei der Aufreinigung in Triplets analysiert. Für jeden Lauf werden 2 Multiplate™ 48-Well PCR Plates verwendet, von welchen die Überhänge entfernt wurden, um diese zeitgleich in den 96 well qPCR-Cycler verwenden zu können. Folglich konnten immer 96 Ansätze gleichzeitig analysiert werden, wobei jedes Mal eine neue Kalibrationsgerade zur Quantifizierung erstellt wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsvolumina wurde je Lauf nur ein Mikroorganismus quantifiziert.

#### 5.8.9 Sequenzierung der qPCR-Produkte von *C. cellulovorans*

Um die produzierten qPCR-Produkte der Quantifizierung von *C. cellulovorans* auf ihre Sequenzspezifität zu überprüfen, wurden diese, nachdem durch für Sequenzierungsprimer geeignete Überhänge angefügt wurden, sequenziert. Dazu wurde ein qPCR-Ansatz mit 40 µl durchgeführt und die Produkte mittels Agarose Gelelektrophorese von den anderen Reaktionskomponenten getrennt und nach dem Ausschneiden der Bande mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgereinigt, wobei in Schritt 4 nach dem Zentrifugationsschritt das Säulchen um 180° gedreht und erneut zentrifugiert wurde. In einem zweiten PCR-Lauf wurden nun durch Verwenden der Primer *Ext-Cvor\_I\_fwd* und *Ext-Cvor\_I\_rev* (Tabelle 12) die für die Sequenzierung notwendigen Überhänge generiert. Dafür wurde die *Phusion*® High-Fidelity DNA Polymerase verwendet, da diese über eine Korrekturlesefunktion verfügt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 17 zusammengefasst und der PCR-Ablauf war 98 °C 30 s, 30 mal (98 °C, 8 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 90 s) gefolgt von einem finalem Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min. Die erweiterten PCR-Produkte wurden erneut mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Ausschneiden der Bande mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit wie oben beschrieben gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte nach Versenden durch die Firma GATC Biotech (Köln, Deutschland).

Tabelle 17: Reaktionsansatz für PCR Ansätze mit *Phusion*® High-Fidelity DNA Polymerase

Komponente	Volumen
<i>Phusion</i> ® HF Buffer (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)	10 µl
<i>Phusion</i> ® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)	0,5 µl
10 mM dNTP Mix (VWR, Radnor, PA, USA)	1,0 µl
Vorwärts Primer	2,5 µl
Rückwärts Primer	2,5 µl
Template DNA	0,5 µl
Nukleasefreies Wasser	33 µl

### 5.8.10 Sequenzierung der qPCR-Produkte von *C. cellulolyticum*

Zur Sequenzierung der qPCR Produkte als zusätzliche Kontrolle der quantifizierten Spezies wurden diese aufgrund der geringen Länge in ein Plasmid kloniert. Als Vektor wurde pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) verwendet und als Klonierungsstrategie Gibson Assembly (Gibson et al., 2009) angewandt.

Das notwendige qPCR Produkt wurde mittels 40 µl qPCR Ansatz generiert (Tabelle 16) und mittels Agarose Gelelektrophorese von den anderen Reaktionskomponenten getrennt. Nach dem Ausstechen der Bande aus dem Gel wurde die DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) gereinigt, wobei in Schritt 4 nach dem Zentrifugationsschritt das Säulchen um 180° gedreht und erneut zentrifugiert wurde. Die Elution erfolgte in 15 µl nuklease freiem Wasser, welches auf der Säule zur besseren Elution bei 70 °C für 5 min inkubiert wurde. Ansonsten erfolgten alle Schritte wie vorgegeben.

Das Anfügen der notwendigen überlappenden Sequenzen an qPCR-Produkt und Vektor für das Gibson Assembly wurde mittels PCR mit den in Tabelle 12 aufgelisteten Primern durchgeführt. Die PCR Schritte waren 98 °C 30 s, 30mal (98 °C, 8 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 90 s) gefolgt von einem finalen Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min. Die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Die so erstellten DNA-Produkte wurden erneut mittels Agarose Gelelektrophorese und NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt und anschließend für den Gibson Assembly verwendet. Dazu wurden 0,2 µl des verlängerten qPCR-Produkts mit 6,0 µl des erweiterten Backbones mitsamt 6,2 µl Gibbson Master Mix (Tabelle 18) für 1 h bei 50 °C inkubiert. Das so entstandene Plasmid wurde anschließend zu kompetenten NEB® Turbo Competent *E. coli* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) pipettiert und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden 900 µl SOC-Medium Tabelle 11 zugegeben und für 1 h bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten (Tabelle 9) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von ausgewählten Kolonien wurden zur Plasmidgewinnung Übernachtskulturen in LB-Medium (Tabelle 10) bei 37 °C und 200 rpm angelegt und die Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) aus 2 ml Übernachtskultur gewonnen. Die einzige Abweichung zur Vorschrift stellte ein Trocknungsschritt bei 50 °C für 3 min direkt vor dem Elutionsschritt mit 50 µl nukleasefreiem Wasser dar. Die so gewonnenen Plasmide wurden bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Köln, Deutschland).

Tabelle 18: Zusammensetzung des Gibbson Master Mix

Komponente	Konzentration	Lieferant	Bestellnummer	Reinheit
PEG-6000	25 %	Serva	39778.01	≥ 99 %
TRIS Hydrochlorid	500 mmol l <sup>-1</sup>	Roth	9090.3	≥ 99 %
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	50 mmol l <sup>-1</sup>	VWR	1058861000	≥ 99,5 %
DTT	50 mmol l <sup>-1</sup>	VWR	443852A	≥ 99 %
dATP	1 mmol l <sup>-1</sup>	Promega	U1205	≥ 99 %
dCTP	1 mmol l <sup>-1</sup>	Promega	U1225	≥ 99 %
dGTP	1 mmol l <sup>-1</sup>	Promega	U1215	≥ 99 %
dTTP	1 mmol l <sup>-1</sup>	Promega	U1235	≥ 99 %
NAD	5 mmol l <sup>-1</sup>	Roth	AE11.2	≥ 95 %

#### 5.8.11 Agarosegelelektrophorese

Für die Prüfung der richtigen Produktlänge und für die Gewinnung von PCR-Produkten wurde eine Agarosegelelektrophorese mit 2 %igen Agarose SERVA Wide Range (Serva, Heidelberg, Germany) verwendet. Für die Herstellung der Gele, sowie als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0,5 mM Acetat) verwendet. Nach dem Erhitzen der Agarosesuspension in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung wurde 5 µl Stain Clear G (Serva, Heidelberg, Germany) zugegeben und die Gele gegossen. Sobald die Gele erstarrt waren, wurden diese mit dem PCR-Produkt mit 6-fach Ladepuffer purple (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) beladen und die Produkte bei konstanter Spannung und 110 V für 50 min mittels PowerPac™ Basic (Bio-Rad, CA, USA) aufgetrennt. Die fertigen Gele wurden im UV-Licht analysiert. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde als Vergleichswert der 2-log ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) verwendet.

#### 5.8.12 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Qualität der aufgereinigten DNA wurde durch Messung am NanoPhotometer® P330 (IMPLEN, München, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde nach Einsetzen der Submikroliter Küvette 1 µl homogene Probelösung aufgetragen und der Deckel mit 1 mm optischer Weglänge aufgesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA-Konzentration bei 260 nm und die qualitative Analyse durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm. Alle Messungen wurden durch die Messung des Lösungsmittelsblanks korrigiert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Inokula

#### 6.1.1 Charakterisierung des Fermenterinokulums

Um für die Experimente möglichst nahe an der Praxis arbeiten zu können, wurden Inokula aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen verwendet. Die Inokula wurden von der Firma Agraferm Technologies AG zur Verfügung gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass in den beprobten Anlagen zum überwiegenden Teil (Hemi)Cellulosen eingesetzt wurden und somit die Mikroorganismen an die Verwertung von Cellulose angepasst waren. Bei der Eingangskontrolle wurden die in Tabelle 19 zusammengefassten Werte festgestellt:

*Tabelle 19: Zusammenfassung der ermittelten Eigenschaften beider verwendeter Inokula aus den Biogasanlagen Schrassig und Hohenwart bei der Eingangskontrolle.*

	<b>Inokulum Hohenwart</b>	<b>Inokulum Schrassig</b>
TS [%]	18,5 ± 0,1	14,2 ± 0,2
oTS [% der TS]	74,8 ± 0,5	71,0 ± 0,7
Asche [% der TS]	25,2 ± 0,5	29,0 ± 0,7
pH	8,21	7,81
NH <sub>4</sub> -N [gl <sup>-1</sup> ]	3,71	1,96
P [mg/g Asche]	41 ± 2	28 ± 1
C:N:P:S	600:43:15:2	600:43:14:2

### 6.2 Ergebnisse der Fermentationsversuche in den Laborfermentern

#### 6.2.1 Versuchsplanung und Ablauf der Fermentationsversuche

Die Vorversuche zur Medienentwicklung wurden in einer Serie von Kolbenproberversuchen durchgeführt, um im kleinen Maßstab parallel mehrere Medienvarianten testen zu können.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurde die kontinuierliche Biogasproduktion in den Fermentern 1, 2 und 3 gleichermaßen gestartet, wobei nach Erreichen von 2,4 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> die Versuche zur Abbaukinetik von Cellulose in allen Fermentern begonnen wurden. In weiterer Folge wurde die Raumbelastung auf 4,8 gl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> erhöht und dann bei Fermenter 1 und 2 mit den Versuchen zur Abbaukinetik von Cellulose fortgefahren. Im Unterschied dazu wurde bezüglich Fermenter 3 entschieden das Limit der Raumbelastung und der hydraulischen Verweilzeit zu ermitteln, weshalb die Raumbelastung immer weiter erhöht wurde. In diesem Fermenter wurde folglich eine kontinuierliche Substratzufuhr aufrechterhalten und keine Experimente zum Celluloseabbau mehr durchgeführt.

Die abgebildeten Daten zur Medienoptimierung und zur maximalen Belastung des Fermenters konzentrieren sich auf Fermenter 3, während der Großteil der Celluloseabbaukinetiken in Fermenter 1 und 2 ermittelt wurden.

#### 6.2.2 Vorversuche zur Medienentwicklung im Kolbenprober

Zur Entwicklung eines synthetischen Fermentationsmediums, welches ein kontinuierliches Wachstum der gesamten biogasproduzierenden Biozönose unter definierten Bedingungen erlaubt, wurden Testreihen an verschiedenen Medien in Anlehnung an den Hohenheimer Biogasertragstest wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden 3 verschiedene Medien aus entsprechender Vorkultur in einem Repeated-Batch Verfahren fünfmal überimpft, um über mehrere Zyklen

festzustellen, welches Medium auch über einen längeren Zeitraum eine konstante Produktion von Biogas erlaubt. Die getesteten Medien waren das MJ-Medium (Johnson et al., 1981), das M141-Medium (DSMZ, 2015) und das L47-Medium (DIN EN ISO 11734:1998-11, 1998) deren Zusammensetzungen in Abschnitt 4.6 wiedergegeben sind.

Insgesamt wurde die Überimpfung 5-fach wiederholt. Die Ergebnisse der Zyklen 1 bis 4 sind in Abbildung 12 dargestellt, während der 5. und letzte Versuch wegen Leckagen nicht ausgewertet werden konnte. Während der Versuchsreihe wurde ab der 2. Überimpfung zusätzlich ein Versuch angesetzt, um das verwendete MJ-Medium durch Zugabe des im 141-Methanogenium Medium verwendeten Spurenelementcocktails besser an die Bedürfnisse von methanogenen Mikroorganismen anzupassen („MJ-Spuren“). Die Versuchsansätze sind auch in Tabelle 13 zusammengefasst.

Aus der zusammengefassten Biogasproduktion in Abbildung 12 kann entnommen werden, dass bei Verwendung des MJ-Mediums deutlich größere Biogasvolumina produziert wurden als bei den Medien M141 und L47. Außerdem geht aus der Abbildung hervor, dass durch Kombination aus dem MJ-Medium mit Spurenelementlösung des M141 Mediums die Biogasbildung beschleunigt werden konnte. Während diese beiden Beobachtungen bei allen 4 Wiederholungen reproduziert werden konnten, sticht die Überimpfung 2 mit einem eigenen Verlauf hervor. Hier ist die Lag-Phase deutlich länger als bei den anderen Überimpfungen und auch tritt hier eine deutliche Differenz im Gasvolumen zwischen den MJ-Medien mit und ohne Spurenelementzusatz auf, welche ansonsten nicht zu beobachten ist. Auch sind die Fehlerindikatoren beim Wachstumsversuch mit Spurenelementzusatz weit größer als bei allen anderen Experimenten.

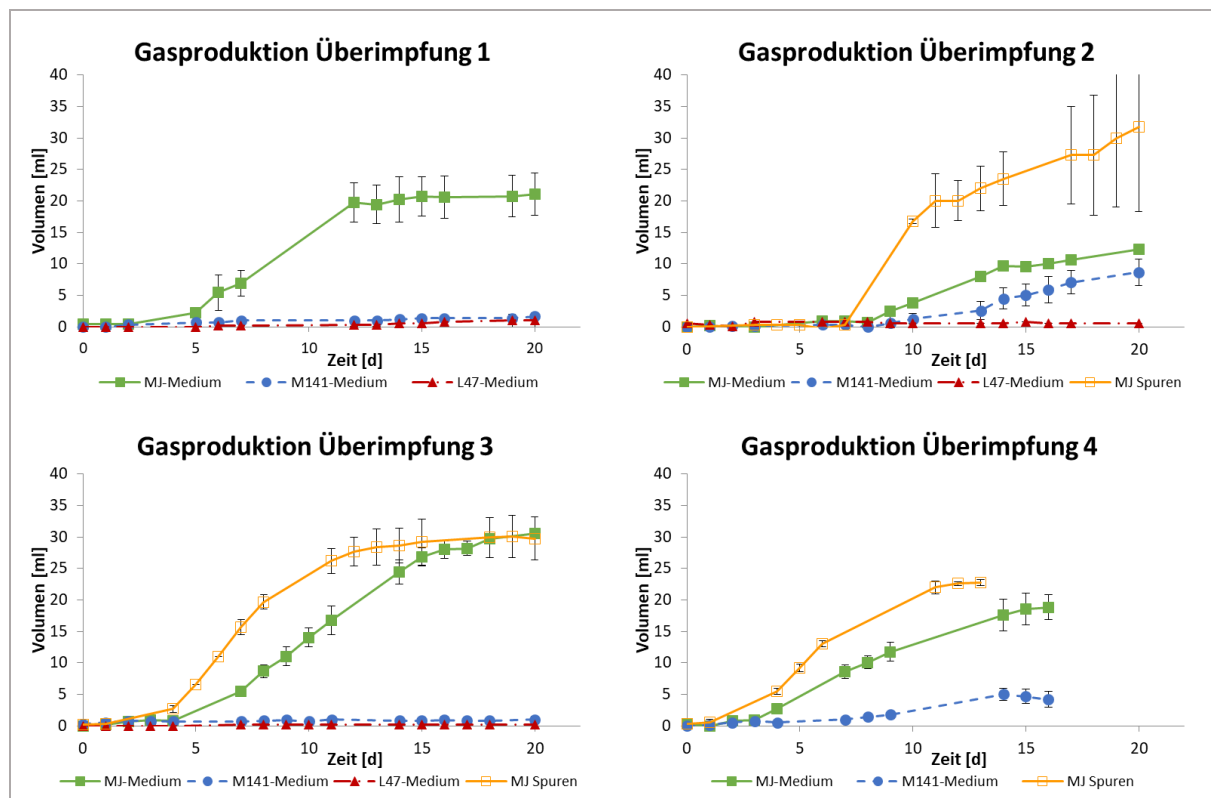


Abbildung 12: Überblick über die Gasproduktion der durchgeführten Batchversuche mit den synthetischen Medien MJ (grün), M141 (blau) und L47 (rot), sowie einer Variante des MJ-Mediums mit Zusatz einer Spurenelementlösung (orange). Der Gärrest zu Versuchsende wurde als Inokulum der darauffolgenden verwendet. Bis auf die Versuche mit MJ-Medium mit Spurenelementzusatz, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurde, sind die dargestellten Werte Ergebnisse einer Dreifachbestimmung.

Genauere Daten zu den Experimenten zur Medienauswahl sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Aus den Daten kann entnommen werden, dass die 75 ml Biogas, welche durch den Einsatz von 100 mg

Cellulose erwartet waren, bei keinem Medium erreicht wurden. Besonders auffällig ist das bei den Medien M141 und L47, da hier nicht nur geringe Biogasproduktion zu beobachten ist, sondern auch die Restsubstratkonzentration, die nach der Hydrolyse als Glucose angegeben wird, akkumuliert, also mit der Überimpfung stieg. Das Ergebnis war bei beiden getesteten Versionen des MJ-Mediums deutlich besser, was am nahezu vollständigen Celluloseabbau erkennbar ist. Jedoch zeigte die mangelnde Gasproduktion in Verbindung mit steigenden Essigsäurekonzentrationen auf bis zu 6 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> eine Störung der Biogasproduktion an, sodass keines der getesteten Medien den gewünschten dauerhaft stabilen Celluloseabbau bei gleichzeitiger vollständiger Umwandlung in Biogas erlaubte. Ein Einfluss des Restgaspotentials des Inokulums kann für diese Versuchsreihe ausgeschlossen werden, da die gleichzeitig durchgeführten Blindwerte keine übermäßige Gasbildung aufwiesen. Diese sind gemeinsam mit den gemessenen Einzelwerten im Anhang wiedergegeben.

Tabelle 20: Detaillierter Überblick über die Batchversuche zur Medienauswahl. Zusammengefasst sind die Analyseergebnisse der Restsubstratkonzentration berechnet als Glucose, der produzierten Biogasmenge und der Essigsäurekonzentration. Die 20 ml Ansätze wurden mit 100 mg Cellulose (mikrokristallin) durchgeführt, was einer Anfangskonzentration von 5 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> entsprach. Die Versuche MJ-Spuren wurden in Doppel- und alle anderen Versuche in Dreifachbestimmung durchgeführt.

	Überimpfung 1	Überimpfung 2	Überimpfung 3	Überimpfung 4
	[mg Glucose / Kolbenprober]	[mg Glucose / Kolbenprober]	[mg Glucose / Kolbenprober]	[mg Glucose / Kolbenprober]
<b>MJ-Medium</b>	10*	63 ± 2	5*	52*
<b>M141-Medium</b>	107 ± 7	139*	193 ± 4	208*
<b>L47-Medium</b>	83*	106,4 ± 0,4	114 ± 2	N.D.**
<b>MJ –Spuren</b>	N.D.**	N.D.**	10*	24*
	[ml Biogas / Kolbenprober]	[ml Biogas / Kolbenprober]	[ml Biogas / Kolbenprober]	[ml Biogas / Kolbenprober]
<b>MJ-Medium</b>	17 ± 2	12,4 ± 0,2	30,5 ± 0,6	19 ± 2
<b>M141-Medium</b>	0,7 ± 0,5	8 ± 2	0,7 ± 0,4	4 ± 1
<b>L47-Medium</b>	1,0 ± 0,8	0	0,2 ± 0,2	N.D.**
<b>MJ –Spuren</b>	N.D.**	N.D.**	30 ± 3	22,4 ± 0,3
	Essigsre-Endkonz. [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]	Essigsre-Endkonz. [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]	Essigsre-Endkonz. [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]	Essigsre-Endkonz. [g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ]
<b>MJ-Medium</b>	3,58 ± 0,03	3,71 ± 0,02	5,01 ± 0,01	6,0 ± 0,3
<b>M141-Medium</b>	1,605 ± 0,002	1,330 ± 0,004	1,8529 ± 0,0006	1,92 ± 0,11
<b>L47-Medium</b>	0,21*	0,44*	0,43 ± 0,02	N.D.**
<b>MJ –Spuren</b>	N.D.**	N.D.**	4,4	5,8 ± 0,3

\* Aufgrund geringer Substanzmengen wurden die Rückstände aus 3 Ansätzen zur Analyse vereinigt

\*\* Wachstumsversuch mit L47-Medium nach 3 Überimpfungen abgebrochen. Wachstumsversuch mit MJ-Spuren erst ab der 3. Überimpfung durchgeführt. Folglich liegen keine Daten vor.

### 6.2.3 Fermenterbetrieb und Anpassung des Mediums

Zu Beginn der Fermentation wurde aufbauend auf den Erkenntnissen der Vorversuche im Batchmaßstab der erste Fermentationsversuch mit einer 1:1 Mischung aus MJ-Medium und 141 Methanogenium Medium durchgeführt, wobei die komplexen Medienbestandteile Hefeextrakt und Trypticaseextrakt, sowie auch Natriumacetat weggelassen wurden. Als Reduktionsmittel wurde anstatt von Natriumsulfid ausschließlich L-Cystein verwendet und der Cellulosegehalt wurde zu Beginn auf 50 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> festgelegt, womit der Kohlenstoffgehalt im Medium zu über 95 % von Cellulose bestimmt wurde. Die verwendete Spurenelementlösung des 141 Methanogenium Mediums wurde mit der Ausnahme von Kolbalt wie in der Literatur beschrieben (DSMZ, 2015) verwendet, wobei aufgrund der

Verfügbarkeit im Labor Kobaltchlorid anstelle von Sulfat eingesetzt wurde. Gleich zu Beginn der Fermentation, deren Verlauf in Abbildung 13 abgebildet ist, konnte bei einer Raumbelastung von  $1 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer HRT von 50 d keine Gasbildung festgestellt werden, sondern lediglich eine Zunahme der Essigsäurekonzentration. Erst nach Unterbrechen der Substratzugabe und der Steigerung des  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Gehaltes im Medium von  $0,12$  auf  $1,5 \text{ gl}^{-1}$  an Tag 10 der Fermentation setzte die Gasbildung ein und die Essigsäure wurde abgebaut. In weiterer Folge mussten verschiedene Veränderungen an der Medienzusammensetzung vorgenommen werden. So wurde am 19. Tag auf die Zugabe des MOPS-Puffers aus ökonomischen Gründen verzichtet und ausschließlich das Phosphatpuffersystem verwendet. Darüber hinaus wurde ebenfalls aus wirtschaftlichen Überlegungen am 25. Fermentationstag die RPMI 1640 Vitaminlösung durch die Vitaminlösung des 141 Methanogenium Mediums ersetzt, wobei aus Gründen der Kontinuität darauf geachtet wurde, dass Vitamine, die in der RPMI 1640 Lösung vorhanden waren, auch zur weiter verwendeten Vitaminlösung zugesetzt wurden, woraus eine modifizierte Version entstand, welche in Tabelle 7 zusammengefasst ist. Da Löslichkeitsprobleme im Medium auftraten, wurde, um das Problem zu lösen, 46 d nach Beginn der Fermentation die Zugabe von Magnesium ausschließlich auf  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  umgestellt und durch die Reduktion der Magnesiumzugabe das Verhältnis von Magnesium zu Calcium in Richtung Calcium verschoben.

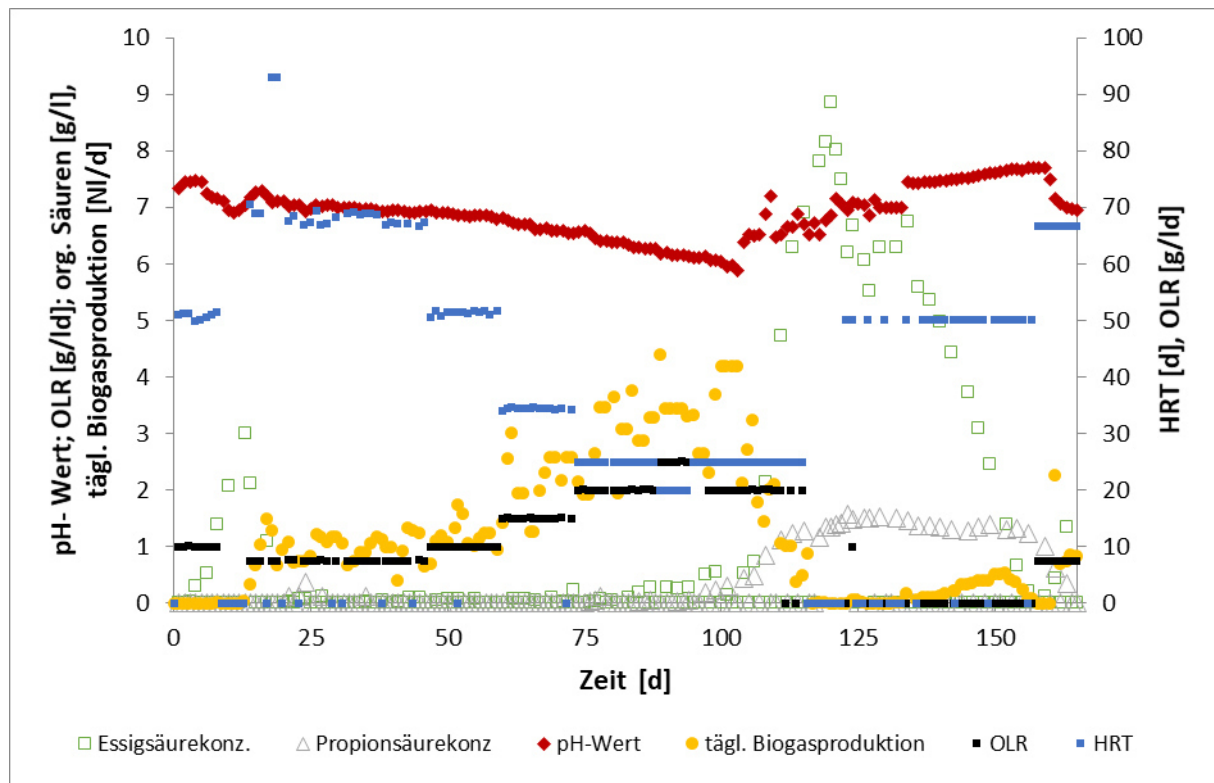


Abbildung 13: Zusammenfassung des Fermentationsbeginns im Fermenter 3. Es zeigt sich zu Beginn eine kurzzeitige Akkumulation von Essigsäure und mit steigender Raumbelastung ein stetig sinkender pH-Wert, da zu Beginn der pH-Wert noch nicht eingestellt wurde. Der sinkende pH-Wert gemeinsam mit einem Stromausfall am Tag 115 führten schließlich zu einem Versäuern des Fermenters, welches nur durch Zugabe von frischem Inokulum am Tag 132 behoben werden konnte.

Im Anschluss konnte das Fermentationssystem erstmalig belastet und die Raumbelastung schrittweise von  $0,7 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  auf  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  gesteigert werden (HRT =  $66,7 \text{ d}$  auf  $20 \text{ d}$ ), wobei sich auch die Gasbildung proportional dazu erhöhte. Allerdings trat dabei als Nebeneffekt ein kontinuierliches Absinken des pH-Wertes auf. Um diesem entgegenzuwirken, wurde das Phosphatpuffersystem aus  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  immer weiter zu Gunsten von  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  verschoben und auch mittels manueller Zugabe von NaOH der pH-Wert des Mediums auf  $7,5$  gehoben. Leider konnten diese Maßnahmen den pH-Wert nicht nachhaltig wieder anheben, sodass nach 96 Tagen der kontinuierlichen Fermentation die organischen



Säuren Essigsäure und Propionsäure etwas anzusteigen begannen. Die Essigsäure erreichte an diesem Tag erstmalig seit dem Essigsäurepeak zu Fermentationsbeginn eine Konzentration von mehr als  $500 \text{ mg l}^{-1}$ , weshalb die OLR auf  $1,9 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  reduziert wurde. Als auch das nichts an der stetigen pH-Abnahme ändern konnte wurde ab dem 103. Tag der Fermentation damit begonnen einem weiteren Absinken durch Zudosierung von NaOH entgegenzuwirken. Der pH-Wert wurde zunächst auf 6,5 und ab Tag 108 auf 7,0 eingestellt. Das Fermentationssystem reagierte auf diesen regulatorischen Eingriff zunächst mit einer Erhöhung der Konzentrationen der organischen Säuren und einer Reduktion der täglich gebildeten Biogasmenge. Als dann in dieser kritischen Phase der Fermentation auch noch am Tag 115 ein Stromausfall in Folge eines Gewitters die Datenerfassungs- und Steuerbaugruppe SENSOControl aller Fermenter über Nacht ausfallen ließ, kam es durch die dadurch bewirkte Unterbrechung der kontinuierlichen Rührer und auch der Heizung zu einem weiteren Ansteigen der Essigsäurekonzentrationen bis zu einem Wert von  $8800 \text{ mg l}^{-1}$  und zum vollständigen Erliegen der Gasproduktion. Obwohl nach diesem Ereignis die Substratzugabe sofort unterbrochen wurde, konnten die hohen Konzentrationen an organischen Säuren nicht mehr abgebaut werden, sodass am 132. Tag der Fermentation 200 ml einer 1:4 Mischung der Inokula Hohenwart und Schrässig zugegeben wurden, um die offensichtlich geschädigte biogasproduzierende Biozönose zu unterstützen, woraufhin zuerst die Essigsäure und danach auch die Propionsäure in Biogas umgewandelt werden konnten. Am Tag 158 wurde schließlich die Substratzugabe über 2 Pumpenkanäle neu gestartet. Dieser Tag wird somit als der eigentliche Fermentationsbeginn angesehen. Im Zuge dieses Neustarts wurde auch die Zusammensetzung des Mediums ein weiteres Mal angepasst. So wurde kein Methionin mehr zugesetzt, da dies durch das vorhandene Vitamin B12 in der Vitaminlösung nicht mehr erforderlich war (Davis und Mingioli, 1950; Johnson et al., 1981). Außerdem wurde die  $\text{NH}_4\text{Cl}$  Konzentration schrittweise erhöht, um einem Absinken des pH-Wertes im Fermenter entgegenzusteuern, bis die Konzentration schließlich 59 Tage nach Wiederaufnahmen der Substratzugabe eine Konzentration von  $9 \text{ g l}^{-1}$  erreichte.

Eine Analyse der Spurenelemente, welche von einem externen Labor aus einer vom 241. Fermentationstag nach Wiederaufnahme der Substratzugabe durchgeführt wurde (DIN EN ISO 17294-2; 2016), ergab eine ungenügende Konzentration der Spurenelemente Nickel, Selen, Wolfram und Eisen, weshalb deren Konzentration im synthetischen Fermentermedium erhöht wurde. Als dann nach 385 Tagen der kontinuierlichen Fermentation mit dem selbst entwickelten Medium die Raumbelastung weiter erhöht werden sollte, musste die Konzentration von Cellulose im Medium angepasst werden, um einer gleichzeitigen zu starken Reduktion der hydraulischen Verweilzeit vorzubeugen. Somit wurde der Cellulosegehalt im Medium von  $50 \text{ g l}^{-1}$  auf  $83,3 \text{ g l}^{-1}$  erhöht und dabei auch die Konzentrationen der Medienkomponenten Kalium, Calcium, Magnesium, Harnstoff und Eisen im gleichen Verhältnis angepasst. Durch die Erhöhung der Eisenkonzentration konnte dieses nicht mehr aufgrund von Löslichkeitsproblemen direkt über das Medium zugegeben werden, sondern musste von diesem Zeitpunkt an als separate Stocklösung in EDTA zugegeben werden. Im Zuge dieser letzten Medienanpassung wurde auch das Cystein aus dem Medium entfernt, da eine Vorabreduktion des Mediums nicht mehr erforderlich war. Danach mussten keine Korrekturen der Medienzusammensetzung mehr durchgeführt werden, sodass diese finale Zusammensetzung auch jener in Tabelle 5 entspricht.

#### 6.2.4 Leistungssteigerung im Fermenter 3

Der Erfolg des Aufwands, der in die Entwicklung des synthetischen Fermentationsmediums investiert werden musste, kann aus Abbildung 14 entnommen werden. Die abgebildeten Daten beginnen am Fermentationstag 200, also 200 Tage nachdem mit der kontinuierlichen Substratzugabe im Anschluss an die im Abschnitt 6.2.3 beschriebene Versäuerung begonnen wurde. Die Fermenter wurden also bereits erfolgreich rund 1 Jahr mit dem noch nicht finalisierten synthetischen Fermentermedium betrieben, als nach 241 Tagen die Spurenelementkonzentration und nach 385 Tagen die Konzentration

von Cellulose, Kalium, Calcium, Magnesium, Harnstoff und Eisen angepasst wurde. Diese Anpassung der Cellulosekonzentration war erforderlich, da nach der durchgeführten ersten Serie an Elicitortests im Fermenter 3 versucht wurde, das Limit des entwickelten synthetischen Fermentationsmediums zu ermitteln. Dazu wurde ausgehend von einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , bei welcher auch bis Tag 288 die Elicitortests durchgeführt wurden, zunächst die tägliche Zugabemenge und der Cellulosegehalt im Medium erhöht, bis dieser bei  $83,3 \text{ g l}^{-1}$ , bedingt durch die zunehmende Viskosität der Suspension des Mediums in der Vorlageflasche, nicht weiter gesteigert werden konnte. Als dann auch eine tägliche Zugabemenge bei einem Volumen von 120 ml Medium aufgrund des unverhältnismäßigen Arbeitsaufwands nicht mehr erhöht wurde, erfolgte die weitere Steigerung der Raumbelastung bei gleichzeitiger Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit durch die Reduktion des Fermentervolumens. Nach diesem Vorgehen konnte nach 444 Tagen des kontinuierlichen Betriebs bei einem Arbeitsvolumen von 1150 ml und einer täglichen Medienzugabe von 120 ml eine OLR von  $8,3 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei einer HRT von 9,6 d erreicht werden. Dieser Prozessbedingungen konnten für 69 Tagen beibehalten werden, was 7 hydraulischen Verweilzeiten entsprach, währenddessen eine stabile Biogasproduktion festgestellt werden konnte und auch die Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren sowie die Restsubstratkonzentration auf moderatem Niveau verblieben. Anschließend an diese Phase des stabilen Betriebs wurde versucht, die Raumbelastung noch weiter zu steigern. Aus technischen Gründen konnte das Fermentervolumen nicht weiter reduziert werden, sodass die täglich zugegebene Feedmenge schrittweise auf 180 ml erhöht und somit 549 d nach Fermentationsstart eine maximale Raumbelastung von  $12,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei einer hydraulischen Verweilzeit von 6,4 d erreicht wurde. Schon vor dem Realisieren der maximalen Raumbelastung wurde festgestellt, dass sich die Restsubstratkonzentration deutlich erhöht und das täglich produzierte Biogasvolumen nicht die bei vollständigem Abbau erwarteten 10,1 NI erreicht. Im Gegensatz dazu konnten bei der zuvor eingestellten OLR von  $8,3 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  die bei 100 %iger Umwandlung erreichbaren 7,1 NI auch annähernd gemessen werden. Darüber hinaus kann aus dem in Abbildung 14 zusammengefassten Fermentationsverlauf entnommen werden, dass die organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure in den ersten Tagen bei einer Raumbelastung von  $12,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  noch auf geringen Konzentrationen verblieben, sich aber nach 560 d der Fermentation ein sprunghafter Anstieg der Essigsäurekonzentration auf über  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  ereignete. In diesem kritischen Zustand verblieb das System 20 d, als dann ein plötzlicher Anstieg der Propionsäurekonzentration auf  $4500 \text{ mg l}^{-1}$  bei gleichzeitigem Erliegen der Biogasproduktion eine Versäuerung des Prozesses bedeutete und einen umgehenden Stopp der Substratzufuhr notwendig machte.

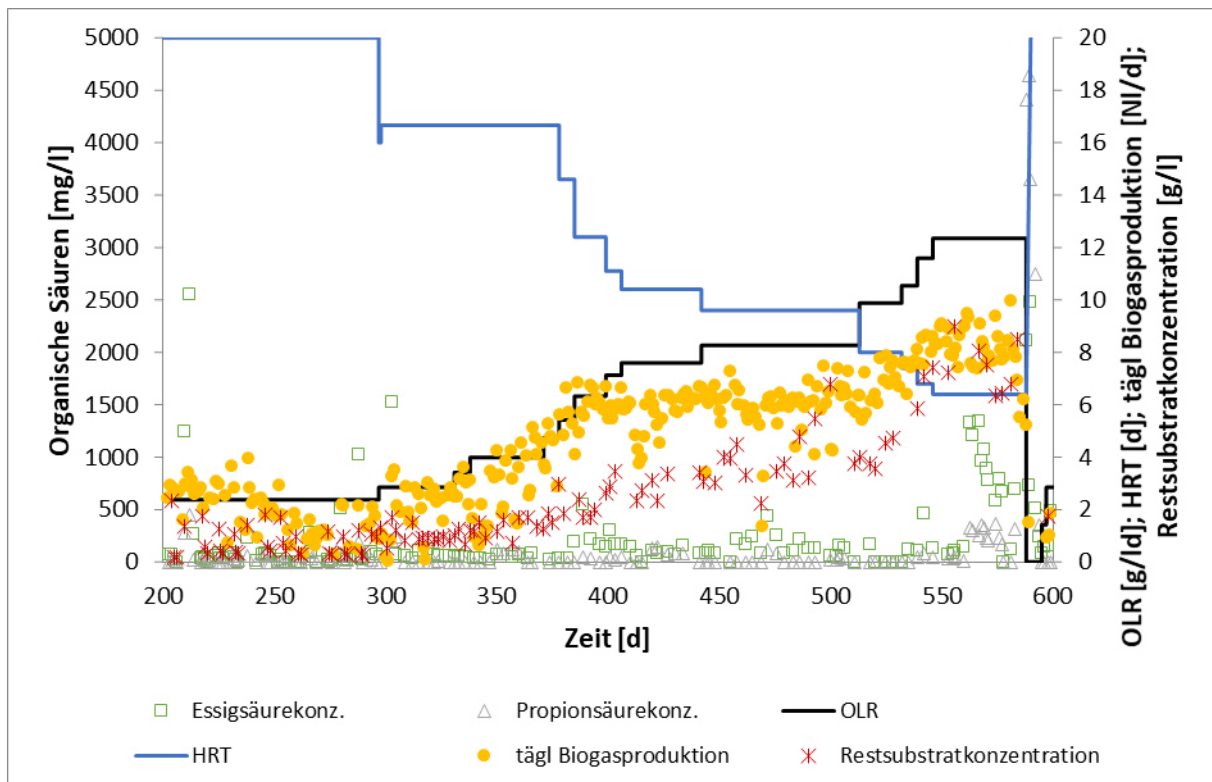


Abbildung 14: Ganglinien der erfolgreichen Leistungssteigerung im Fermenter 3. Es konnten zwischen Tag 445 und 513 7 Verweilzeiten bei einer Raumbelastung von  $8,3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer hydraulischen Verweilzeit von  $9,6 \text{ d}$  realisiert werden. Bei einer OLR von  $12,7 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer HRT von  $6,4 \text{ d}$  führte die Belastung zum Versäuern des Fermenters.

Im Anschluss musste Fermenterablauf aus den Fermentern 1 und 2, in welchen zu diesem Zeitpunkt Experimente zur Celluloseabbaukinetik durchgeführt wurden, zugegeben werden, um den Fermentationsprozess fortführen zu können. Der Verlauf der weitergeführten Fermentation ist in Abbildung 15 dargestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass die vor dem Versäuern erreichte Raumbelastung  $8,3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  nicht mehr erreicht werden konnte. Weder in den Versuchen in den Fermentationstagen 590 bis 645, wo versucht wurde, die Raumbelastung rasch wieder zu erhöhen und auch nicht in dem darauffolgenden Versuch, wo die Substratzufuhr nach langsamer Steigerung am Tag 720 aufgrund der Konzentration an flüchtigen Fettsäuren unterbrochen werden musste. Am vielversprechendsten war hier noch der letzte Versuch, die Raumbelastung wieder auf das bereits erreichte Niveau anzuheben, welcher in den Tagen 745 bis 840 durchgeführt wurde. In diesem Versuch wurde zusätzlich zum zudosierten Flüssigmedium ab dem Tag 827 noch täglich eine Zugabe von  $2,63 \text{ g}$  Cellulose als Feststoff vorgenommen. Durch diese Maßnahme konnte die OLR auf  $7,1 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  gesteigert werden, ohne durch Erhöhen des Medienvolumens die HRT weiter zu verkürzen und diese somit bei  $15 \text{ d}$  zu halten. Leider zeigte sich auch bei diesem Versuch eine starke Zunahme der flüchtigen Fettsäuren, sodass die Substratzufuhr zum wiederholten Mal abgebrochen werden musste. Kurz darauf mussten aufgrund des Projektendes  $855 \text{ d}$  nach dem Start der Fermentation die kontinuierlichen Feeds beendet werden.

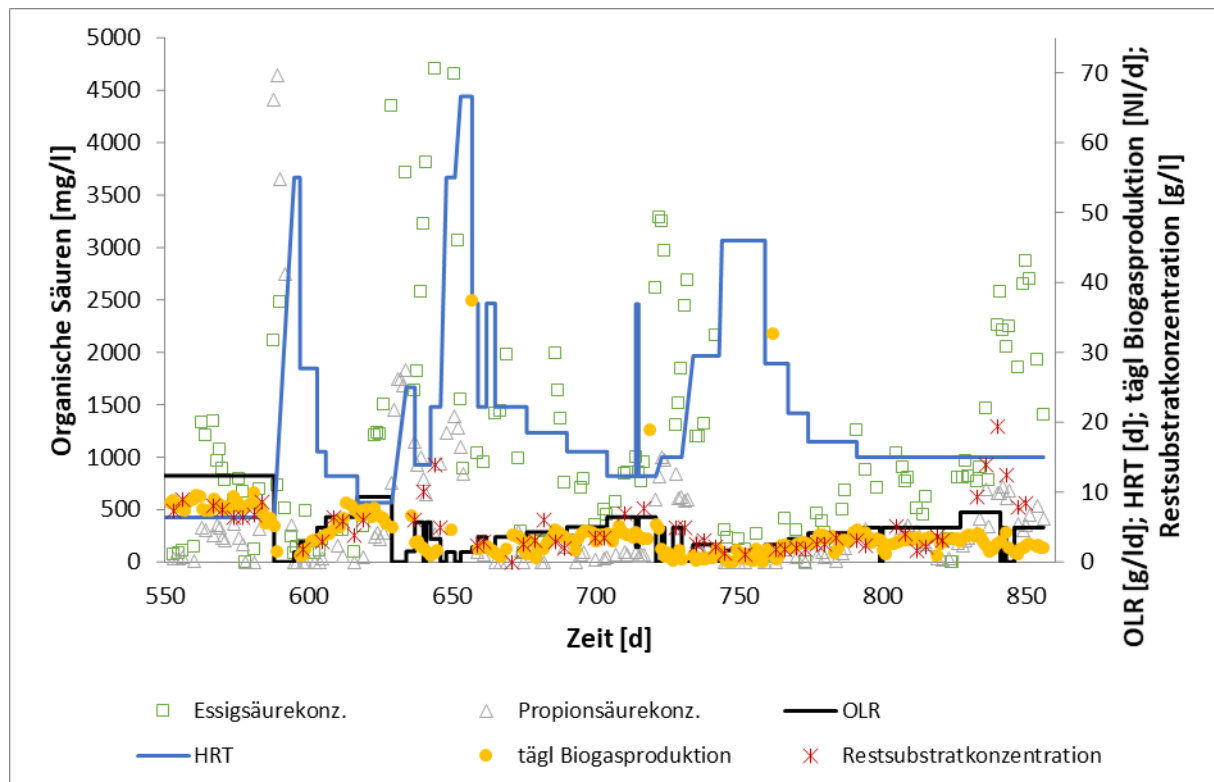


Abbildung 15: Zusammenfassung der Versuche, im Fermenter 3 nach dem Versäuern erneut ein Niveau von  $8,3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  zu erreichen, welches davor bereits realisiert werden konnte.

## 6.3 Evaluierung der Kinetikmodelle

### 6.3.1 Biogasbasiertes Modell

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Ermittlung der Kinetikexperimente über den Biogasvolumenstrom für Fermenter 1 im Zeitraum vom 22.11.2016 bis zum 21.3.2017 zusammengefasst. In diesen Zeitraum fallen die Analysen des Elicitors Glucose (Diagramme: B, C, I, J), des Elicitors Cellooligosaccharide (Diagramm E) und die davor und dazwischen durchgeführten Referenzwerte ohne Elicitorzusatz (Diagramm A, D, F, G, H). Der Fermenter wurde mit einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  betrieben und die Feedunterbrechungen für 49,5 h durchgeführt. Ohne die Abbaugeschwindigkeit genauer zu betrachten fällt auf, dass die Reduktion des Gasvolumenstroms nicht zeitgleich mit dem Unterbrechen der Substratzufuhr auftritt, sondern dass das System hier träger reagiert. Dies fällt besonders bei den Abbildungen A, B und C auf, da dort die Zeitverzögerung bis zum Eintreten einer Reduktion des Volumenstroms über 10 h beträgt. Auch bei den Abbildungen E, G, H, I und J ist eine Reaktionszeit feststellbar. Lediglich bei den Versuchen, die in den Diagrammen D und F wiedergegeben sind, fällt die Abnahme der Gasproduktion direkt mit der Unterbrechung der Substratzufuhr zusammen. Eine weitere Auffälligkeit, die bei allen Messungen auftritt, ist eine vollständige Unterbrechung des Biogasstroms gleich zu Beginn des Experiments. Dies ist bedingt durch die Probenahme, bei welcher 100 ml Volumen entnommen werden, wodurch ein Unterdruck im System entsteht. Erst wenn dieser Unterdruck durch die weitere Produktion von Biogas ausgeglichen worden ist, kann die weitere Biogasbildung detektiert werden. Dieser Effekt der Probenahme tritt auch bei späteren Probenahmen auf, da es durch die Bewegung der Fermenterbrühe zu einem Ausgasen von in der Brühe gelösten Gasen (insbesondere Kohlendioxid) kommt und im Anschluss tritt dann der bereits beschriebene reduzierte Volumenstrom auf, da die Fermenterbrühe erst wieder mit Biogas (insbesondere Kohlendioxid) gesättigt und der entstandene Unterdruck ausgeglichen werden muss. Der Effekt ist geringer, da das Probenahmenvolumen mit 40 ml deutlich kleiner war, trotzdem ist dieser Effekt besonders bei den in Abbildung 16 abgebildeten Versuchen D und F zu erkennen. Zwei Beobachtungen, die für alle durchgeführten Analysen des Volumenstroms gültig sind, sind 1.) der

Anfangswert von ca.  $2 \text{ Nml min}^{-1}$  und 2.) eine große Schwankungsbreite der Messwerte, obwohl die Erfassung in Intervallen von 15 min erfolgte, um kurzzeitige Abweichungen abzumildern. Dass dennoch große Schwankungen im Volumenstrom zu beobachten sind, liegt an der Messmethode selbst, da die in der Fermentationsanlage BTP3 verwendeten Milligascounter nach dem Prinzip der Verdrängungsmessung wirken und pro Zyklus immer genau 3,13 ml erfasst werden. Somit liegt auch das minimale Auflösungsvermögen bei 3,13 ml und es ist nur eine diskrete Erfassung des Volumensstroms möglich. Ein einziger Messauschlag des Milligascounters beeinflusst folglich den Biogasvolumensstrom um  $\pm 0,21 \text{ Nml min}^{-1}$ .

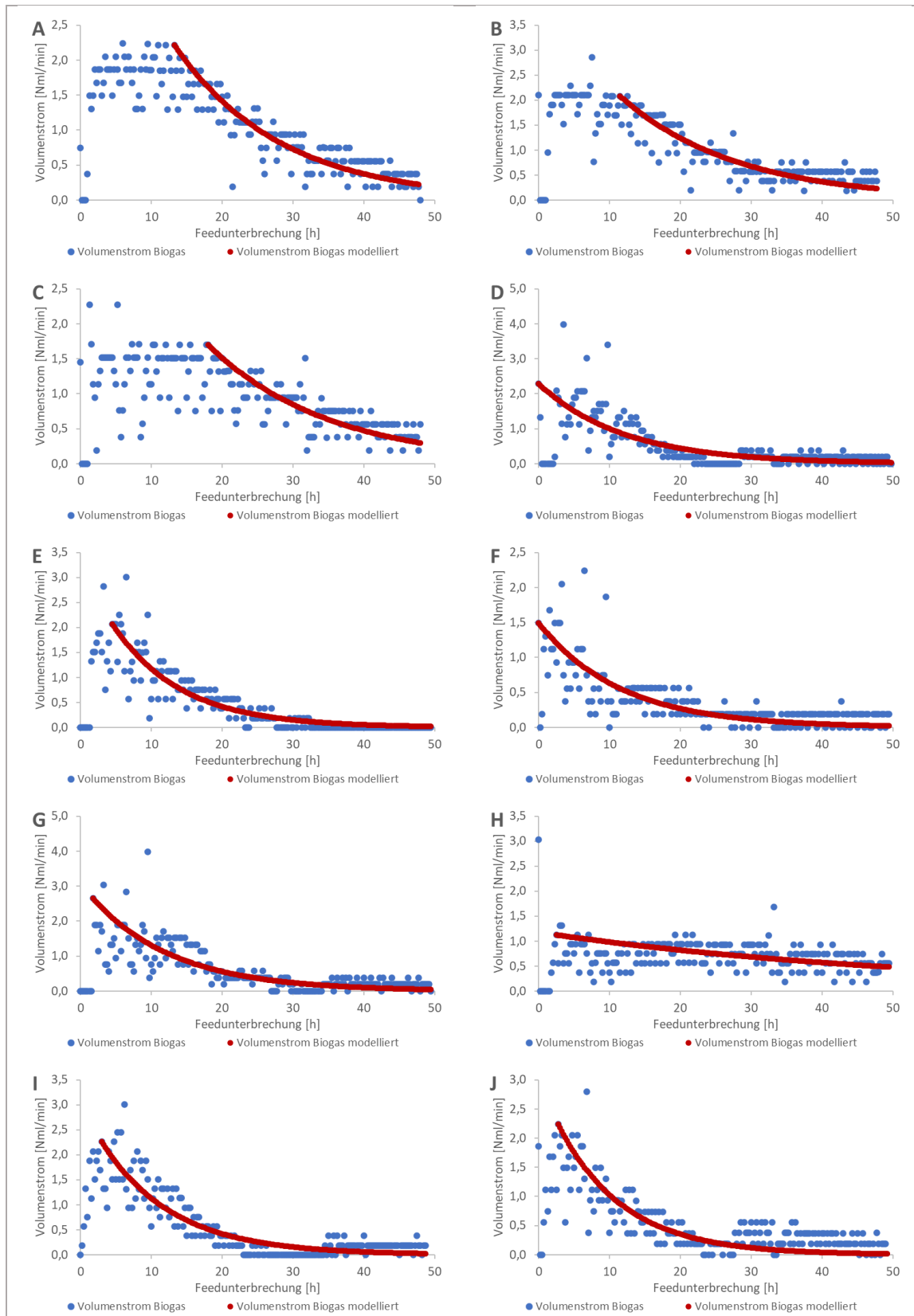


Abbildung 16: Elicitortests basierend auf der Biogasproduktion. Alle auswertbaren Versuche basieren auf der Abnahme der Biogasproduktion im Fermenter 1 im Zeitraum vom 22.11.2016 bis zum 21.03.2017 bei einer OLR von  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die getesteten Elicitoren waren Glucose (Diagramme B, C, I, J), Cellooligosaccharide (Diagramm E) und die dazugehörigen Referenzwerte (Diagramm A, D, F, G, H). Die Feedunterbrechungen von A-J sind in chronologischer Reihenfolge wiedergegeben und der jeweilige Experimentbeginn erfolgte an nachstehenden Fermentationstagen: A (113); B(120); C(134); D(169); E(176); F(190); G(197); H(204); I(225); J(232)

### 6.3.2 Restsubstratbasierte Modelle

Als Alternative zu den auf Gasdaten basierenden Modellen wurden substratbasierte herangezogen, wie sie in Abschnitt 2.4 präsentiert sind. Die Rohdaten dazu wurden mit dem in Abschnitt 5.6.1 beschriebenen System der Feedunterbrechungen bei gleichzeitigem Monitoring der Abnahme der Substratkonzentration gewonnen. Die erste Versuchsreihe zur Ermittlung der Substratabbaugeschwindigkeit wurde über eine Periode von 49,5 h durchgeführt und schnell wurde aus diesen Ergebnissen klar, dass ein Großteil der Substratabnahme bereits in den ersten 12 h nach der Feedunterbrechung auftrat, und dieser Zeitraum somit genauerer Analyse bedarf. Folglich wurde in der darauffolgenden Versuchsreihe die Versuchsdauer auf 26 h verkürzt und das Probenahmeintervall zu Versuchsbeginn verdichtet. Um nun die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen besser vergleichbar zu halten und um auszuschließen, dass später gezogene Proben einen Einfluss auf das Ergebnis haben, wurden nur Restsubstratkonzentrationen bis 30 h nach dem Unterbrechen der Substratzufuhr für die Ermittlung der Abbaugeschwindigkeit verwendet.

Die Auswirkung dieser Entscheidung ist in einer Kinetikermittlung eines Referenzwertes in Fermenter 3, welche in Abbildung 17 dargestellt ist, zusammengefasst. Hier werden die Anpassung des Modells für 1. und 2. Ordnung über einen Zeitraum von 49,5 h und 30 h wiedergegeben. Es fällt auf, dass der Substratabbau gegen Ende des Feedstopps nicht mehr einer Reaktion 1. oder 2. Ordnung folgt. Auch kann aus den angegebenen Modellfehlern abgelesen werden, dass sich der RMSE beider Modelle bei Verwenden des kürzeren Beobachtungszeitraums um mehr als 40 % reduziert und sich der MRD sogar mehr als halbiert. Bei Betrachtung aller durchgeführten Kinetikermittlungen lässt sich berechnen, dass durch ausschließliches Verwenden der bis 30 h nach Unterbrechung der Substratzufuhr gezogenen Proben, der Fehler, für die Anpassung des Modells an die gemessenen Konzentrationen, reduziert werden kann. Für den RMSE beträgt die Reduktion ein Viertel und für den MRD sogar über ein Drittel. Das bedeutet folglich, dass die Näherung des Modells an die gemessenen Daten mit fortschreitender Versuchsdauer und sinkender Substratkonzentration abnimmt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass ein Teil des Substrats unter den Bedingungen im Fermenter nicht abgebaut werden kann. Diese Möglichkeit wird im folgenden Kapitel überprüft.

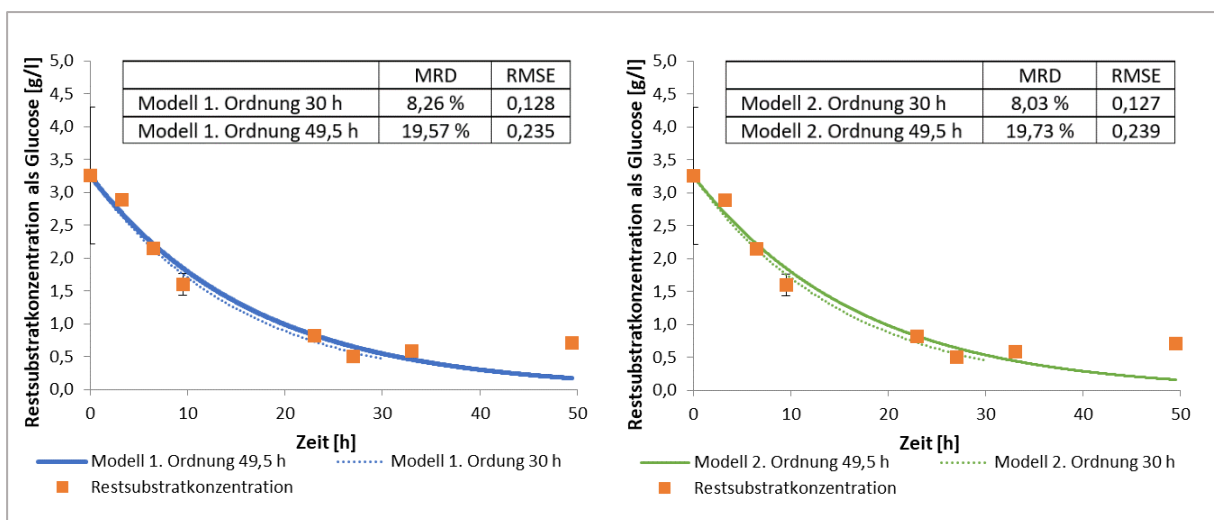


Abbildung 17: Vergleich der Feedunterbrechung für 30 h und 49,5 h, anhand der Anpassung eines Modells 1. und eines Modells 2. Ordnung an die ermittelte Substratabnahme bei Unterbrechen des Substratfeeds im Fermenter 3 bei  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  ohne Zugabe eines Elicitors. Für beide Modelle ist ein Vergleich der Berechnung über 49,5 h und über 30 h dargestellt, wobei die Berechnung über 30 h jeweils deutlich geringere Werte für die berechneten Fehler MRD und RMSE ergibt.

### 6.3.3 Modell 1. Ordnung, berechnet mit einem nicht abbaubaren Substratanteil

Nachdem die Dauer der Unterbrechung der Substratzufuhr geklärt war, war der nächste Schritt das in Gleichung [4] vorgestellte Modell 1. Ordnung mit der Anpassung an unvollständigen Substratabbau

anzuwenden, um abzuklären, ob von nicht abbaubaren Bestandteilen im Substrat auszugehen ist. Die ermittelten  $\beta$ -Werte aus dem Modell für alle durchgeführten Kinetikermittlungen sind dabei nach ihrem Betrag geordnet in Abbildung 18 wiedergegeben. In dieser Abbildung beschreiben die  $\beta$ -Werte den Anteil im Substrat, welcher laut Modell nicht abgebaut werden kann. So ist beispielsweise aus der Tatsache, dass für  $\beta > 0,3$  kaum Werte ermittelt wurden abzuleiten, dass bei allen durchgeführten Kinetikermittlungen im Zuge der Modellanpassung seltenst ein nichtabbaubarer Substratanteil von über 30 % verwendet wird. Im Gegensatz dazu ergab ein Wert von  $\beta = 0$ , also eine 100 %ige Abbaubarkeit des Substrats, am häufigsten die beste Erklärung für die im Zuge der im Experiment ermittelten Daten. Darauf folgte mit nur knappem Abstand ein  $\beta$ -Wert von 0,1 – 0,2. Ein nicht abbaubarer Substratanteil von 0 – 5 %, 5 – 10 % und 20 – 30 % lieferte nur bei circa halb so vielen Experimenten die beste Erklärung für den Substratabbau, verglichen mit einem vollständig abbaubaren Substrat. Auch wenn die Anteile von 0 – 5 % und 5 – 10 % zusammengefasst werden, wird die Anzahl der Experimente mit  $\beta = 0$  nicht erreicht.

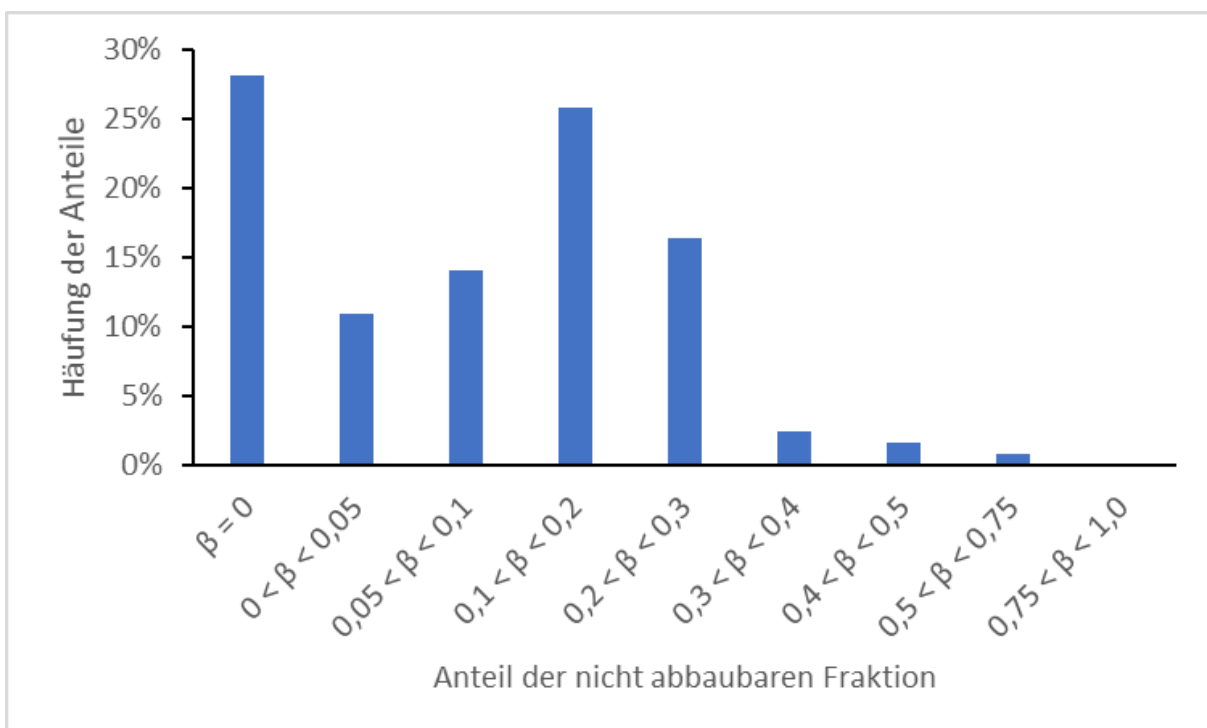


Abbildung 18: Überblick über die nach Gleichung [4] ermittelten  $\beta$ -Werte aller durchgeführten Kinetikermittlungen mit einer OLR von 2,4 und 4,8  $\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Bei den Modellen mit OLR = 2,4  $\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  wurde die verkürzte Versuchszeit von 30 h herangezogen. Den größten Anteil nehmen dabei Kinetikermittlungen mit  $\beta=0$  ein, also mit einem nach Modellierung vollständig abbaubaren Substrat.

Aus der Anwendung des Modells 1. Ordnung mit der Anpassung an den unvollständigen Substratabbau lässt sich keine eindeutige Aussage über einen genauen Anteil an nicht abbaubaren Substrat treffen. Obwohl für 2/3 aller Experimente ein  $\beta$ -Wert größer als Null ermittelt wurde, kann ein genauer Anteil nicht berechnet werden. Die Charge des Substrats wurde 1-mal gewechselt, wobei die berechneten  $\beta$ -Werte bei Charge 2 einen höheren Anteil an vollständig abbaubarem Substrat anzeigen. Die grundsätzliche Beobachtung eines uneinheitlichen Bilds bezüglich des nicht abbaubaren Anteils bleibt jedoch bei beiden Chargen bestehen (Daten nicht gezeigt). Folglich ist ein nicht abbaubarer Anteil im Substrat möglich, kann aber nicht quantifiziert werden. Darüber hinaus lässt ein vollständiger Substratabbau am häufigsten die beste Anpassung des Modells an die gemessenen Daten zu.

#### 6.3.4 Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung

Für die Modelle 1. und 2. Ordnung zeigen sich im direkten Vergleich in der Anpassung an die ermittelte Abnahme der Restsubstratkonzentration nur geringe Unterschiede. So ist im abgebildeten Beispiel in



Abbildung 19 mit bloßem Auge kein Unterschied der beiden Modelle auszumachen. Erst bei Betrachtung der berechneten Fehlerwerte zeigen sich in diesem Versuch geringfügig kleinere Fehlerwerte für das Modell 2. Ordnung.

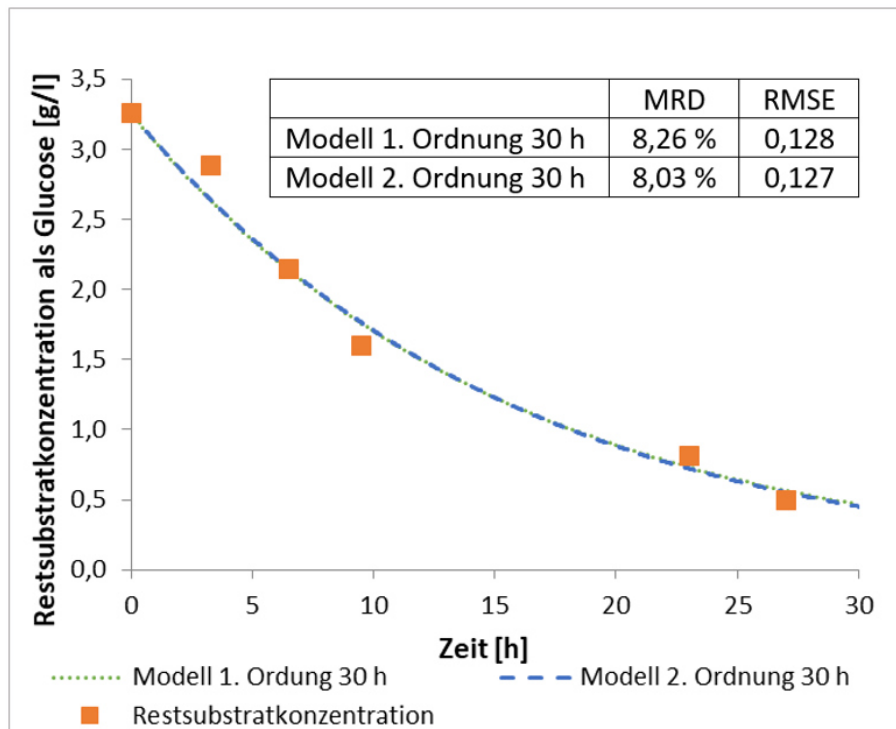


Abbildung 19: Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung anhand der Anpassung eines Modells 1. und eines Modells 2. Ordnung an die ermittelte Substratabnahme bei Unterbrechen des Substratfeeds im Fermenter 3 bei  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  ohne Zugabe eines Elicitors. Anhand der berechneten Fehlerwerte MRD und RMSE sowie am Kurvenverlauf, kann festgestellt werden, dass sich die Modelle nur geringfügig unterscheiden.

Um den Vergleich der beiden Modelle nicht nur anhand von einzelnen Versuchen wie in Abbildung 19 darstellen zu müssen, wurden Mittelwerte der Modellfehler über alle pro Fermenter durchgeführten Kinetikermittlungen berechnet. Auch hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede. Im Fermenter 1 betragen der mittlere MRD für die Modelle 1. Ordnung 9,4 % und der RMSE 0,100, wobei die Fehler für die Modelle 2. Ordnung bei einem MRD von 9,5 % und einem RMSE von 0,101 auf gleichem Niveau lagen. Auch im Fermenter 2 zeigt sich das gleiche Bild, denn hier wies der mittlere Fehler für ein Modell 1. Ordnung einen MRD von 10,4 % auf, welcher sich vom MRD des Modells 2. Ordnung mit 10,6 % nur minimal unterschied. Der RMSE wies für beide Modelle den gleichen Wert von 0,101 auf. Dasselbe Phänomen des identen mittleren Fehlerwerts für den RMSE trat auch im Fermenter 3 auf, denn hier konnte für beide Modelle ein Wert von 0,103 ermittelt werden, lediglich in der Berechnung des MRD zeigten sich minimale Unterschiede mit einem Wert von 11,1 % für das Modell 1. Ordnung gegenüber einem MRD von 11,2 % für das Modell 2. Ordnung. Somit kann aus den berechneten Fehlerwerten geschlussfolgert werden, dass qualitativ kein Unterschied zwischen den Modellen 1. und 2. Ordnung festgestellt werden kann.

## 6.4 Veränderung der Celluloseabbaugeschwindigkeit

### 6.4.1 Entwicklung der Celluloseabbaugeschwindigkeit im Fermenter

Wird die von Elicitoren nicht beeinflusste Hydrolysegeschwindigkeit im Fermenter betrachtet, so zeigt sich dabei in allen Messungen ein signifikant höherer Wert als bei den in der Literatur bekannten Werten.

Alle ermittelten  $k$ -Werte ohne Elicitoren im Fermenter 1 und Fermenter 2 sind in der Tabelle 21 zusammengefasst und nach dem Fermenterstatus zum Zeitpunkt der Analyse chronologisch geordnet. Die dort zusammengefassten  $k$ -Werte 1. Ordnung sind um mehr als 10-fach höher als aus der Literatur bekannte Daten, welche aus Batchtests bestimmt wurden (Gujer und Zehnder, 1983; Liebetrau et al., 2004). Da in der Fachliteratur keine besser vergleichbaren  $k$ -Werte verfügbar sind, welche ebenfalls aus dem Monitoring der Abnahme der Substratkonzentration bei Unterbrechen der Substratzufuhr berechnet wurden, wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit der Analysenmethoden und damit auch der Einordnung der  $k$ -Werte zu ermöglichen, die Abbaugeschwindigkeit auch als Batchtest ermittelt (Abschnitt 5.2). Diese Daten sind in Tabelle 22 mitsamt den zum Vergleich notwendigen Literaturdaten zusammengefasst. Die erste Ermittlung der  $k$ -Werte erfolgte dabei genau nach VDI-Vorgaben (VDI-Richtlinie 4630). Aus diesen Daten geht hervor, dass das verwendete Fermenterinokulum eine Abbaugeschwindigkeit von Cellulose im Bereich der Literaturwerte zulässt und die Abbaugeschwindigkeit mit ausgegorenem Fermenterablauf als Inokulum um 50% höher liegt. Allerdings konnte bei der Analyse des Ansatzes mit ausgegorenem Fermenterablauf eine Lagphase zu Beginn beobachtet werden. Bei Durchführung einer Kinetikermittlung mit frischem anstatt ausgegorenem Inokulum trat diese Lagphase in einem geringeren Ausmaß auf (Abbildung 20). Darüber hinaus war dieser ermittelte  $k$ -Wert mit  $0,505 \pm 0,002 \text{ d}^{-1}$  ebenfalls höher als mit ausgegorenem Fermenterablauf als Inokulum ( $0,18 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ ), was zeigt, wie wichtig eine standardisierte Testmethode mit vergleichbarem Inokulum ist.

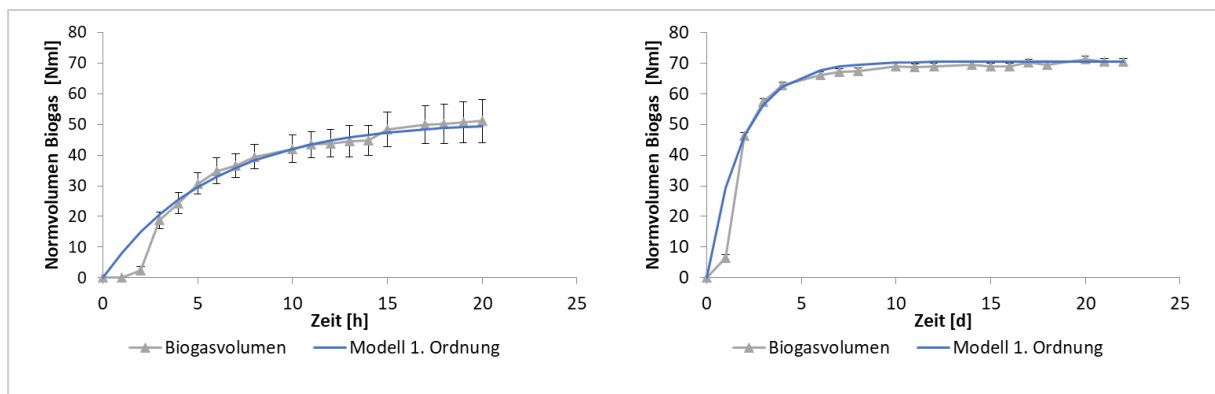


Abbildung 20: Vergleich des Verlaufs der  $k$ -Wert Ermittlung im Kolbenprober mit ausgegorenem Fermenterablauf (links) und nicht ausgegorenem Fermenterablauf (rechts) als Inokulum. Das Ausgären wurde über 4 Tage bei  $44^\circ\text{C}$  durchgeführt, was beim Vergleichsansatz nicht erfolgte.

Werden nur die Abbaukinetiken in den Fermentern betrachtet, so liefern in beiden Fällen im Fermenter 1 und Fermenter 2 die zuerst durchgeführten Analysen, wenn auch mit einer hohen Messunsicherheit belastet, die jeweils niedrigsten Werte. In der nächsten Ermittlung der Abbaugeschwindigkeit von Cellulose, welche nur im Fermenter 1 durchgeführt wurde, zeigte sich bereits eine deutliche Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit. Als dann im weiteren Verlauf der Ermittlung des Einflusses der Elicitoren die Raumbelastung der Fermenter erhöht wurde, zeigten sich Abbaugeschwindigkeiten auf ähnlichem Niveau wie die letzte Ermittlung in Fermenter 1 bei einer OLR von  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die Abbaugeschwindigkeit verblieb im Folgenden im Fermenter 1 bei einem  $k$ -Wert von ungefähr  $1,6 \text{ d}^{-1}$ . Im Fermenter 2 zeigte sich eine höhere Schwankung der  $k$ -Werte, was die Wichtigkeit von regelmäßigen Kontrollen hervorhebt. Trotzdem sticht der Referenzwert vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von  $4,8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und HRT von  $16,7 \text{ d}$  deutlich heraus und wies einen fast doppelt so hohen  $k$ -Wert wie die folgenden Messungen auf (Tabelle 21).

Tabelle 21: Überblick über die im Fermenter ermittelten Reaktionskonstanten 1. Ordnung unterschiedlicher Ermittlungsserien, bei Unterbrechen des Substratfeeds. Die Daten sind in chronologischer Reihenfolge gelistet.

Kontinuierlicher Fermenterbetrieb	Fermenter 1 k-Werte [ $d^{-1}$ ]	Fermenter 2 k-Werte [ $d^{-1}$ ]
Referenzwert vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$	0,98 +/- 0,48	1,45 +/- 0,54
Referenzwert nach den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$	1,68 +/- 0,19	
Referenzwert vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$	1,49 +/- 0,19	3,19 +/- 0,63
Referenzwert während der Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$	1,57 +/- 0,10	1,82 +/- 0,19
Referenzwert während der Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$	1,64 +/- 0,17	1,69 +/- 0,62

Tabelle 22: Überblick über die batchweise ermittelten Reaktionskonstanten aus den Versuchen im Kolbenprober, im Vergleich zu Literaturdaten

Batchtests	k-Werte [ $d^{-1}$ ]	Quelle
Batchtests mit ausgegorenem Fermenterablauf	0,18 +/- 0,02	Diese Arbeit
Batchtests mit Fermenterablauf ohne Ausgären	0,505 +/- 0,002	Diese Arbeit
Batchtests mit Fermenterinokula	0,12 +/- 0,01	Diese Arbeit
Literaturdaten (Batch)	0,066	(Liebetau et al., 2004)
Literaturdaten (Batch)	0,04-0,13	(Gujer und Zehnder, 1983)

#### 6.4.2 Einfluss der Elicitoren auf die Celluloseabbaugeschwindigkeit

Die Effekte der vermuteten Elicitormoleküle auf die Celluloseabbaugeschwindigkeit wurden durch Anwendung der unter Abschnitt 5.6.2 beschriebenen Methode der Unterbrechung des Substratfeeds analysiert. Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe, welche bei einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ gl}^{-1}d^{-1}$  und einer hydraulischen Verweilzeit von 20 d durchgeführt wurde, sind in Abbildung 21 wiedergegeben. Von den getesteten Elicitoren zeigte die selbst hergestellte Mischung aus Cellooligosacchariden einen positiven Trend im Vergleich zum Referenzwert und zu dem Vergleichswert mit Cellobiose. Besonders ist dabei die Celluloseabbaugeschwindigkeit bei einer Cellooligosaccharidkonzentration von  $10 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose hervorzuheben, welche den höchsten Wert über alle Fermenter erreicht. Aufgrund der großen Messunsicherheit kann hier trotzdem keine eindeutige Aussage getroffen werden. Bei Glucose als Elicitor ist ebenfalls ein leicht positiver Trend abzusehen, was aber auch am, verglichen mit den anderen Fermentern, geringen Referenzwert liegt. Bei Xylan als Elicitor lässt sich mit k-Werten für alle 3 Konzentrationsstufen von  $1,2 \text{ d}^{-1}$  bis  $1,5 \text{ d}^{-1}$  keine Verbesserung, sondern eher eine Beeinträchtigung des Celluloseabbaus feststellen.

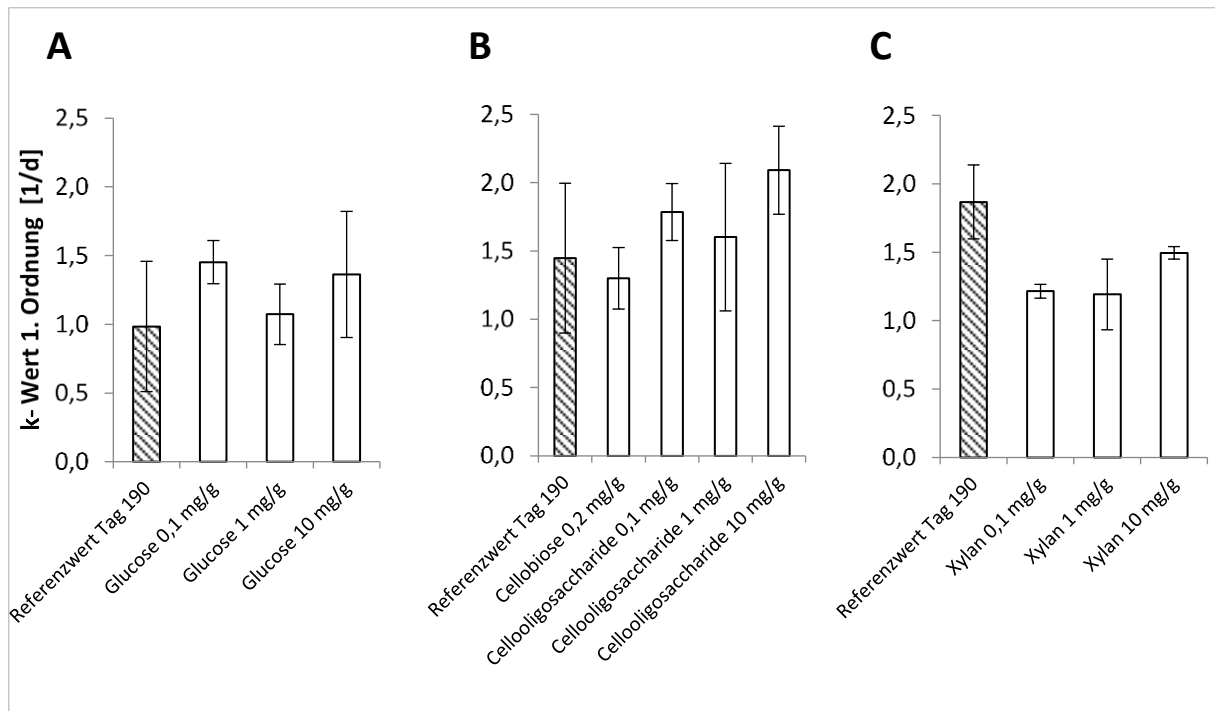


Abbildung 21: Ermittlung der Reaktionskonstanten  $k$  des Celluloseabbaus nach dem Modell 1. Ordnung für eine Versuchsreihe mit getesteten Elicitoren (Referenzwert: Versuche ohne Elicitorzusatz) bei einer OLR von  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer HRT von 20 Tagen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf mg Elicitor pro g Cellulose. Es wurden 3-fach Bestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerindikator angegeben. Die Durchführung erfolgte zeitlich parallel in Fermenter 1 (A), Fermenter 2 (B) und Fermenter 3 (C).

Im weiteren Verlauf der Elicitortests wurde die Raumbelastung auf  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  erhöht und die hydraulische Verweilzeit gleichzeitig auf 16,7 d verkürzt, um anschließend eine weitere Testserie durchzuführen. Dies wurde jedoch nicht im Fermenter 3 durchgeführt, da hier stattdessen die Grenzen des Fermentationssystems ausgelotet wurden.

Die Ergebnisse für Fermenter 1 und 2 sind in Abbildung 22 zusammengefasst. Erneut zeigte die hergestellte Cellooligoascharidmischung (Abschnitt 5.7.1) im Fermenter 1 gleich zu Beginn eine Tendenz, den Celluloseabbau zu verbessern, da in den Konzentrationen  $0,06$  und  $0,6 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose ein höherer  $k$ -Wert als im Referenzwert beobachtet wurde, wenn auch innerhalb der Fehlertoleranz. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch mit der Cellooligosaccharidmischung bei einer Konzentration von  $0,6 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose direkt nach Referenzwert 4 reproduziert werden, als erneut eine Erhöhung des  $k$ -Werts innerhalb der Fehlertoleranz ermittelt wurde. Nicht konsistent in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass bei einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  sowohl bei einer Cellooligosaccharidkonzentration von  $0,1 \text{ mgg}^{-1}$  als auch bei  $10 \text{ mgg}^{-1}$  eine positive Tendenz erkennbar war, während dies bei einer Raumbelastung von  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  nur bei den geringeren Konzentrationen wiederholt werden konnte.

Außerdem wurde im Fermenter 1 der Effekt der Zugabe von Fructose und Lichenan getestet, wobei bei Fructose in der Konzentration von  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose ein leicht erhöhter  $k$ -Wert festgestellt werden konnte, welcher sich allerdings nicht reproduzieren ließ. Lichenan zeigte keinen positiven Effekt.

Bei den Tests in Analysen des Einflusses der Elicitoren auf die Hydrolysegeschwindigkeit im Fermenter 2 (Abbildung 22 B) fällt als erstes der hohe Referenzwert an Tag 386 auf. Im Vergleich dazu zeigt Xylose als Elicitor eine deutliche Verringerung der Celluloseabbaugeschwindigkeit, während bei Sorbitol in der Konzentrationsstufe  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose einen leicht positiven Effekt zeigte. Der Effekt ergibt sich aus dem Vergleich mit dem Referenzwert von Tag 540, welcher zeitlich am nächsten zum

Einsatz von Sorbitol lag. Aus Zeitgründen konnte der Einsatz von Sorbitol allerdings nicht reproduziert werden. Bei Chitosan wurde in keiner Konzentrationsstufe ein positiver Effekt auf den Celluloseabbau beobachtet.

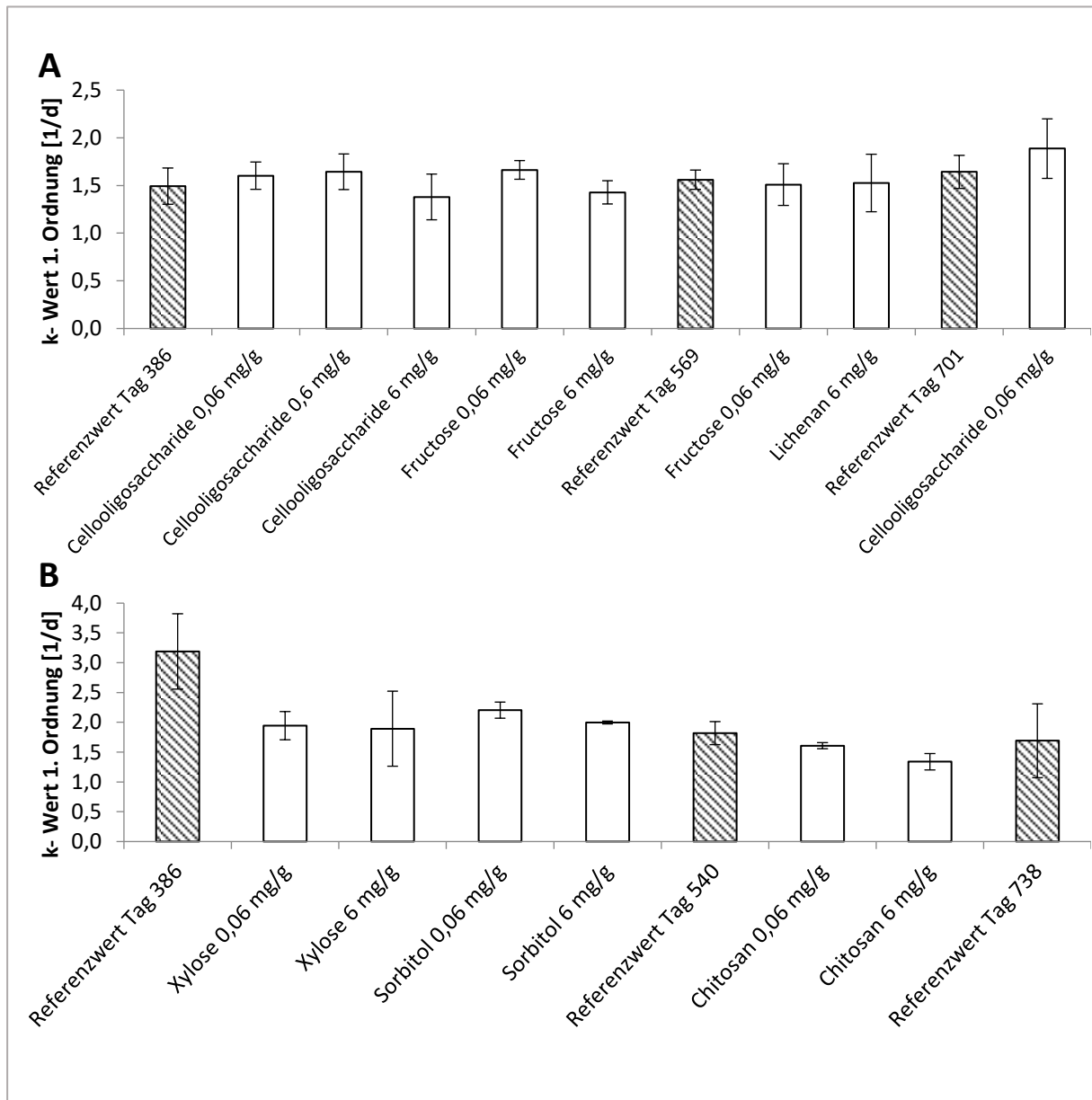


Abbildung 22: Ermittlung der Reaktionskonstanten  $k$  des Celluloseabbaus im Fermenter 1 (A) und 2 (B) nach dem Modell 1. Ordnung für eine Versuchsreihe mit getesteten Elicitoren (Referenzwert: Versuche ohne Elicitorenzusatz) bei einer OLR von  $4,8 \text{ g}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer HRT von 16,7 Tagen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf mg Elicitor pro g Cellulose. Es wurden bei Fructose  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$ , Cellooligosaccharide  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  (nach Referenzwert an Tag 701), Sorbitol und dem Referenzwert von Tag 738 4-fach und ansonsten 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung ist als Fehlerindikator angegeben.

Im Anschluss an die natürlichen Elicitoren wurden aufbauend auf den erzielten Ergebnissen chlorierte Cellooligosaccharide getestet, welche wie unter Abschnitt 5.7.3 beschrieben in höher chlorierter Form (Chlorgehalt = 12,12 % -high) und in niedrig chlorierter Form (Chlorgehalt = 7,25 % -low) eingesetzt wurden. Aus den in Abbildung 23 zusammengefassten Ergebnissen dieser Versuche wird ersichtlich, dass der positive Effekt des nicht chlorierten Cellooligosaccharidmixes für die Chlorierungsprodukte nicht beobachtet werden konnte. Während im Fermenter 1, der mit dem höher chlorierten Produkt beschickt wurde, die Reaktionskonstanten insgesamt auf dem Niveau des Blanks verblieben, konnte im Fermenter 2 bei der höchsten getesteten Konzentrationsstufe von  $0,6 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose für das

niedriger chlorierte Produkt sogar ein Rückgang der Abbaugeschwindigkeit von Cellulose beobachtet werden.

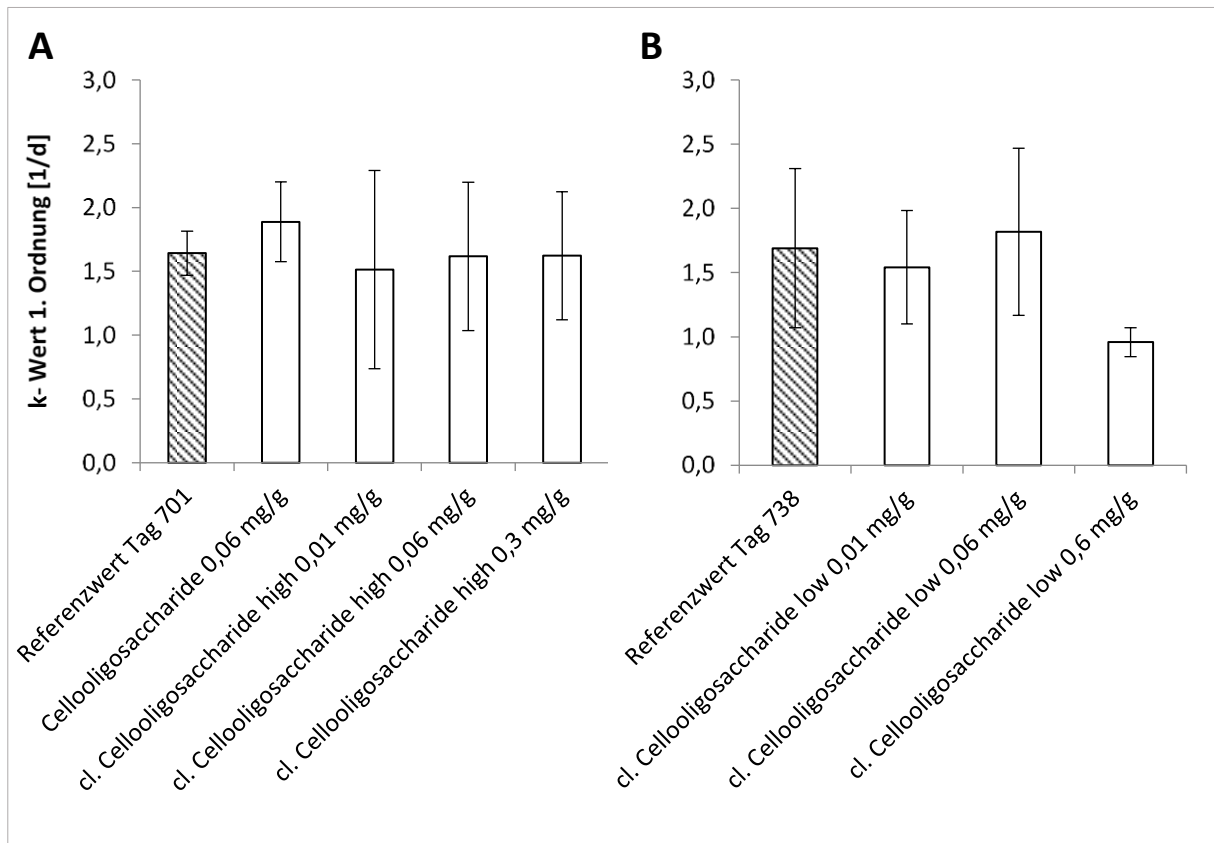


Abbildung 23: Ermittlung der Reaktionskonstanten des Celluloseabbaus im Fermenter 1 (A) und 2 (B) nach dem Modell 1. Ordnung für eine Versuchsreihe mit chlorierten Cellulooligosacchariden in höher chlorierter Form (Chlorgehalt = 12,12 % -high) und in niedrig chlorierter Form (Chlorgehalt = 7,25 % -low) bei einer OLR von  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  und einer HRT von 16,7 Tagen (Referenzwert: Versuche ohne Elicitorzusatz). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf mg Elicitor pro g Cellulose. Es wurde beim Referenzwert vom Tag 738 eine 4-fach Bestimmung und ansonsten 3-fach Bestimmungen durchgeführt.

## 6.5 Entwicklung einer Modifikationsstrategie

### 6.5.1 Vorversuche zur Modifikationsstrategie im Batchversuch

Zur Abklärung einer möglichen Modifikation der Cellulooligosaccharide wurde ein Versuch mit Methylcellulose als Substratanalogen zu methylierten Cellulooligosacchariden, wie im Abschnitt 5.2 beschrieben, durchgeführt. Aus den in Abbildung 24 dargestellten Ergebnissen dieses Versuchs ist klar erkennbar, dass bei den Referenzansätzen (ohne Elicitorzusatz) ein Großteil der Cellulose bereits nach 4 Tagen umgesetzt war, und somit von einem vitalen Inokulum auszugehen ist. Gleichzeitig ist aber auch ersichtlich, dass schon geringere vorhandene Mengen an Methylcellulose ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) eine Hemmung bewirkten und bei höheren Konzentrationen die Produktion von Biogas fast vollständig eingestellt wurde ( $1,0 \text{ g ml}^{-1}$ ). Auch bei Verwendung von Methylcellulose als alleiniger C-Quelle war fast keine Biogasbildung zu beobachten. In den beiden letzten Fällen lag das gebildete Biogasvolumen sogar unter dem des Blindwertes (Restgasproduktion des Inokulums), weshalb die Gasvolumina im Diagramm als Negativwerte dargestellt sind.

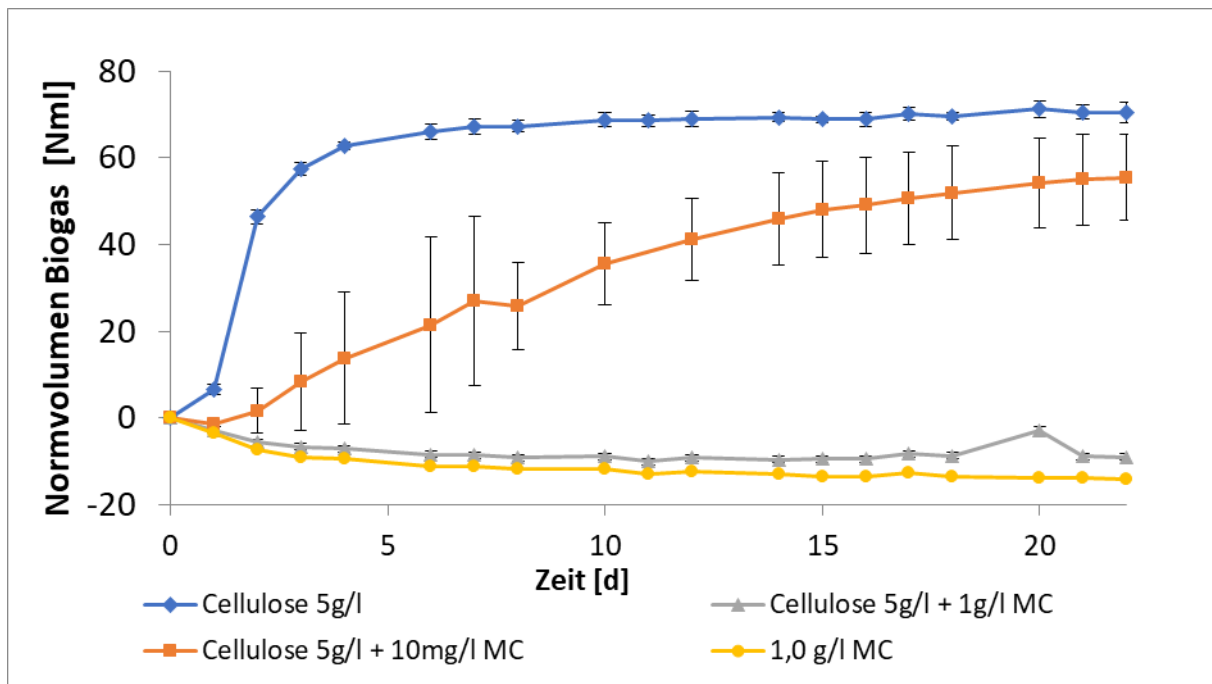


Abbildung 24: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von Methylcellulose (MC), abzüglich des Bildwerts. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Ebenfalls als Vortest zur Entwicklung einer Modifikationsstrategie wurde der Einfluss von chlorierter Cellobiose (Abschnitt 5.7.2) auf die Gasproduktion im Kolbenprober untersucht. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu den Versuchen mit Methylcellulose bei geringer Konzentration ( $0,08 \text{ g l}^{-1}$ ) keine und bei höherer Konzentration ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) nur einen geringen Abfall des Gasertrages gegenüber der Referenzprobe. Folglich lassen die in Abbildung 25 zusammengefassten Batchversuche mit chlorierter Cellobiose auf eine wesentlich geringere Inhibierung der Biogasbildung als bei Methylcellulose schließen.

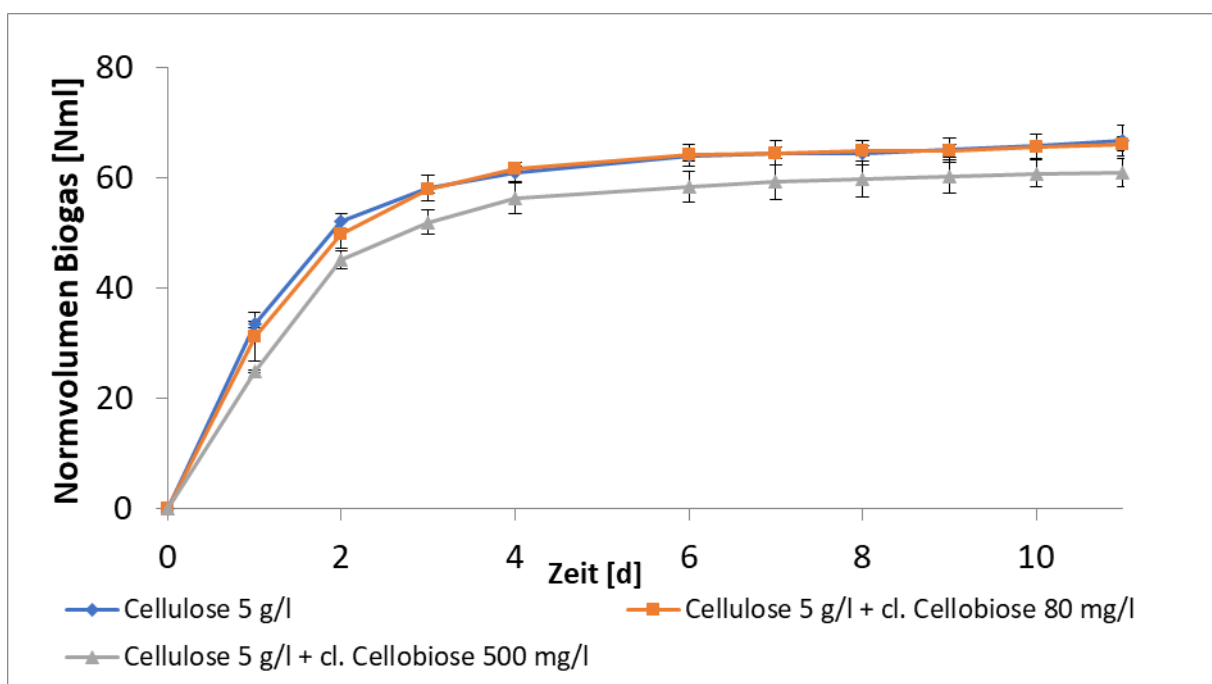


Abbildung 25: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von chlorierter Cellobiose (Abschnitt 5.7.2), abzüglich des Bildwerts. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 6.5.2 Analyse der Oligosaccharide

Die quantitative Analyse der Cellooligosaccharide, nach der oben beschriebenen Methode (Abschnitt 5.5.8) ergab, dass die selbst hergestellte Mischung aus Cellooligosacchariden zu 2 % aus Cellobiose, 13 % aus Cellotetraose und zu 19 % aus Cellopentaose bestand. Die übrigen Cellooligosaccharide konnten mangels geeigneter Standards nicht quantifiziert werden. Das in Abbildung 26 dargestellte Chromatogramm zeigt aber einen signifikanten Gehalt an Cellotriose und Cellohexaose. Auch das Vorhandensein von Celloheptaose lässt sich aus den detektierten Massenzahlen ableiten.

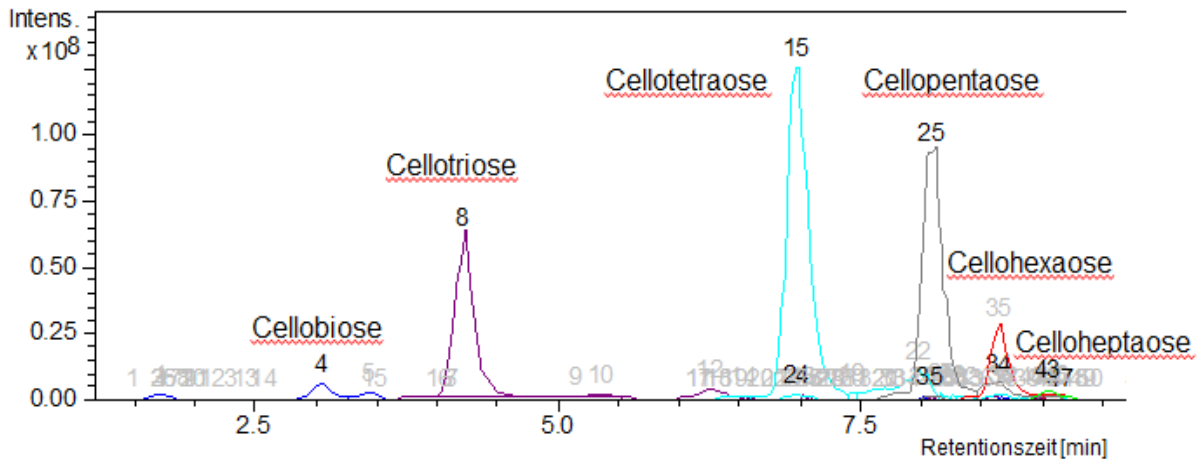


Abbildung 26: Chromatogramm der Cellooligosaccharidmischung im ESI Detektor nach Auftrennung in der HPLC nach der im Abschnitt 5.5.8 beschriebenen Methode.

### 6.5.3 Analyse der chlorierten Cellooligosaccharide

Die chlorierten Cellooligosaccharide konnten chromatographisch nicht vollständig aufgetrennt werden, sodass im Chromatogramm (Abbildung 27) keine eindeutig zuordenbaren Peaks zu erkennen sind und von einer Vielzahl an unterschiedlich chlorierten Produkten auszugehen ist.

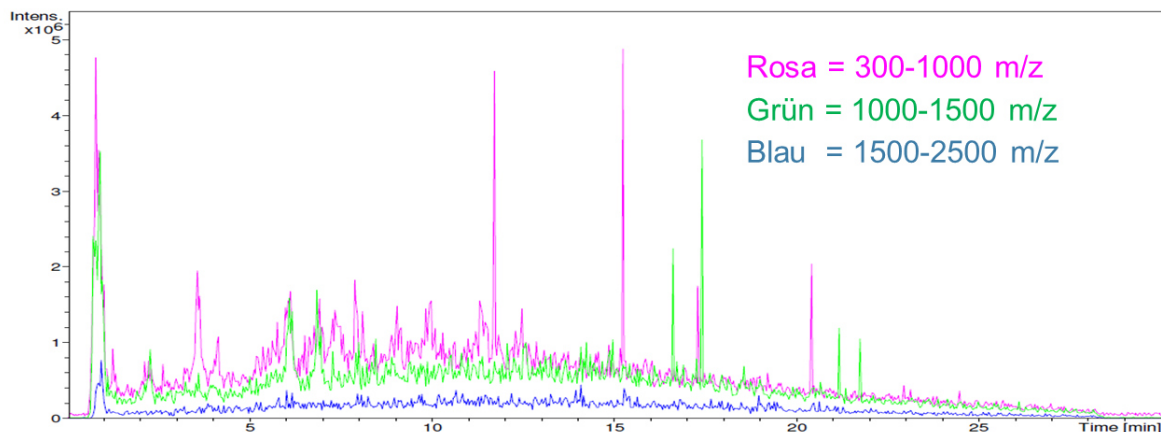


Abbildung 27: Chromatogramm der chlorierten Cellooligosaccharide im Massenspektrometer nach Auftrennung in der HPLC nach der im Abschnitt 5.5.8 beschriebenen Methode.

Werden die ebenfalls aufgenommenen Massenspektren zur Analyse herangezogen, so lässt sich anhand der Bruchstücke das Vorhandensein von chlorierten Cellooligosacchariden ableiten. So sind beispielsweise im Massenspektrum in Abbildung 28 immer wieder Massen von chlorierten Cellooligosacchariden um 4 erhöht zu finden. Der Zerfall des Peaks mit einem  $m/z$  Peak von 781, welcher 4 Glucoseeinheiten + 6 Chloratomen + 4 entspricht, enthält die  $m/z$  Peaks 401 und 563, welche wiederum 2 Glucoseeinheiten mit 3 Chloratomen ( $m/z = 401$ ) entsprechen und einer zusätzlichen Cellobioseeinheit ( $m/z = 563$ ). Darüber hinaus lässt die Isotopenverteilung auf das Vorhandensein von Chlor in den Molekülen schließen.



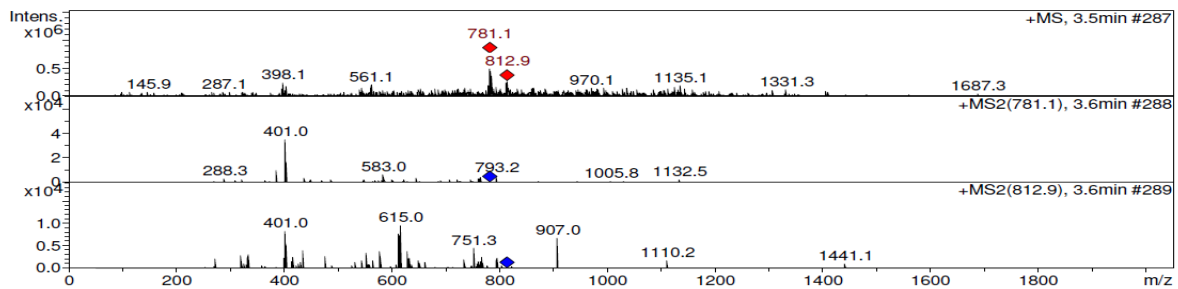


Abbildung 28: Massenspektrum der chlorierten Cellooligosaccharide, sowie deren Bruchstücke im Massenspektrometer. Methode siehe Abschnitt 5.5.8.

#### 6.5.4 Vorversuche mit chlorierten Oligosacchariden im Batchversuch

Bevor die chlorierten Cellooligosaccharide im Fermenter getestet wurden, wurden vorab Kultivierungsversuche in Kolbenprobern, wie im Abschnitt 5.2 beschrieben, durchgeführt, um eine toxische Wirkung im Fermenter ausschließen zu können. Hier zeigte sich im ersten Versuchsansatz mit der höher chlorierten Fraktion bei einer Konzentration von  $50 \text{ mg l}^{-1}$  eine eindeutig inhibierende Wirkung in Form einer wesentlich geringeren Biogasproduktion im Vergleich zum Kontrollwert ohne Zusatz, sodass der Versuch aufgrund der eindeutigen Aussage bereits nach 3 Tagen beendet wurde. Aus dem Folgeversuch, dessen Ergebnisse gemeinsam mit den Ergebnissen aller Batchtests zur Toxizitätsermittlung in Abbildung 29 zusammengefasst sind, geht hervor, dass Konzentrationen der höher chlorierten Cellooligosaccharide von  $0,2 - 5 \text{ mg l}^{-1}$  keinerlei Einfluss auf die Biogasproduktion haben. Im abschließenden Vorversuch wurde die getestete Konzentration weiter erhöht und bei  $25 \text{ mg l}^{-1}$  höher chlorierter Cellooligosaccharide konnte kein toxischer Einfluss festgestellt werden. Parallel dazu wurde auch die Toxizität der niedriger chlorierten Fraktion der Cellooligosaccharide geprüft und es wurde bei beiden getesteten Konzentrationen  $25$  und  $50 \text{ mg l}^{-1}$  kein signifikanter Unterschied zum Referenzwert (Cellulose  $5 \text{ g l}^{-1}$ ) beobachtet.

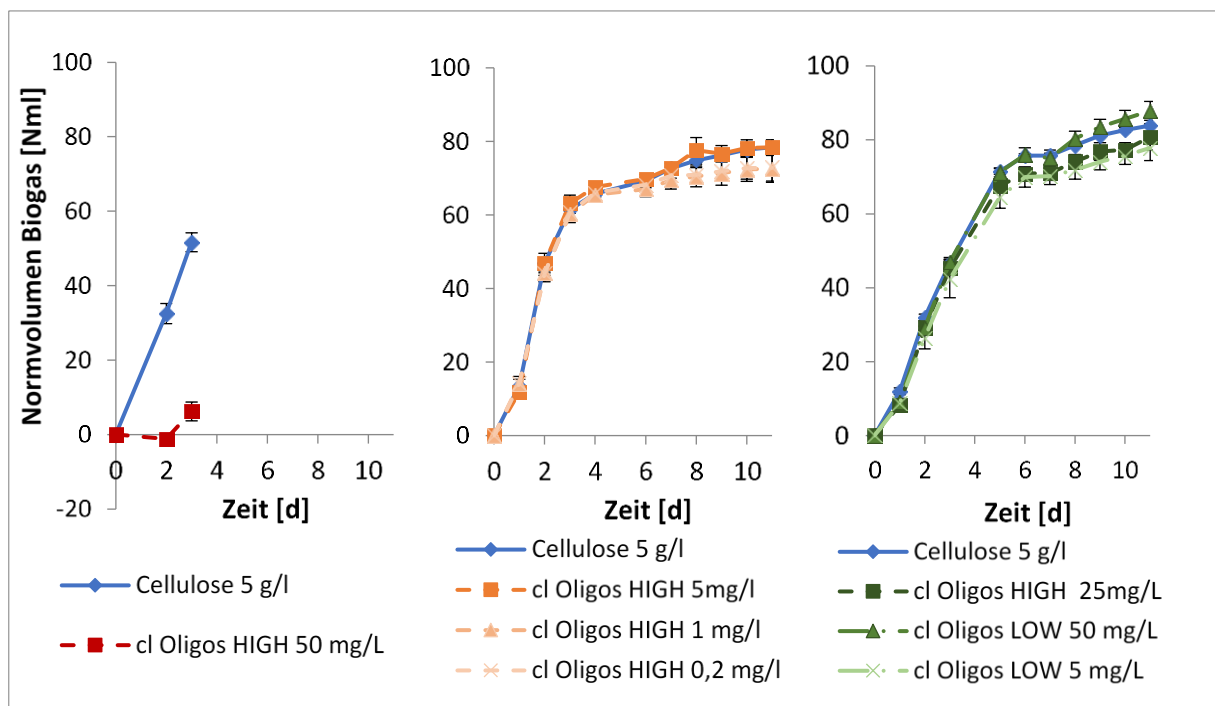


Abbildung 29: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von chlorierten Cellooligosacchariden in verschiedenen Konzentrationen (Chlorgehalt HIGH = 12,12 %, LOW = 7,25), abzüglich des Bildwerts. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

## 6.6 Etablierung der qPCR-Methode zur Quantifizierung von Clostridien

### 6.6.1 Überprüfung der Primerspezifität in silico

Die Spezifität der Primerpaare *C.cel* (*for.* und *rev.*) zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* und *C.vor* (*for.* und *rev.*) zur Quantifizierung von *C. cellulovorans* wurden mit Hilfe des TestPrime 1.0 Tools des SILVA rRNA database project (Klindworth et al., 2013) durchgeführt. Dieses Tool erlaubt die gemeinsame Evaluierung von vorwärts und rückwärts Primern innerhalb aller taxonomischen Einheiten in der Datenbank. Die in Tabelle 23 und Tabelle 24 dargestellten Testergebnisse wurden am 22.11.2019, unter Anwendung der empfohlenen Standardparameter abgefragt. Die Überprüfung der Primer für *C. cellulovorans* in Tabelle 23 ergibt 13 übereinstimmende Regionen, welche alle dem Zielorganismus zugeordnet werden können. Auffallend dabei ist, dass 9 Regionen davon die gleiche „primaryAccession“ Nummer aufweisen, und somit demselben Genom zugeordnet werden können. Folglich sind mehrere Kopien der 16s rDNA in diesem Genom vorhanden.

Tabelle 23: Ergebnis der Primerspezifitätsabfrage für die spezifischen *C. cellulovorans* Primer mit TestPrime 1.0 des SILVA rRNA database project. Die Abfrage vom 22.11.2019 ergab mehrere positive Ergebnisse, welche dem Zielorganismus zugeordnet werden können.

job_name	primaryAccession	seqent_id	organismName	length	startPosition	stopPosition
C. cellulovorans	BABR01000545	459315	Clostridium cellulovorans 743B	1495	100	1594
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	9730	11232
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	99241	100743
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	111560	113062
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	123089	124591
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	147148	148650
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	156482	157984
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	194613	196115
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	3437157	3438659
C. cellulovorans	CP002160	480096	Clostridium cellulovorans 743B	1503	4550979	4552481
C. cellulovorans	KF672708	4679893	Clostridium cellulovorans	1508	1	1508
C. cellulovorans	X71849	6016140	Clostridium cellulovorans	1506	1	1506
C. cellulovorans	X73438	6016216	Clostridium cellulovorans	1513	1	1513

Für *C. cellulolyticum* sind die Ergebnisse eindeutiger, hier ergibt sich für die getesteten Primer nur eine einzige übereinstimmende Region, die eindeutig *C. cellulolyticum* zugeordnet werden kann. Die Ergebnisse dieser Abfrage sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Ergebnis der Primerspezifitätsabfrage für die spezifischen *C. cellulolyticum* Primer mit TestPrime 1.0 des SILVA rRNA database project. Die Abfrage vom 22.11.2019 ergab nur ein positives Ergebnis, welches dem Zielorganismus zugeordnet werden konnte.

job_name	primaryAccession	seqent_id	organismName	length	startPosition	stopPosition
C. cellulolyticum	CP001348	479717	[Clostridium] cellulolyticum H10	1641	453791	455431

### 6.6.2 Überprüfung der Primerspezifität im Labor

Zusätzlich zu den in silico durchgeführten Analysen der Primerspezifität wurden auch Versuche mit am Lehrstuhl vorhandener genomischer Clostridien DNA durchgeführt.

Die Ergebnisse für die *C. cellulovorans* Primer sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Hier zeigt sich, wie erwartet, dass zum Erreichen des Schwellwerts mit der eingesetzten Menge an Ziel-DNA rund 16 Zyklen benötigt werden, während bei der ebenfalls eingesetzten genomischen DNA von *C. cellulolyticum* und *C. thermocellum* die Schwellwerte erst sehr spät, fast schon auf Niveau des NTC-Werts erreicht werden, was auf eine spezifische Bindung hinweist. Darüber hinaus wurden die verwendeten gDNA Template mit den *Eub338/518* Primern als Positivkontrolle überprüft, wobei bei allen Ansätzen der Schwellwert deutlich vor der NTC erreicht wurde.

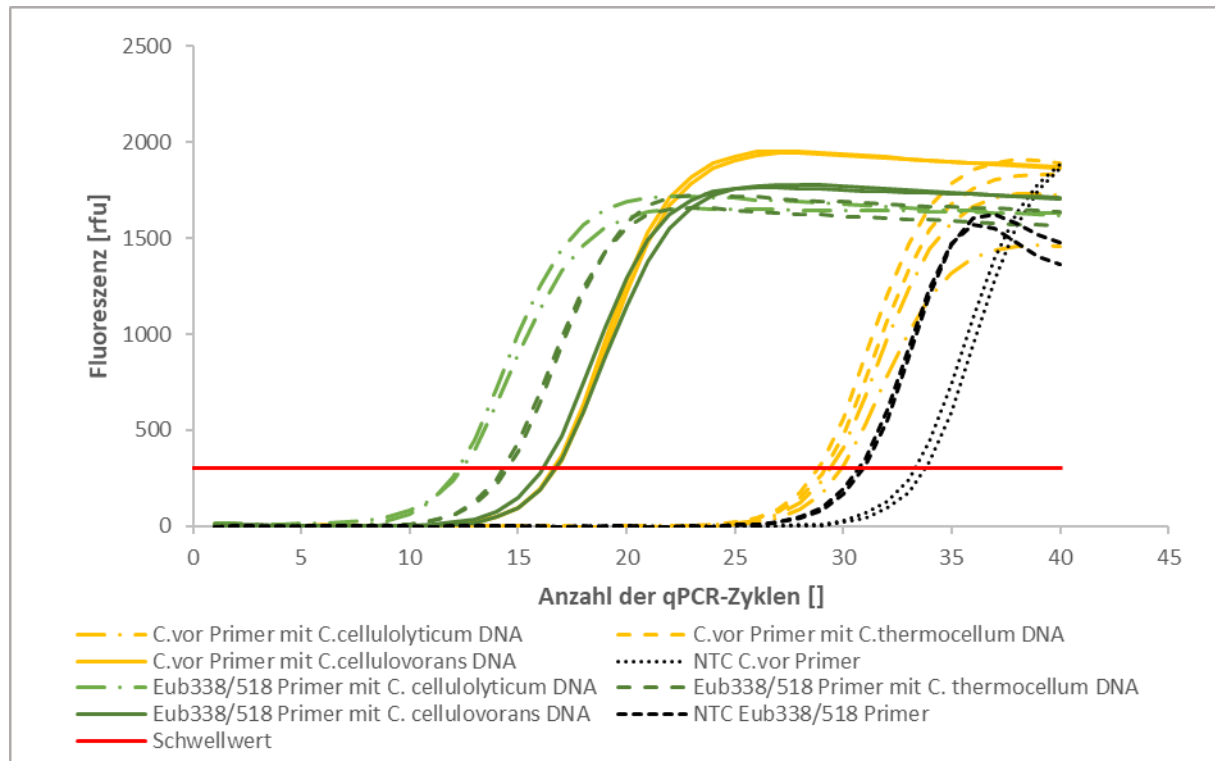


Abbildung 30: qPCR-Lauf mit 60 °C Annealingtemperatur für 60 s mit Primern spezifisch für *C. cellulovorans* (*C.vor* – 400 nM) und einem generellen Bakterienprimer (*Eub338/518* – 100 nM). Wie erwartet wird der Schwellwert mit der Ziel-DNA wesentlich früher erreicht als mit der DNA anderer Clostridien. Alle Positivkontrollen (*Eub338/518*) zeigen ein funktionierendes System an.

Auch die Primer für die Quantifizierung von *C. cellulolyticum* wurden zusätzlich zur in silico Prüfung noch einem Test im Labor unterzogen. Wie erwartet kann aus den Ergebnissen in Abbildung 31 entnommen werden, dass mit diesen Primern in Verbindung mit genomischer DNA aus *C. cellulolyticum* ein eindeutiges Signal erhalten wird, welches über 20 Zyklen früher als mit DNA aus *C. thermocellum* oder *C. acetobutylicum* erreicht wird. Die ebenfalls durchgeführte Positivkontrolle mit den Primern *Eub338/518* zeigte für die verwendeten gDNA-Template von *C. acetobutylicum* und *C. thermocellum* eine problemlose Polymerisation mit cq-Werten von 11 bzw. 16 Zyklen. Die durchgeführten NTCs ergaben im Fall der *C.cel* Primer kein und bei den *Eub338/518* Primern erst ein Produkt bei über 34 Zyklen.

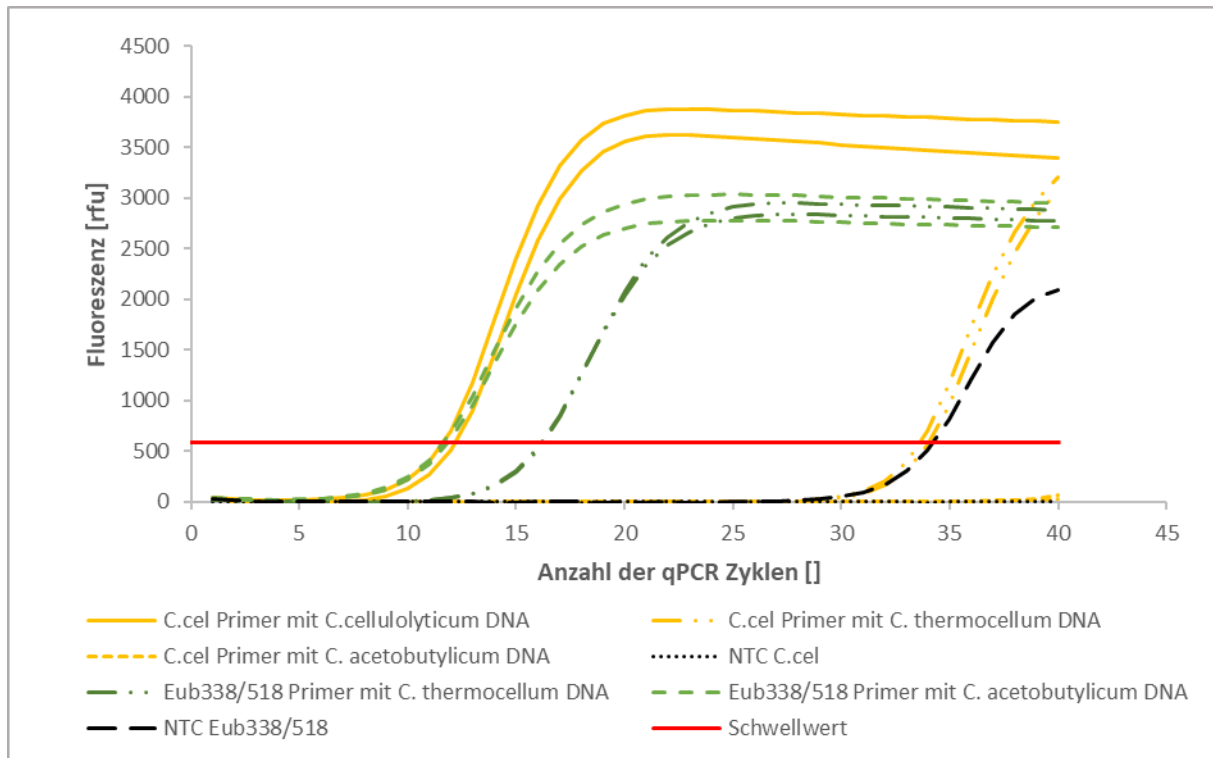


Abbildung 31: qPCR-Lauf mit 60 °C Annealingtemperatur für 30 s mit Primern spezifisch für *C. cellulolyticum* (*C.cel* – 200 nM) und einem generellen Bakterienprimer (*Eub338/518* – 100 nM). Wie erwartet wird der Schwellwert mit der Ziel-DNA wesentlich früher erreicht als mit der DNA anderer Clostridien. Alle Positivkontrollen (*Eub338/518*) zeigen ein funktionierendes System an.

### 6.6.3 Optimierung der Annealingtemperatur

Die optimale Annealingtemperatur wurde durch einen qPCR-Lauf mit Temperaturgradient ermittelt. Als Ausgangstemperatur wurde wie auch beim Primerdesign die empfohlene Temperatur des verwendeten SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix von 60 °C verwendet. Das Ergebnis des Gradienten von 58,0 °C bis 62,2 °C ist in Abbildung 32 abgebildet. Die *c<sub>q</sub>*-Werte liegen hier sehr nahe beisammen, jedoch ist trotz der geringen Temperaturunterschiede erkennbar, dass an den am Rand angesetzten Versuchen das Erreichen der Schwellwerte mit 13,86 und 13,79 nach hinten verschoben ist. Die näher an 60 °C angelegten Ansätze erreichen den Schwellwert früher, wobei das beste Ergebnis bei 59 °C mit einem *c<sub>q</sub>*-Wert von 13,48 erzielt wird.

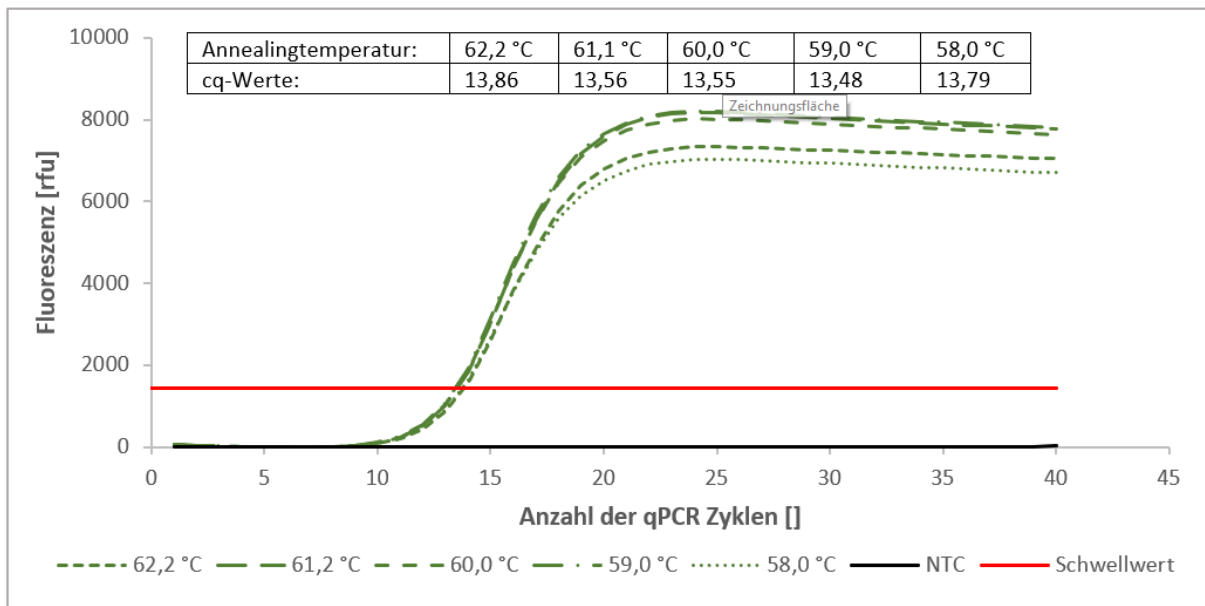


Abbildung 32: qPCR-Lauf zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für *C. cellulolyticum* bei einer Primerkonzentration von 300 nM und einer Annealingzeit von 30 s. Der verwendete Temperaturgradient erstreckte sich von 58,0 °C bis 62,2 °C und das Optimum wurde bei 59 °C ermittelt.

#### 6.6.4 Optimierung der Primerkonzentration

Die Primerkonzentration für die qPCR Ansätze wurde in einem Bereich von 200 – 500 nM, also im empfohlenen Bereich des SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, experimentell untersucht. Aus den in Abbildung 33 zusammengefassten Ergebnissen kann im getesteten Bereich nur geringer Einfluss der Primerkonzentration auf die cq-Werte abgeleitet werden. Dennoch zeigt sich, dass der Schwellwert mit geringeren Primerkonzentrationen früher erreicht wird als bei 500 nM. Der geringste cq-Wert und damit das beste Ergebnis wird bei 200 nM erreicht.

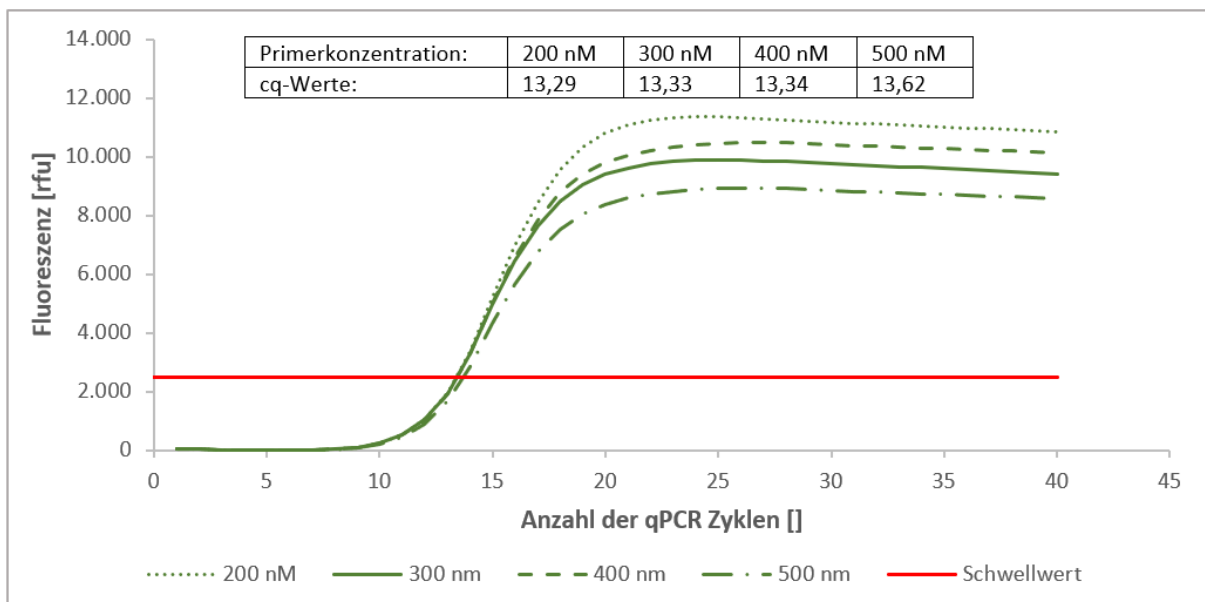


Abbildung 33: qPCR-Lauf zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration für *C. cellulolyticum* bei einer Annealingtemperatur von 60 °C und einer Annealingzeit von 30 s. Die getesteten Konzentrationen umfassten 200 bis 500 nM und das Optimum wurde in diesem Bereich bei 200 nM ermittelt.

#### 6.6.5 Ermittlung der qPCR-Effizienz

Um die Effizienz des entwickelten qPCR-Systems zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* zu überprüfen, wurde ein qPCR-Ansatz mit genomischer DNA durchgeführt. Das DNA-Template wurde über 6 Zehnerpotenzen verdünnt und somit eine Verdünnungsreihe erstellt. Diese ist in Abbildung 34

dargestellt und zeigt einen linearen Zusammenhang der vorhandenen *C. cellulolyticum* 16s rDNA Kopienzahl und den gemessenen cq-Werten, was sich am Korrelationskoeffizienten von 0,9964 zeigt. Aus der Steigung der Geraden wurde nach Gleichung [12] die Effizienz der PCR-Reaktion berechnet, welche 96,4 % beträgt.

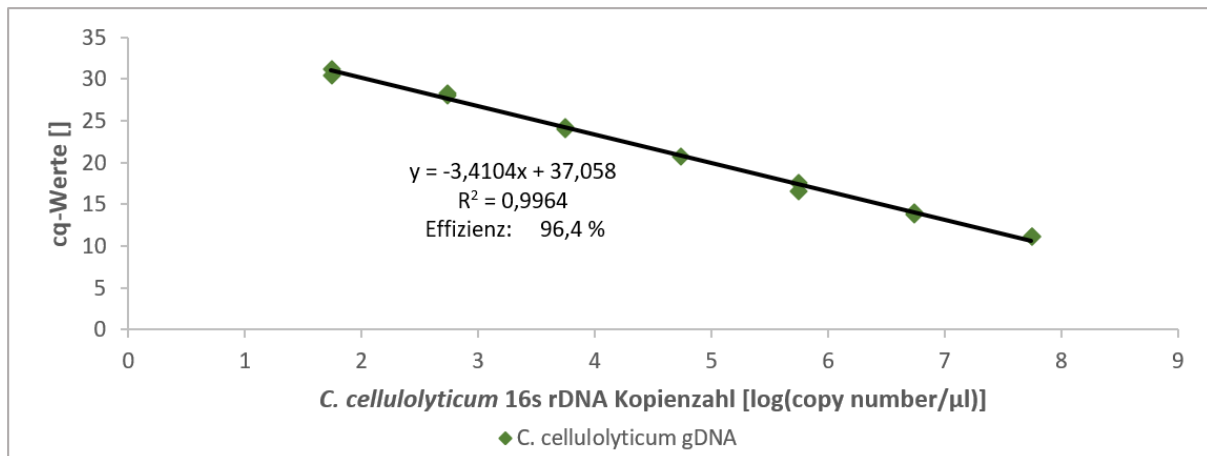


Abbildung 34: Ermittlung der qPCR-Effizienz bei der zuvor ermittelten Primerkonzentration von 200 nM und einer Annealingtemperatur von 60 °C. Die als Template eingesetzte metagenomische DNA von *C. cellulolyticum* wird über 6 Zehnerpotenzen verdünnt eingesetzt und aus den in der qPCR erhaltenen cp-Werten lässt sich eine Effizienz von 96,4 % berechnen.

#### 6.6.6 Überprüfung auf vorhandene Hemmstoffe in der extrahierten metagenomischen DNA

Zur Sicherstellung, dass im Zuge der Reinigung der metagenomischen DNA aus den Biogasfermentern alle Hemmstoffe abgetrennt wurden, wurde die gleiche Verdünnungsreihe über 4 Zehner Potenzen von genomischer *C. cellulolyticum* DNA mit bekannter Konzentration in nukleasefreiem Wasser und in einer Fermenterprobe mit geringer Kopienzahl an *C. cellulolyticum* DNA angelegt und mittels qPCR die cq-Werte ermittelt. Aus dem in Abbildung 35 abgebildeten Ergebnis geht hervor, dass die zur Verdünnungsreihe verwendete Fermenterprobe eine geringere Konzentration als die beiden Kalibrationsgeraden aufwies. Beim Erstellen der Geraden wurde diese zusätzliche Kopienzahl berücksichtigt, wobei sich das aufgrund der geringeren Konzentration nur bei der höchsten Verdünnungsstufe auswirkte, da sich hier die Kopienzahl an *C. cellulolyticum* DNA bei der Verdünnungsreihe in Wasser von 8500 Kopien auf 10900 Kopien bei der Verdünnungsreihe in der Fermenterprobe erhöht. Bei den geringeren Verdünnungsstufen fällt dieser Effekt geringer aus, weshalb die Messwerte fast deckungsgleich übereinander liegen. Beim Vergleich der erstellten Regressionsgeraden ergibt sich ein ähnliches Bild, da sich die Steigung nur um 0,35 % und der Achsabschnitt um 0,48 % unterscheiden. Somit ist ein Einfluss der Probenmatrix der metagenomischen Fermenter DNA nicht festzustellen.

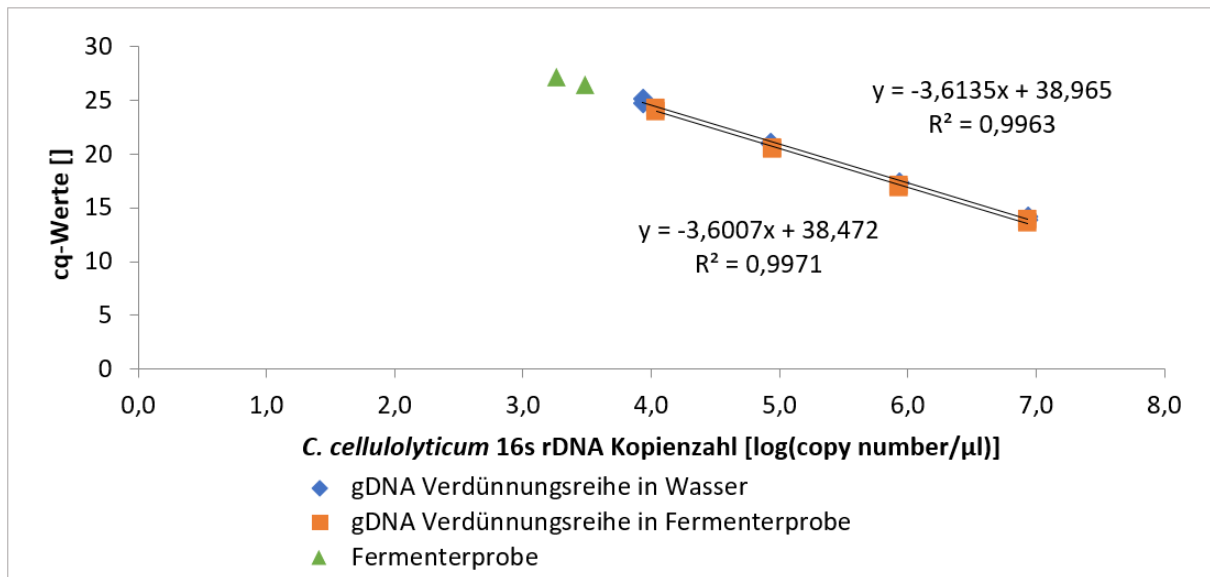


Abbildung 35: Kontrolle auf eventuell vorhandene Hemmstoffe anhand von 2 Verdünnungsreihen über 4 Zehnerpotenzen, welche in nukleasefreiem Wasser und in einer Fermenterprobe mit geringer Kopienzahl an *C. cellulolyticum* DNA angelegt wurden. Die qPCR erfolgte bei einer Primerkonzentration von *C.cel* von 200 nM, sowie einer Annealingtemperatur von 60 °C. Zwei Geraden, welche mit cq-Werten aus der qPCR-Analyse erstellt wurden, zeigten durch ähnliche Steigungen die Abwesenheit von Hemmstoffen an.

#### 6.6.7 Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktion aus den Fermenterproben

Die Aufreinigungsmethode der metagenomischen DNA wurde durch eine mehrfache Aufreinigung aus derselben Probe auf die Reproduzierbarkeit überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 zusammengefasst, bei welcher die Kopienzahl an *C. cellulolyticum* 16s rDNA erst nachträglich anhand der cq-Werte berechnet wurde. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass dieses Experiment im Zuge der Verversuche durchgeführt wurde und eine Möglichkeit zur genauen Berechnung der Biomassekonzentration an *C. cellulolyticum* noch nicht verfügbar war. Aus den vorhandenen Daten kann trotzdem erkannt werden, dass sich die Ergebnisse vom höchsten zum niedrigsten um weniger als 25 % unterscheiden und der Mittelwert eine relative Standardabweichung von 11,2 % beträgt. Auch ist das Gesamtbild des Parallelansatzes im Säulendiagramm ein homogenes.

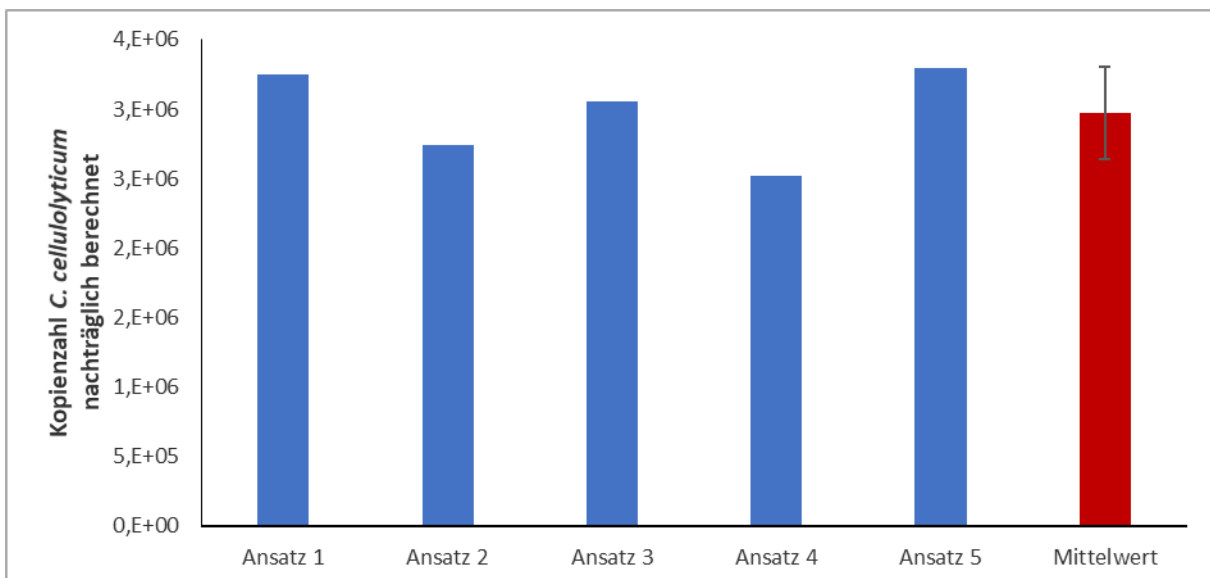


Abbildung 36: Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktion aus dem Fermenter, anhand nachträglich berechneter Kopienzahl an *C. cellulolyticum* 16s DNA ermittelt aus 0,5 ml Fermenterprobe derselben Probenahme. Die nah beisammen liegenden Ergebnisse für die 5-fach Aufreinigung mit dem DNeasy® PowerSoil® Kit und anschließende qPCR-Analyse weisen auf eine gute Reproduzierbarkeit hin.

### 6.6.8 Reproduzierbarkeit der Probennahme

Die Reproduzierbarkeit der Probennahme aus den Fermentern wurde überprüft, indem im Abstand von 8 min zwei voneinander unabhängige Proben gezogen wurden und aus diesen die metagenomische DNA extrahiert wurde. Bei Analyse der Proben im qPCR-Cycler mit Primern für *C. cellulolyticum* zeigte sich für die erste Probe ein cq-Wert von 23,1 und für die 2. Probe ein cq-Wert von 23,0. Zum Zeitpunkt der Experimentdurchführung lag, wie auch bei den Experimenten in Abschnitt 6.6.7, noch keine Möglichkeit zur genauen Berechnung der Biomassekonzentration an *C. cellulolyticum* vor, sodass erst nachträglich die Kopienzahl an *C. cellulolyticum* 16s rDNA berechnet wurde. Trotzdem kann aus den Daten in Abbildung 37 auch ohne die genaue Quantifizierung abgelesen werden, dass sich die Ergebnisse der beiden Probennahmen nur um 7,7 % unterscheiden.

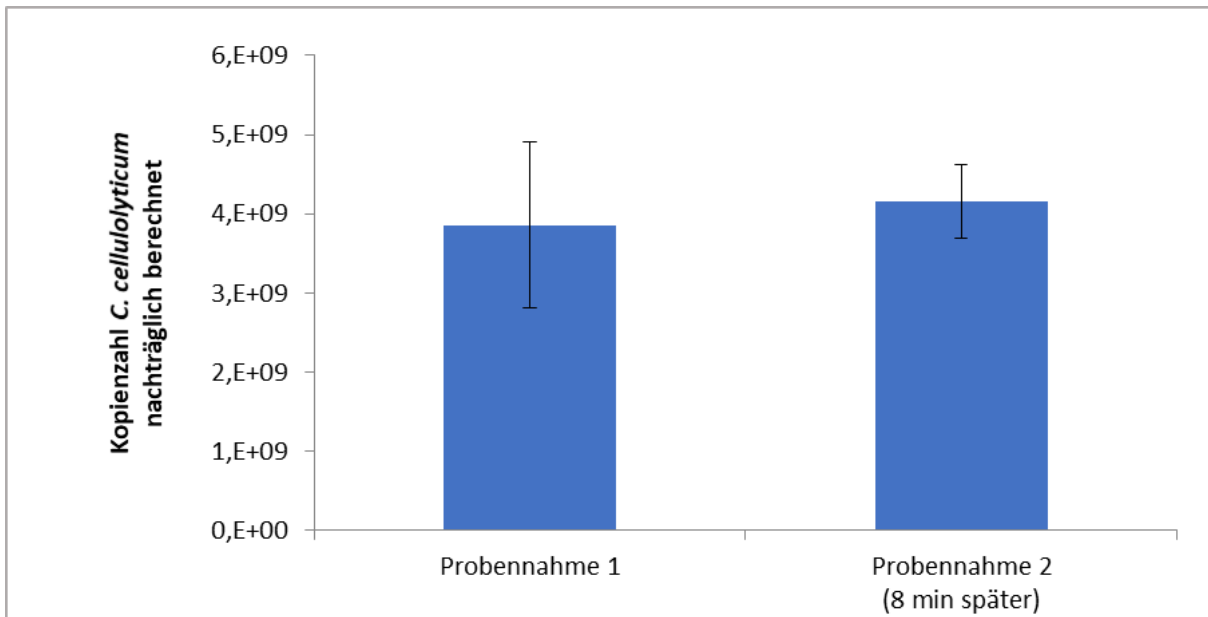


Abbildung 37: Reproduzierbarkeit der Probennahme aus dem Fermenter, anhand Nachträglich berechneter Kopienzahl an *C. cellulolyticum* 16s DNA ermittelt aus 0,5 ml Fermenterprobe gezogen in einem Intervall von 8 min. Die Aufreinigung mit dem DNeasy® PowerSoil® Kit wurde in Doppelbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse der anschließenden qPCR-Analyse weisen auf eine reproduzierbare Probennahme hin.

## 6.7 Ergebnisse der Quantifizierung von cellulolytischen Clostridien mittels qPCR

### 6.7.1 Erstellung der Kalibrationsgeraden für *C. cellulolyticum*

Die wie in Abschnitt 5.8.8 beschrieben, unter Zusatz von DNA aus Heringssperma isolierte genomische DNA aus einer Biomasseverdünnungsreihe wurde zum Erstellen einer Kalibrationsgeraden verwendet. Von der in dreifacher Ausführung isolierten DNA wurde jeweils eine Doppelbestimmung in der qPCR-angesetzt, sodass pro Verdünnungsstufe eine Anzahl von 6 Messwerten vorlagen. Beim Vergleich dieser 6 Messwerte in Abbildung 38 geht hervor, dass diese innerhalb der einzelnen Verdünnungsstufen Std-1, Std-2, Std-3, Std-5 und Std-6 eine große Homogenität bezogen auf die Anzahl der Zyklen zum Erreichen des Schwellwerts, sowie bei der generellen Kurvenform aufweisen. Lediglich bei den Verdünnungsstufen Std-4 und Std-7 treten merkliche Unterschiede bei den cq-Werten auf. Die in Doppelbestimmung angesetzten NTC-Werte zeigten in Abbildung 38 keine Zunahme der Fluoreszenz und somit auch keine Produktbildung.



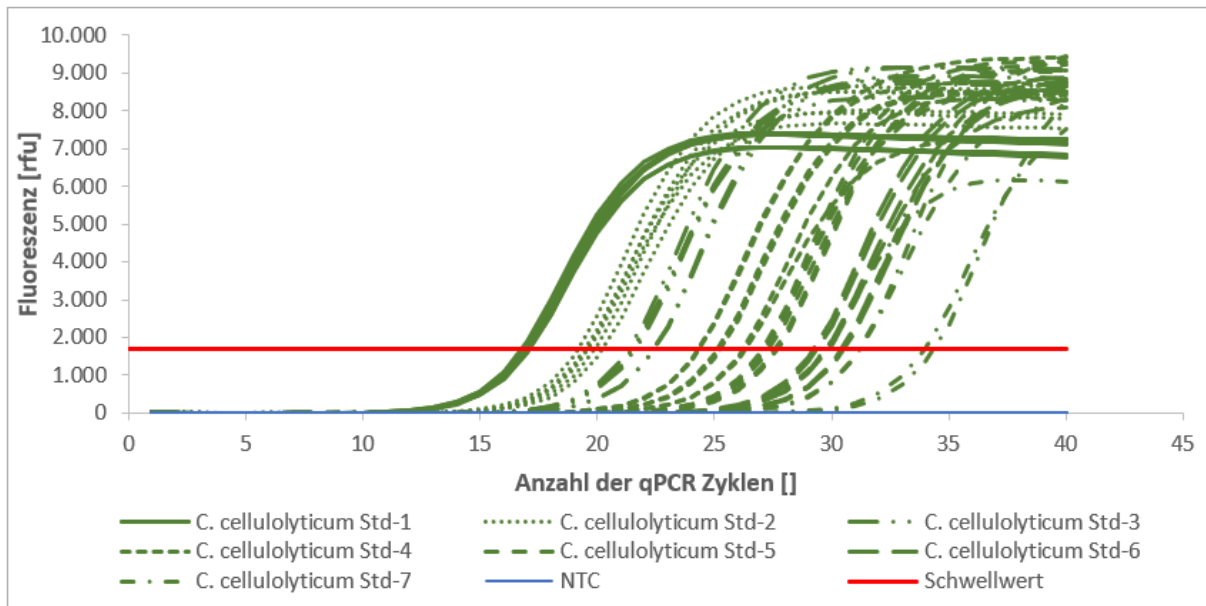


Abbildung 38: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Ermittlung der  $c_q$ -Werte für die Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum*. Der qPCR-Lauf wurde in Sechsfachbestimmung bei einer Primerkonzentration *C. cel* von 200 nM und einer Annealingtemperatur von 60 °C für 30 s durchgeführt. Als Template diente die aus einer Biomasseverdünnung in Triplets extrahierte gDNA von *C. cellulolyticum*.

Werden die gemessenen  $c_q$ -Werte zur Erstellung einer halblogarithmischen Kalibrationsgeraden verwendet, wie diese in Abbildung 39 wiedergegeben ist, so zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen den  $c_q$ -Werten und der eingesetzten Biomassekonzentration von *C. cellulolyticum* im Standard. Der lineare Zusammenhang wird neben dem optischen Bild auch durch den Korrelationskoeffizienten von 0,9959 bestätigt, sodass auch die Standards Std-4 und Std-7 mit einer größeren Standardabweichung verwendet werden. Somit ergibt sich eine Kalibrationsgerade für die Biomassekonzentration von  $0,32 \text{ g l}^{-1}$  in Std-1 bis  $0,00008 \text{ g l}^{-1}$  in Std-7. Die aus der Steigung abgeleitete Effizienz beträgt 73,4 %.

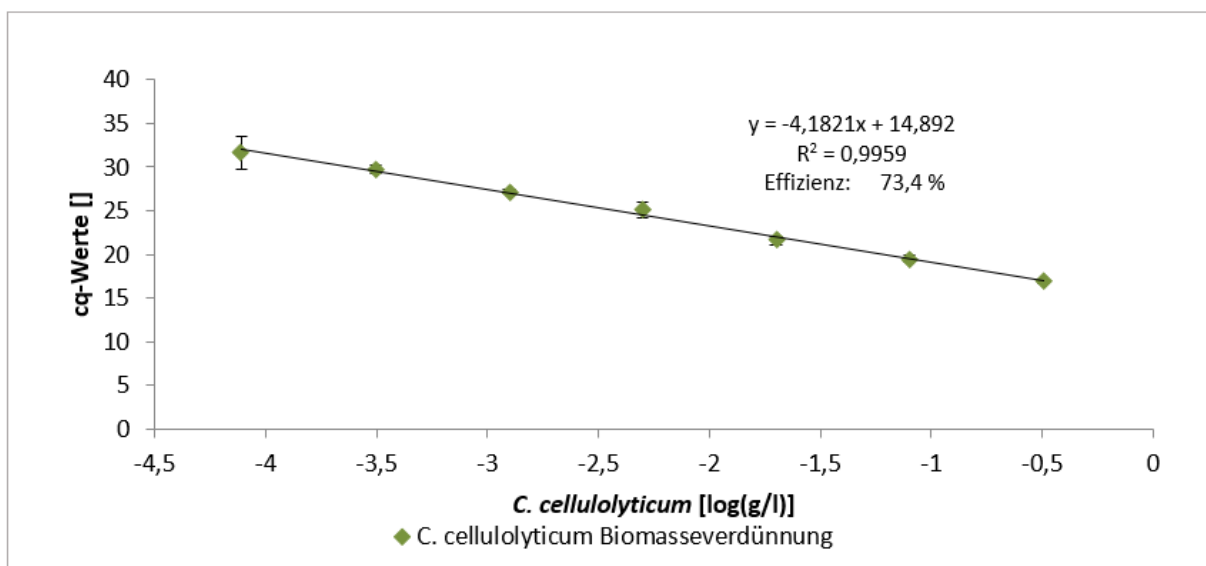


Abbildung 39: Eine Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* basierend auf der bekannten Biomassekonzentration der als Standard verwendeten Biomasseverdünnungsreihe und der dazugehörigen  $c_q$ -Werte, welche mittels qPCR in 6-fach Bestimmung ermittelt wurden.

Eine Kalibrationsgerade, wie sie in Abbildung 39 dargestellt ist, wurde bei jedem einzelnen qPCR-Lauf aufgestellt und nur für die Quantifizierung dieses Laufs verwendet. Um die Konsistenz der so ermittelten Konzentrationen an *C. cellulolyticum* zu überprüfen, wurde in Abbildung 40 eine

Zusammenfassung der Ergebnisse von mehrfach quantifizierten Proben erstellt. Daraus kann abgeleitet werden, dass für die analysierte Probe aus Fermenter 1 vom 17.04.2017 bei beiden qPCR-Analysen eine vergleichbare Konzentration ermittelt wurde. Diese Beobachtung wird durch die Messungen der Probe aus Fermenter 1 vom 21.6.2016 gestützt, da hier die Konzentrationen ebenfalls vergleichbar sind. Insgesamt weisen alle Quantifizierungen der Probe vom 21.6.2016 mit Ausnahme des qPCR Laufs vom 15.05.2018 eine ähnliche Konzentration auf. Für diesen Lauf vom 15.05.2018 fällt außerdem auf, dass auch die Probe vom 22.09.2017 deutlich über dem Messwert von anderen qPCR Messungen lag, sodass alle Proben dieses qPCR-Laufs erneut quantifiziert wurden.

Für die späteren Quantifizierungsläufe wurde eine Probe vom Fermenter 3 am 15.09.2017 verwendet, um die Ergebnisse der einzelnen Läufe miteinander zu vergleichen. Für diese Probe wurden im Mittel  $0,9 \text{ g l}^{-1}$  erreicht, wobei hier der Lauf vom 12.12.2018 als auffällig hoch herausragt, und deshalb wiederholt wurde. Ebenfalls wiederholt wurde der zweithöchste Wert für diese Probe, ermittelt am 17.11.2018.

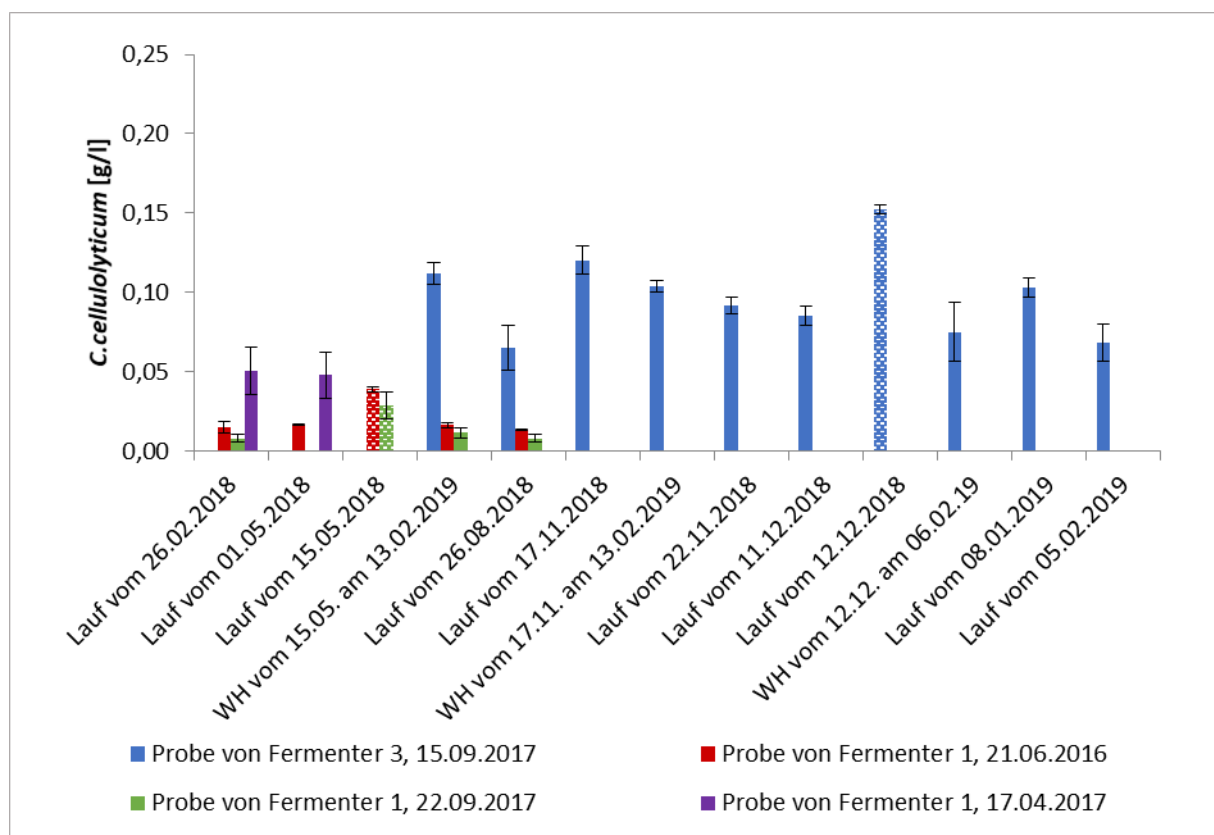


Abbildung 40: Überblick über die Reproduzierbarkeit der qPCR-Läufe von *C. cellulolyticum*. In dieser Abbildung sind die Quantifizierungsergebnisse von mehrfach gemessenen Proben zusammengefasst, um Trends oder Abweichungen veranschaulichen zu können. Zu Beginn wurden dazu verschiedene Proben verglichen, während ab dem 26.08.2018 die Probe vom Fermenter 3 vom 15.09.2017 als allgemeiner Vergleichsstandard herangezogen wurde. Auffällige Werte sind durch ein Muster gekennzeichnet (Diskussion im Abschnitt 7.6.1).

### 6.7.2 Erstellung der Kalibrationsgeraden für *C. cellulovorans*

Zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden für *C. cellulovorans* wurde die unter Zusatz von DNA aus Heringssperma isolierte genomische DNA aus einer Biomasseverdünnungsreihe, wie auch unter Abschnitt 5.8.8 beschrieben, verwendet. Von den in Triplikaten aus den einzelnen Verdünnungsstufen isolierten DNA wurde je eine Doppelbestimmung durchgeführt, sodass jeweils 6 Werte erhalten wurden. Die Zunahme der Fluoreszenz im Lauf der qPCR-Analyse kann aus Abbildung 41 entnommen werden und zeigt, verglichen mit Abbildung 38, ein weniger regelmäßiges Bild. Dies liegt vor allem daran, dass die cq-Werte von Std-2 zwar nahe beisammen liegen, jedoch im Vergleich mit den anderen Standards niedriger sind. Auch weist Std-5 eine sehr hohe Streuung auf, während die übrigen

Standards unauffällig bleiben. Die NTCs zeigen hier eine Fluoreszenzzunahme, allerdings erst nach dem Standard mit der geringsten Biomassekonzentration.

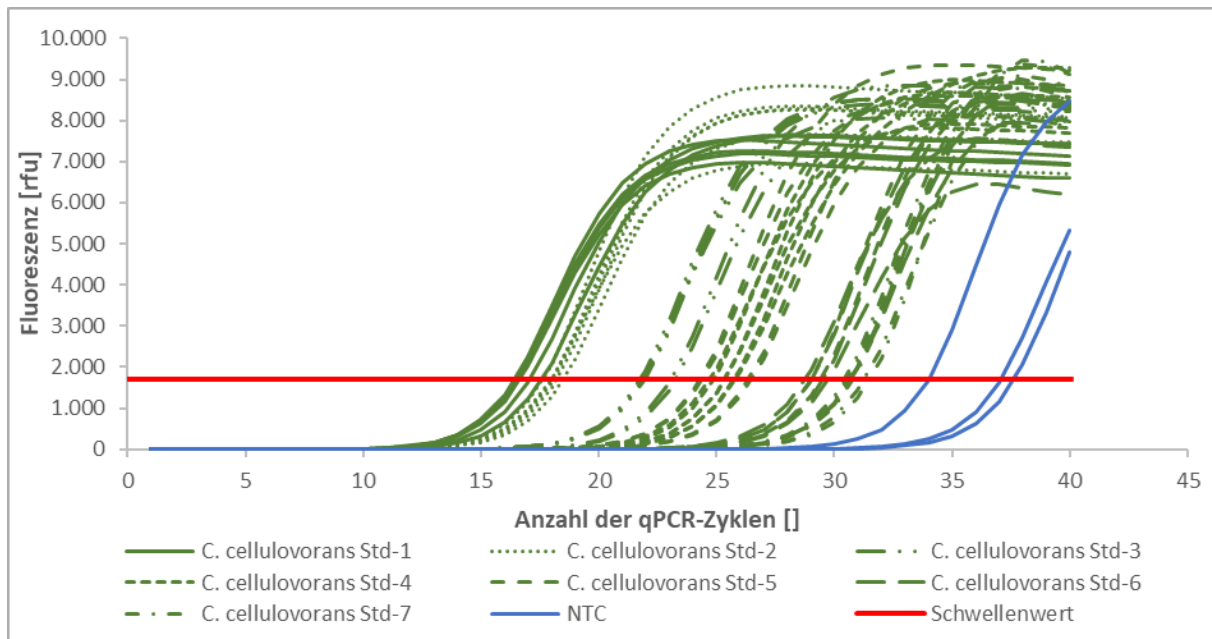


Abbildung 41: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Ermittlung der  $c_q$ -Werte für die Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von *C. cellulovorans*. Der qPCR-Lauf wurde in Sechsfachbestimmung bei einer Primerkonzentration  $C_{\text{vor}}$  von 400 nM und einer Annealingtemperatur von 60 °C für 60 s durchgeführt. Als Template diente die aus einer Biomasseverdünnung in Triplets extrahierte gDNA von *C. cellulovorans*.

Die gleichen Beobachtungen wie bei der Zunahme der Fluoreszenz können auch auf die daraus erstellte Kalibrationsgerade übertragen werden (Wiedergegeben in Abbildung 42). Auch hier zeigt sich ein, verglichen mit den anderen Standards, eher geringer  $c_q$ -Wert für Standard-2 und eine große Standardabweichung für Standard-5. Darüber hinaus fällt der  $c_p$ -Wert der höchsten Verdünnungsstufe geringfügig ab. Die aus den Standards erstellte Kalibrationsgerade weist einen Korrelationskoeffizienten von 0,9785 auf und die aus der Steigung abgeleitete Effizienz beträgt 32,0 %. Verglichen mit der Kalibrationsgeraden zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* ist die Korrelation etwas geringer, aber dennoch kann von einem linearen Zusammenhang zwischen Biomassekonzentration von *C. cellulovorans* und den ermittelten  $c_q$ -Werten in einem Bereich von 0,20  $\text{g l}^{-1}$  in Std-1 bis 0,003  $\text{g l}^{-1}$  in Std-7 ausgegangen werden.

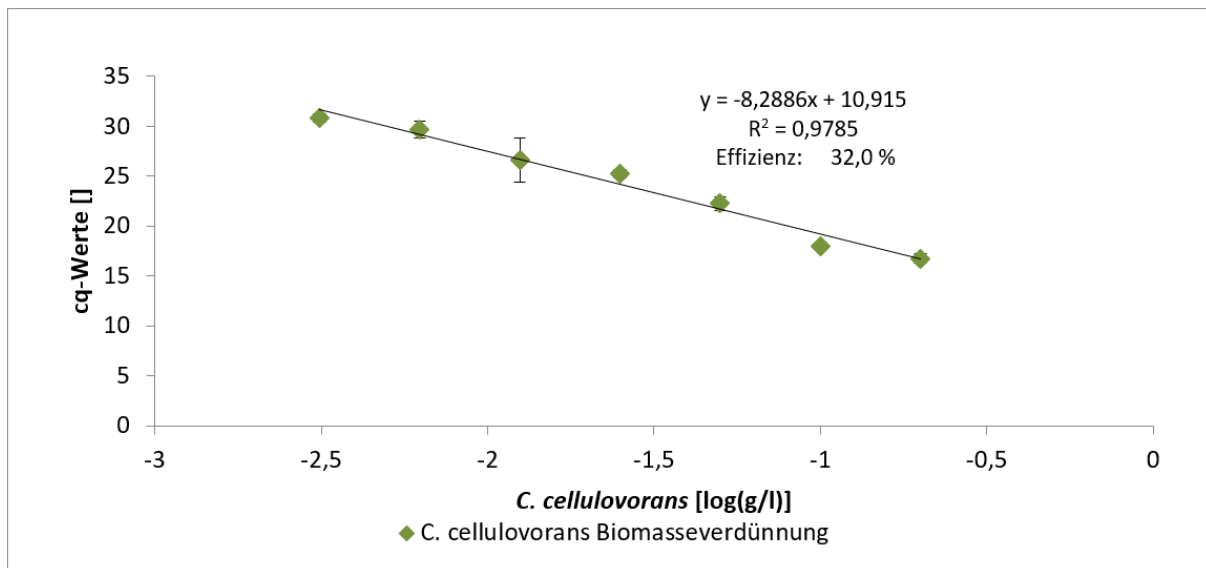


Abbildung 42: Eine Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von *C. cellulovorans* basierend auf der bekannten Biomassekonzentration der als Standard verwendeten Biomasseverdünnungsreihe und der dazugehörigen mittels qPCR in 6-fach Bestimmung ermittelten cq-Werte.

Wie auch für *C. cellulolyticum* wurde für die Quantifizierung von *C. cellulovorans* für jeden qPCR-Ansatz zur Quantifizierung eine eigene Kalibrationsgerade erstellt und die Konsistenz der Ergebnisse anhand des Vergleichs von mehrfach analysierten Proben überprüft. Aus diesem in Abbildung 43 zusammengefassten Vergleich zeigt sich sowohl für die Probe vom 15.09.2017 als auch vom 03.11.2017 ein einheitliches Bild. Lediglich bei der Analyse vom 12.12.2018 fällt die Biomassekonzentration an *C. cellulovorans* verglichen mit den anderen Werten etwas geringer aus. Da die Ergebnisse desselben Analysentags auch für die Quantifizierung von *C. cellulolyticum* auffällig sind, wurde diese Messung wiederholt.

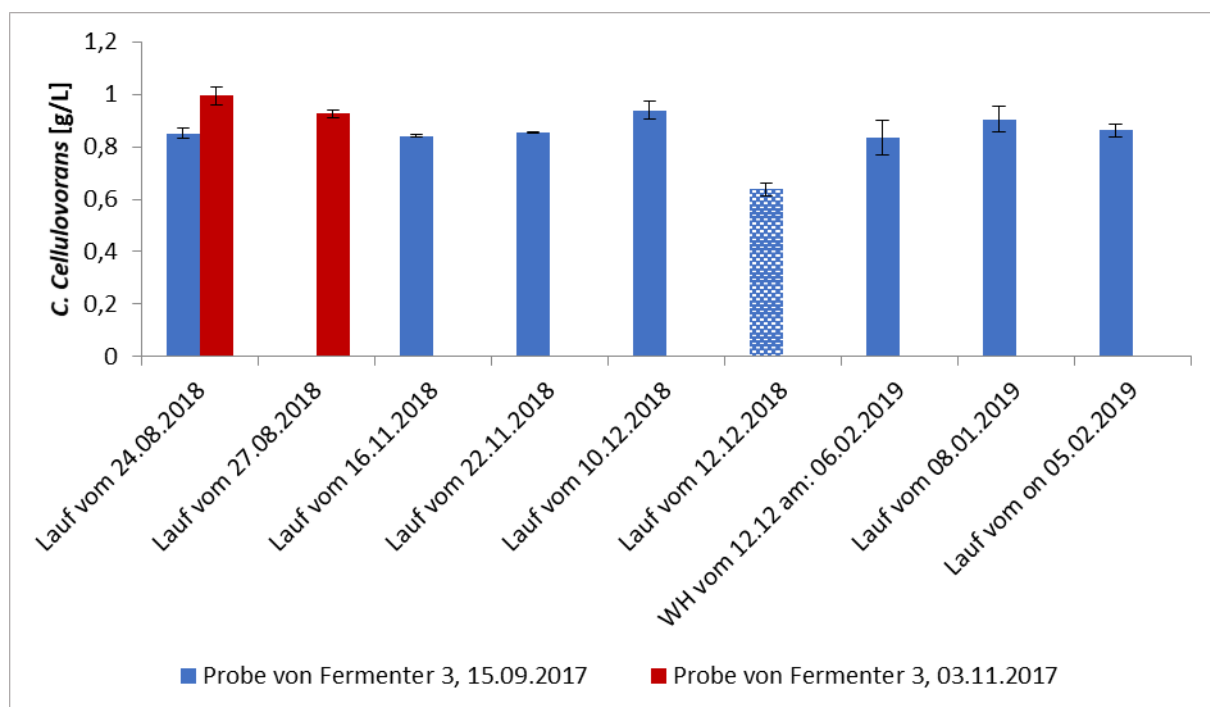


Abbildung 43: Überblick über die Reproduzierbarkeit der qPCR-Läufe von *C. cellulovorans*. In dieser Abbildung sind die Quantifizierungsergebnisse von mehrfach gemessenen Proben zusammengefasst, um Trends oder Abweichungen veranschaulichen zu können. Zu Beginn wurden dazu eine Probe aus Fermenter 3 vom 03.11.2017 verwendet, welche dann wie auch bei *C. cellulolyticum* durch eine Probe aus Fermenter 3 vom 15.09.2017 ersetzt wurde. Auffällige Werte sind durch ein Muster gekennzeichnet (Diskussion im Abschnitt 7.6.1).

### 6.7.3 Anpassung der cellulolytischen Leitspezies an die Kinetikermittlungen mit unterschiedliche Elicitoren

Die mittels qPCR ermittelten Daten über die Biomassekonzentrationen von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* sind in Abbildung 44 und Abbildung 45 gemeinsam mit den ermittelten Kinetiken zu den jeweiligen Elicitoren eingetragen, um den zeitlichen Verlauf und eventuelle Einflüsse, Trends oder Zusammenhänge erkennen zu können.

Für Fermenter 1 zeigt sich dabei deutlich, dass *C. cellulovorans* mit Konzentrationen um  $1,0 \text{ g l}^{-1}$  eindeutig in höheren Konzentrationen vorkommt als *C. cellulolyticum*, bei welchem die Konzentrationen stets unter  $0,1 \text{ g l}^{-1}$  bleiben. Bei beiden Mikroorganismen kann kein eindeutiger Trend abgelesen werden, da die Unterschiede in der Clostridienkonzentrationen sich nicht von den Schwankungen in Abbildung 40 und Abbildung 43 unterscheiden, auch konnte kein ausreichend kurzes Probenahmeintervall realisiert werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss der natürlichen Elicitoren auf die Biomassezusammensetzung zu ermöglichen. Somit bleibt als Aussage, dass sowohl die Konzentrationen von *C. cellulovorans* und auch *C. cellulolyticum* in einem konstanten Bereich bleiben.

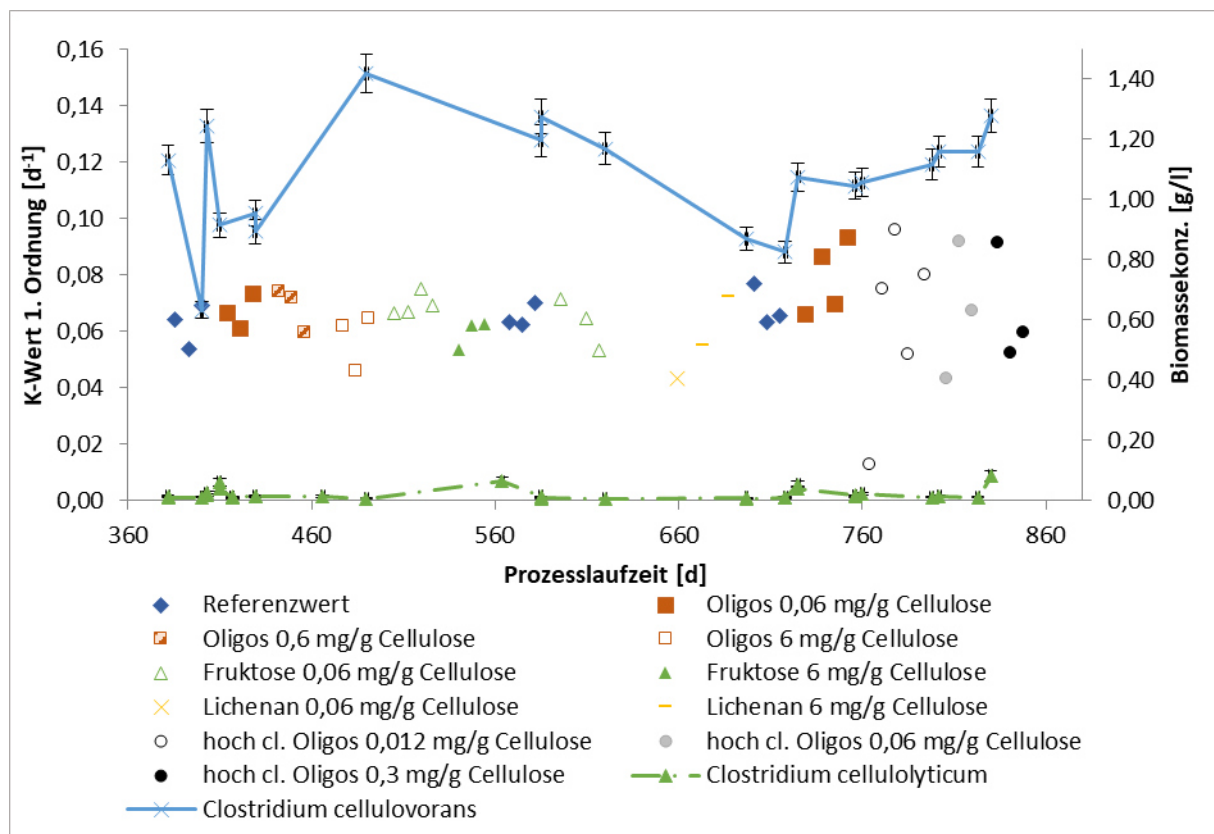


Abbildung 44: Veränderung der Konzentration von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* im Fermenter 1 während der Elicitortests. Die eingetragenen Punkte stellen den ermittelten  $k$ -Wert unter Einfluss des jeweiligen Elicitors dar. Die OLR betrug während der Tests  $4,8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und die HRT  $16,6 \text{ d}$ . Für die Ermittlung der Abbaukinetik wurde der Feed für jeweils 26 h unterbrochen. Der Referenzwert basiert auf der Abbaukinetik ohne Elicitorzusatz.

Im Fermenter 2 zeigt sich im Großen und Ganzen für die Konzentrationen von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* ein ähnliches Bild wie bei Fermenter 1. Erneut ist *C. cellulovorans* mit durchgehend ungefähr  $1,0 \text{ g l}^{-1}$  in deutlich höheren Konzentrationen vertreten als *C. cellulolyticum*, da dieses, wie auch im Fermenter 1 stets unter  $0,1 \text{ g l}^{-1}$  bleibt. Aus dem Verlauf in Abbildung 45 kann außerdem abgelesen werden, dass die Konzentrationen von beiden Mikroorganismen beim Einsatz der chlorierten Cellooligosaccharide zurückgingen. Bei *C. cellulovorans* zeigt sich das deutlich, da ab deren Einsatz in der mittleren Konzentrationsstufe ein stetiger Rückgang in einem engen Messintervall zu beobachten ist. Dieser Rückgang ist unabhängig von den Schwankungen in Abbildung 40 und

Abbildung 43 feststellbar, da die letzten 4 Messwerte im selben qPCR-Lauf quantifiziert wurden. Weniger eindeutig ist die Situation bei *C. cellulolyticum*, aber auch hier ist ein deutlicher Abfall in den Konzentrationen bei den letzten beiden Messungen zu erkennen, bei welchen die chlorierten Cellooligosaccharide in der höchsten Konzentrationsstufe eingesetzt wurden. Auch hier wurden die letzten 4 Messwerte im selben qPCR-Lauf quantifiziert.

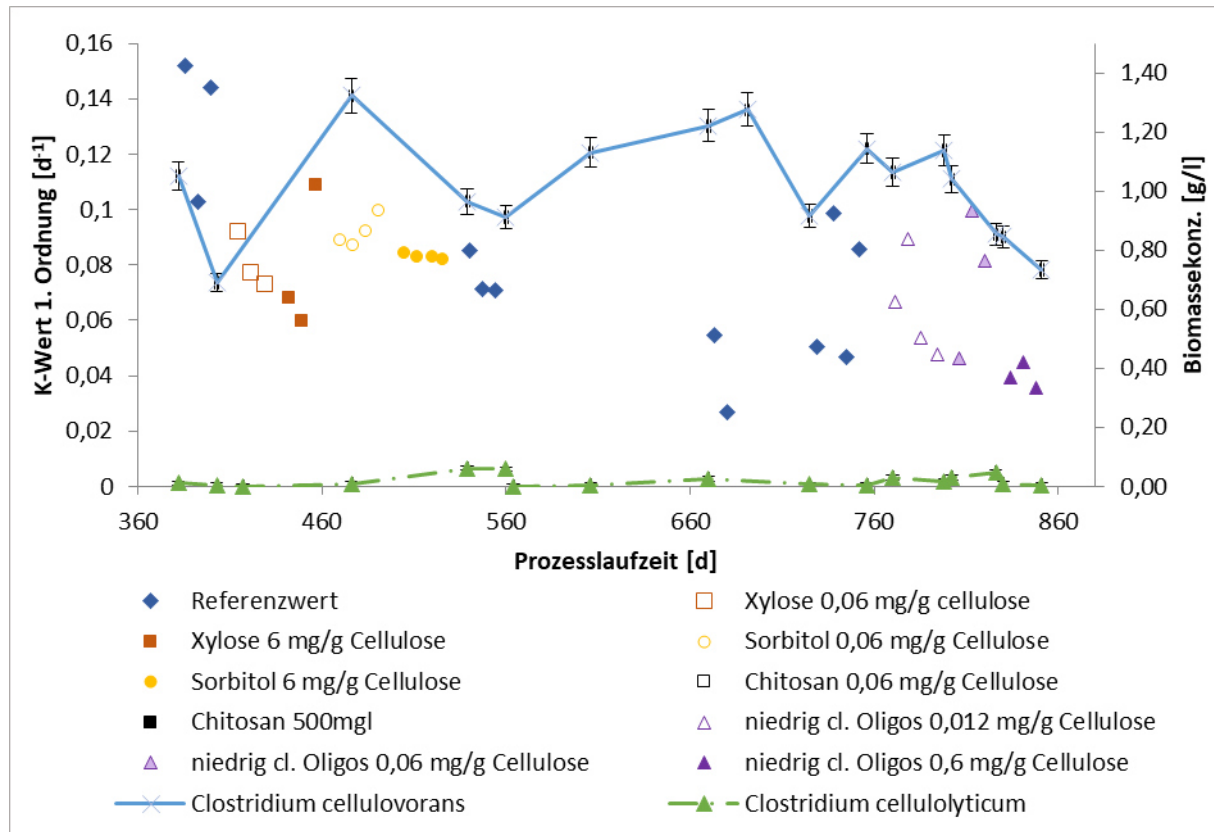


Abbildung 45: Veränderung der Konzentration von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* im Fermenter 2 während der Elicitortests. Die eingetragenen Punkte stellen den ermittelten  $k$ -Wert unter Einfluss des jeweiligen Elicitors dar. Die OLR betrug während der Tests  $4,8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und die HRT  $16,6 \text{ d}$ . Für die Ermittlung der Abbaukinetik wurde der Feed für jeweils  $26 \text{ h}$  unterbrochen. Der Referenzwert basiert auf der Abbaukinetik ohne Elicitorzusatz.

#### 6.7.4 Anpassung der cellulolytischen Leitspezies an den kontinuierlichen Betrieb mit synthetischem Feedmedium

Etwas anders ist die Situation im Fermenter 3, da hier anstatt der Elicitortests versucht wurde, das Fermentationssystem ans Limit zu treiben, um Aussagen über die Leistungsfähigkeit zu erhalten. Der Fokus des Monitorings wurde dabei auf 2 Phasen gelegt, in welchen keine Feedunterbrechungen zur Analyse der Celluloseabbaukinetik durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden noch die Clostridienkonzentrationen nach dem Fermentationsstart durch Zugabe der Inokula (Abschnitt 5.1) bestimmt. Diese sind in Abbildung 46 direkt auf der  $y$ -Achse eingetragen und weisen mit  $0,48 \text{ g l}^{-1}$  für *C. cellulovorans* und  $0,007 \text{ g l}^{-1}$  für *C. cellulolyticum* deutlich geringere Konzentrationen als in der weiteren Fermentation auf. Die Konzentration von *C. cellulovorans* ist die tiefste gemessene in Fermenter 3 überhaupt und für *C. cellulolyticum* ist nur 1 gemessener Wert an Tag 675 geringfügig niedriger. Die weiteren Analyseergebnisse in Abbildung 46 beziehen sich auf die erste Phase zwischen dem Beginn des Cellulosefeeds mittels der automatischen Pumpen und der ersten Kinetikermittlung. Diese zeigen bei der vergleichsweise geringen OLR von  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  noch eine niedrige Gesamtbiomassekonzentration von unter  $20 \text{ g l}^{-1}$  und auch die Konzentration von *C. cellulovorans* ist verglichen mit den Konzentrationen, welche in den Fermentern zu späteren Zeitpunkten auftreten mit  $0,7 - 0,9 \text{ g l}^{-1}$  noch vergleichsweise gering. Auffällig ist die bereits zu Beginn hohe Konzentration von *C. cellulolyticum*, der erste Messwert liegt hier bereits bei  $0,10 \text{ g l}^{-1}$  und steigt dann kurz vor dem ersten

Feedstop zur Analyse der Celluloseabbaukinetik bis auf  $0,17 \text{ g/l}^{-1}$  an. Dieser Wert wird in den in Abbildung 44 und Abbildung 45 zusammengefassten Ergebnissen für Fermenter 1 und 2 während der Elicitortests zu keiner Zeit erreicht.

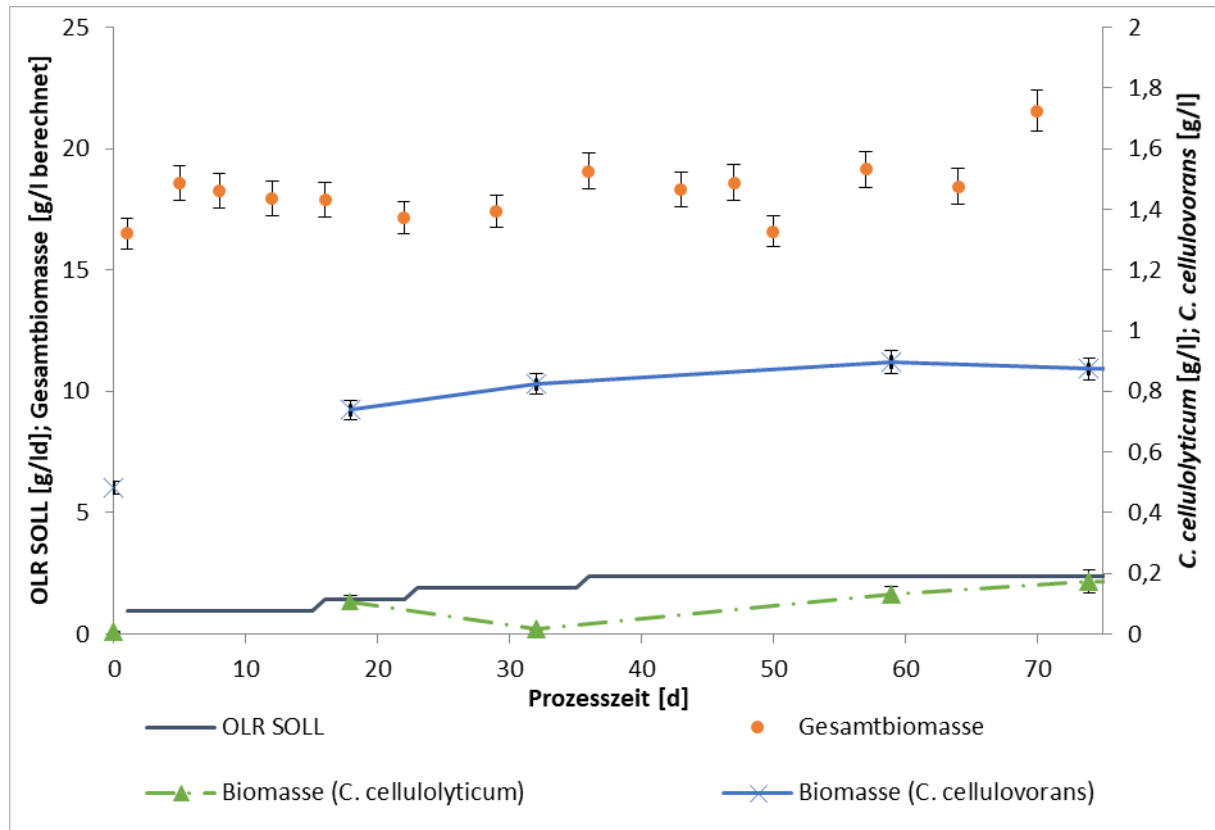


Abbildung 46: Verlauf der Gesamt- und Clostridienbiomasse zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation im Fermenter 3, bei vorsichtiger Erhöhung der Raumbelastung. Die Konzentration an cellulolytischen Leitspezies wurde mittels qPCR-bestimmt, während die Gesamtbiomasse aus der  $\text{oTS}$  Konzentration abzüglich der Restsubstratkonzentration berechnet wurde. Die Clostridienkonzentration auf der  $y$ -Achse beschreibt die Konzentration direkt zu Beginn der Fermentation wie in 6.2.3 beschrieben.

Auch im späteren Verlauf zeigt sich der größte Unterschied, die höhere Konzentration von *C. cellulolyticum* in Abbildung 47, obwohl die Gesamtbiomasse aufgrund der mit der höheren OLR einhergehenden geringeren Verweilzeit im Reaktor deutlich zurückgeht. Jedoch bleibt trotz der höheren *C. cellulolyticum* Konzentration im Vergleich zu Fermenter 1 und 2 ein deutlicher Unterschied zu *C. cellulovorans* bestehen. Darüber hinaus weisen die Konzentrationen von *C. cellulovorans* zu Beginn in Abbildung 47 nur eine geringe Schwankung auf, während für *C. cellulolyticum* im gleichen Zeitraum die Konzentration weniger konstant ist. Im Anschluss an die erforderliche Feedunterbrechung nach 588 Prozesstagen und einigen Versuchen, die Raumbelastung des Fermenters rasch wiederherzustellen, was mit unregelmäßigen Feedintervallen einherging, fällt die Konzentration bei den Messungen an den Prozesstagen 676 und 704 stark ab und erst der letzte Messwert zeigt wieder ein Erreichen des Niveaus vor der Feedunterbrechung an.

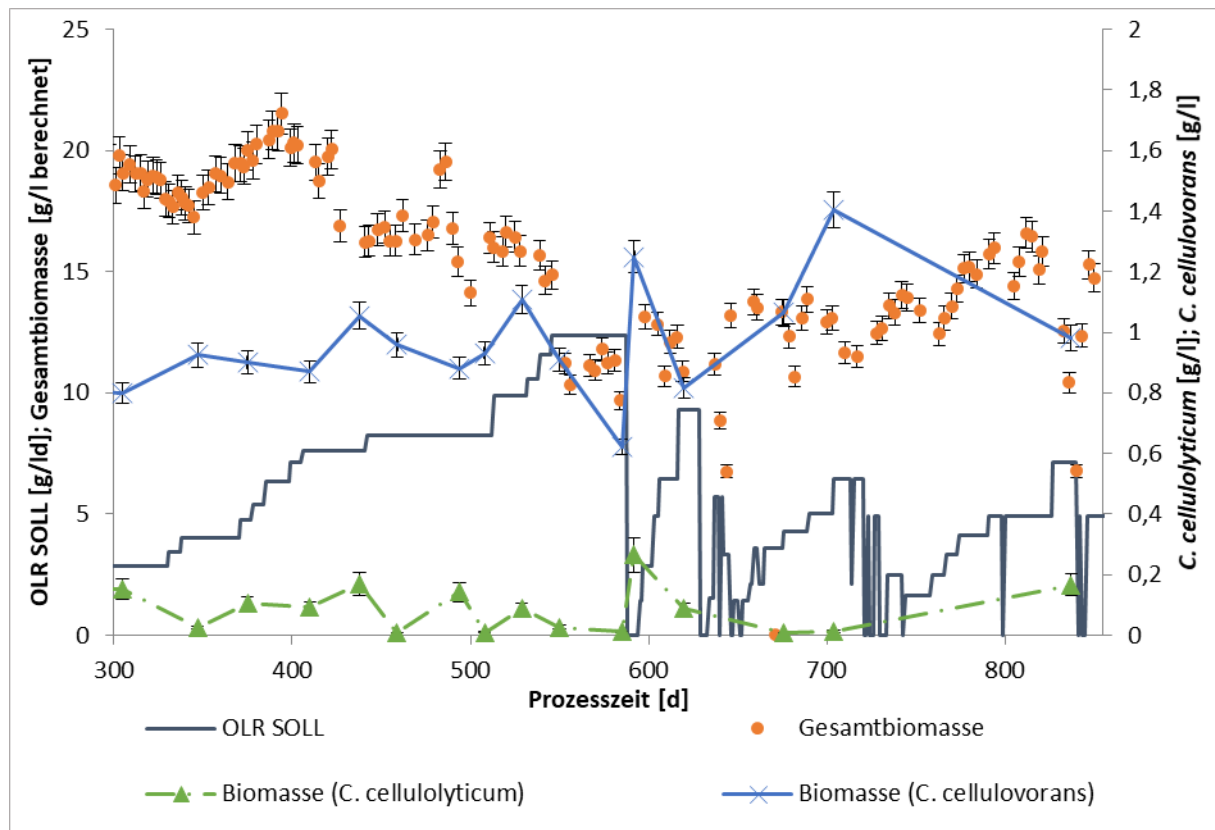


Abbildung 47: Verlauf der Gesamt- und Clostridienbiomasse bei Erhöhung der Raumbelastung bis zum Limit der kontinuierlichen Fermentation im Fermenter 3. Die Konzentration an cellulolytischen Leitspezies wurde mittels qPCR-bestimmt, während die Gesamtbiomasse aus der oTS Konzentration abzüglich der Restsubstratkonzentration berechnet wurde.

Bei *C. cellulovorans* kann mit der Erhöhung der Raumbelastung auch eine geringe aber kontinuierliche Zunahme der Konzentration beobachtet werden, welche auch nach der erfolgten Feedunterbrechung am Prozesstag 588 mit Ausnahme eines Messwerts nicht zurück geht. Während im Anschluss an diesem deutlichen Einschnitt sich die Gesamtbiomasse bei den Versuchen, die Raumbelastung wieder zu steigern, nur langsam wieder erhöht, können *C. cellulovorans* Konzentrationen wie vor dem Versäuern beobachtet werden, wobei Aussagen über *C. cellulovorans* aufgrund der geringen Probenanzahl schwierig bleiben. Zusammenfassend lässt sich über die cellulolytischen Leitspezies aussagen, dass deren Anteil an der Gesamtbiomasse mit steigender Raumbelastung ansteigt, da die Konzentration der Gesamtbiomasse abnimmt. Weiter kommt *C. cellulolyticum* im konstantem Fermenterbetrieb in weit größeren Konzentrationen als während der Elicitortests vor.

#### 6.7.5 Verhalten der cellulolytischen Leitspezies während der Kinetikermittlung durch Feedunterbrechung

Nicht nur während des regulären Fermenterbetriebs, sondern auch während der Feedunterbrechungen zur Evaluierung der Celluloseabbaukinetik wurden die cellulolytischen Leitspezies quantifiziert. Dies erfolgte nicht durchgehend, sondern wurde während 2 Kinetikermittlungen ohne Elicitorzusatz, sowie beim Testen einer Konzentration von 0,06 mg Celooligosaccharide  $g^{-1}$  Cellulose prinzipiell überprüft.

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse für *C. cellulolyticum* wiedergegeben und es ist eine deutliche Abnahme der Biomassekonzentration gegen Ende der Feedunterbrechung zu entnehmen. Diese fällt, nach einer stabilen Phase für 12 h, im ersten Versuch links um ca. 75 % und im zweiten Versuch rechts um 50 % ab, wobei diese qPCR-Messung zur besseren Absicherung wiederholt wurde.



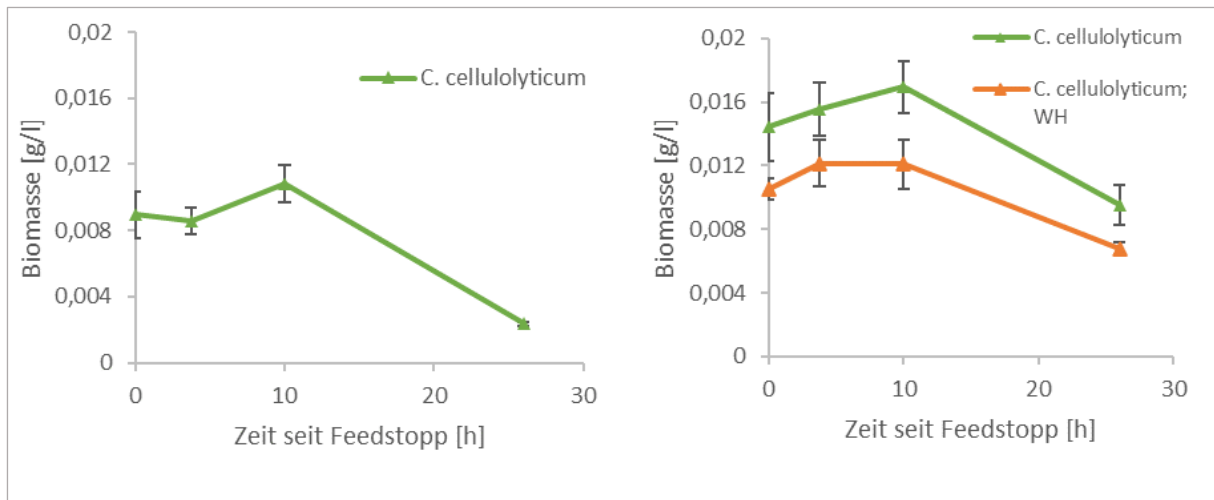


Abbildung 48: Verlauf der *C. cellulolyticum*-Konzentration während einer Feedunterbrechung von 26 h zur Ermittlung der Abbaugeschwindigkeit. Die Quantifizierung erfolgte mittels qPCR während der Ermittlung eines Referenzwertes (links) und während der Ermittlung des Einflusses des hergestellten Cellooligosaccharidmixes in der Konzentration von  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  (rechts) bei einer OLR von  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Letztere Messung wurde zur besseren Absicherung der Ergebnisse wiederholt.

Ein anderes Bild zeigt sich in Abbildung 49 für *C. cellulovorans*. Hier bleibt die Biomassekonzentration über den ganzen Stoppversuch hinweg konstant, sowohl für den ersten Versuch als auch für den durch Wiederholung bestätigten zweiten Versuch. Auffallend ist hier, dass sich die Anfangskonzentrationen doch deutlich unterscheiden. Die Konzentration des ersten Versuchs beträgt nur 66 % des zweiten Versuchs, was allerdings genauso bei *C. cellulolyticum* zu beobachten ist. Dieser Unterschied ist nicht unplausibel, da zwischen den Messungen ein zeitlicher Abstand von einem Monat liegt und das Testsystem einmal ohne und einmal mit Zusatz des Cellooligosaccharidmixes betrieben wurde.

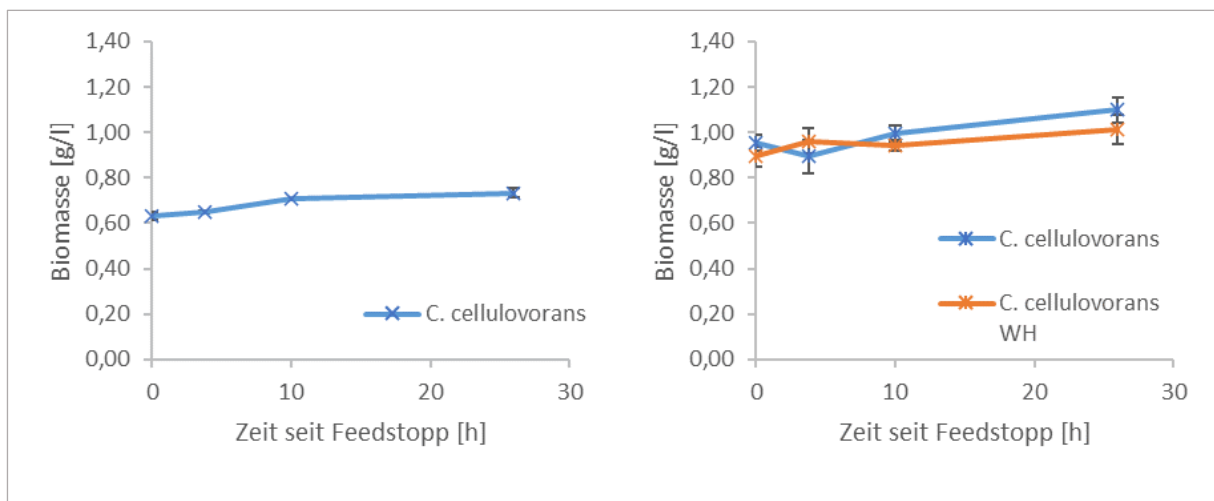


Abbildung 49: Verlauf der *C. cellulovorans*-Konzentration während einer Feedunterbrechung von 26 h zur Ermittlung der Abbaugeschwindigkeit. Die Quantifizierung erfolgte mittels qPCR während der Ermittlung eines Referenzwertes (links) und während der Ermittlung des Einflusses des hergestellten Cellooligosaccharidmixes in der Konzentration von  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  (rechts) bei einer OLR von  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Letztere Messung wurde zur besseren Absicherung der Ergebnisse wiederholt.

## 6.8 Kontrolle der erzeugten qPCR-Produkte

Zusätzlich zum Design speziesspezifischer Primer wurde die Spezifität der qPCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese und Schmelzpunktanalyse überprüft.

Für alle Analysen mittels Agarosegelelektrophorese ist exemplarisch ein Ergebnis in Abbildung 50 wiedergegeben. Im abgebildeten Gel wurden von Bahn 2 bis 15 qPCR-Produkte mit *C. cellulovorans* spezifischen Primern aufgetragen und von Bahn 17 bis 29 qPCR-Produkte mit *C. cellulolyticum* spezifischen Primern. Das gewünschte Produkt mit der Länge von 92 bp für *C. cellulovorans* kann

sowohl in den Bahnen 2 und 3, bei welchen die qPCR-Produkte der Standards aufgetragen wurden, als auch in den Bahnen 6 bis 15, bei welchen qPCR-Produkte von Fermenterproben analysiert werden, detektiert werden. Lediglich bei den NTC-Kontrollen, in den Bahnen 4 und 5 können abweichende, kürzere qPCR-Produkte detektiert werden.

Auch bei der Analyse der *C. cellulolyticum* spezifischen Produkte treten die gesuchten Banden mit einer Länge von 102 bp sowohl beim Standard in Bahn 17 als auch in den Produkten der Fermenterproben in Bahn 20 bis 29 auf. Der leichte Anstieg der Banden von Bahn 23 bis 29 wird auf Unregelmäßigkeiten im Gel zurückgeführt, da auch die Banden des 2-log Ladders in Bahn 30 ansteigen. Des Weiteren treten wie erwartet in den Bahnen mit NTC-Kontrolle 18 und 19 keine Banden auf. Darüber hinaus können auch sonst keine unspezifischen Banden detektiert werden.

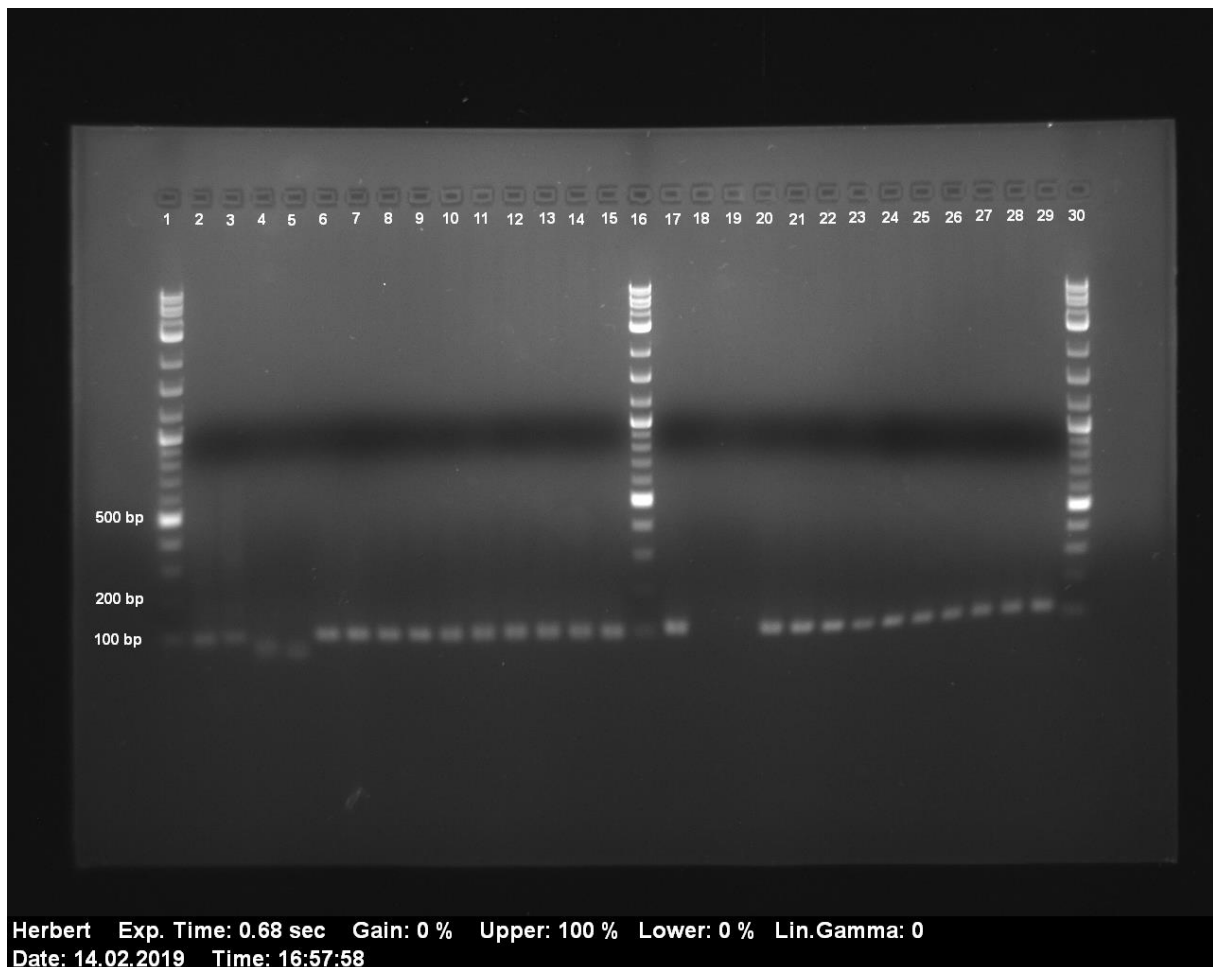


Abbildung 50: Agarosegel zur Analyse der qPCR-Produkte. Die qPCR-Produkte wurden bei 110 V für 50 min aufgetrennt und durch das im 2% Agarosegel vorhandene Stain Clear G gefärbt. Die Fragmentlänge wurde durch Vergleich des in Bahn 1, 16 und 30 aufgetragenen 2-log Ladders ermittelt. In Bahn 2-15 sind qPCR Produkte mit *C. cellulovorans*-spezifischen Primern aufgetragen; in Bahn 2 und 3 gDNA Standards aus den Biomasseverdünnungen in Bahn 4 und 5 die dazugehörigen NTCs und in den Bahnen 6 bis 15 die qPCR Produkte von Fermenterproben. Diesem Prinzip folgend sind in den Bahnen 17 – 29 qPCR Produkte mit *C. cellulolyticum*-spezifischen Primern aufgetragen, in Bahn 17 ein gDNA Standard aus den Biomasseverdünnungen, in Bahn 18-19 der dazugehörige NTC und in den Bahnen 20 bis 29 die qPCR Produkte von Fermenterproben.

Weniger eindeutig ist die Situation für die Analyse der Schmelzpunkte der qPCR-Produkte. Es treten wiederholt Abweichungen zwischen den Schmelzpunkten der Standards und der Fermenterproben bei den Analysen von *C. cellulolyticum* auf. Bei genauerer Betrachtung lassen sich die qPCR-Produkte in 2 Gruppen einteilen, welche exemplarisch in Abbildung 51 dargestellt sind. Die erste Gruppe wird in dieser Abbildung von der Probe aus Fermenter 1 vom 22.06.2016 repräsentiert. Diese Proben haben nicht nur einen Schmelzpunkt, der von den qPCR-Produkte der Standards maximal 0,5 °C abweicht,

sondern auch der gesamte Kurvenverlauf ist den Standards sehr ähnlich. Die zweite Gruppe zeigt, wie in Abbildung 51 durch die Proben von Fermenter 1 vom 22.07.2017 und Fermenter 3 vom 09.03.2018 veranschaulicht, eine deutliche Abweichung im Kurvenverlauf und auch der Schmelzpunkt ist um 0,5 – 1,0 °C höher als bei den Standards. Zur weiteren Überprüfung wurden die qPCR-Produkte in Plasmide kloniert und anschließend sequenziert (siehe auch Abschnitt 5.8.10).

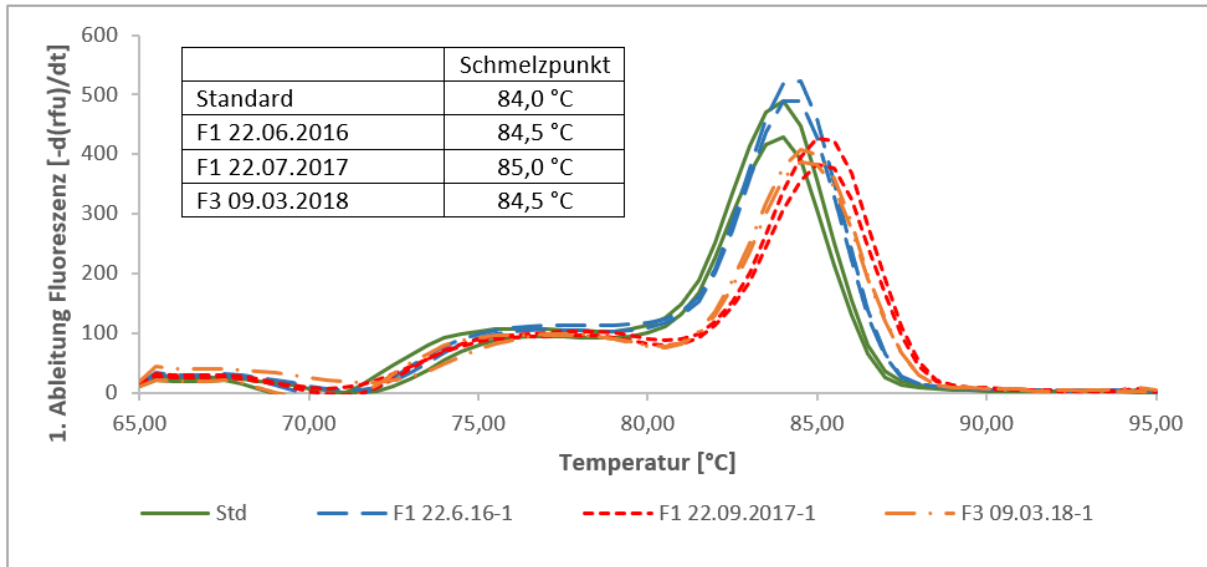


Abbildung 51: Schmelzpunktanalyse der qPCR-Produkte der Quantifizierung von *C. cellulolyticum*. Die Kurve wurde in einem Temperaturbereich zwischen 65 °C und 95 °C bei einer Heizrate von 0,5 °C pro 5 s aufgenommen und jeweils die Fluoreszenz gemessen. Zur besseren Erkennung des genauen Schmelzpunktes ist die 1. Ableitung ermittelt und abgebildet worden.

Auf Basis der Sequenzierungsergebnisse konnten 7 verschiedene Sequenzen der qPCR-Produkte für *C. cellulolyticum* identifiziert werden, welche in Tabelle 25 wiedergegeben sind. Proben, die einen Schmelzpunkt und Kurvenverlauf ähnlich der Standards aufweisen, sind dabei Gruppe 1 zuzuordnen. Diese weisen in 3 Basen Unterschiede in den Sequenzen der Standards auf. Beim Sequenzvergleich mittels BLAST ergibt sich dennoch *Ruminiclostridium cellulolyticum H10* als wahrscheinlichstes Ergebnis vor *Clostridium josui* und *Clostridium cellobioparum* mit 5 bzw. 6 abweichenden Basenpaaren. Die Gruppen 2 bis 7 treten bei einem Schmelzpunkt und Kurvenverlauf der 2. in Abbildung 51 abgebildeten Art auf. Auch alle Sequenzen dieser Gruppen wurden mit BLAST gegen verfügbare Datenbanken abgeglichen. Dabei ergibt sich für Gruppe 2 als wahrscheinlichstes Ergebnis *C. cellulolyticum* mit 99/102 Übereinstimmungen vor einem unkultivierten Bakterium mit 98/102 Übereinstimmungen. Die höchste Sequenzübereinstimmung für Gruppe 3 ergibt sich mit *C. cellulolyticum* mit 98/102 richtigen Basenpaaren vor *C. josui* mit 96 von 102 und *C. cellobioparum* mit 95 von 102 Basen. Ein ähnliches Ergebnis wird für Gruppe 4 erhalten, hier weist ebenfalls *C. cellulolyticum* die beste Übereinstimmung auf, mit 97/102 bp vor *C. clariflavum* und *C. josui* mit jeweils 95/102 bp. Etwas anders ist das BLAST Ergebnis für die Gruppen 5, 6 und 7, da hier die Sequenzübereinstimmung jeweils gleichgroß für *C. cellulolyticum*, *C. clariflavum* und *C. straminisolvens* mit je 96/102 bzw. 95/102 bp ist. Hier ist jedoch zu beachten, dass sowohl für *C. clariflavum* und *C. straminisolvens* am Vorwärtsprimer eine Sequenzabweichung von 3 Basenpaaren besteht, wobei 2 unpassende Basenpaare nebeneinander 5 und 6 Basen aufwärts vom 3' Ende des Primers vorhanden sind.

Tabelle 25: Zusammenfassung und Einteilung der Sequenzierungsergebnisse der qPCR-Produkte aus der Quantifizierung von *C. cellulolyticum* durch GATC Biotech (Köln, Deutschland). Die Abweichungen in der Nucleotidsequenz sind in Rot gekennzeichnet und nach der ermittelten Sequenz in Gruppen geordnet.

Prod.	Sequenz
STD:	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCAATTAGCTAGTTGGTGATGTAACGGATCACCAAGGCGACGATTGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 1	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCAATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATTGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 2	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATTGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 3	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCAATTAGCTAGTTGGCGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATTGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 4	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCAATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGAGCGATCGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 5	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGAGCGATCGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 6	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGAGCGATCGGTAGCCAAACTGAAGGTTGATCGGC-3'
Grp 7	5'-GGAGCAATTCGGTGACAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGTTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCGAGCGATCGGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC-3'

Auch bei der Schmelzpunktanalyse von *C. cellulovorans* wurden Abweichungen des Schmelzpunkts zwischen den qPCR-Produkten der genomischen DNA Standards und der metagenomischen Fermenterproben festgestellt. Wie in Abbildung 52 dargestellt ist hier der Kurvenverlauf der Proben homogener und weist geringere Abweichungen von den Standards auf als bei *C. cellulolyticum*. Trotzdem lässt sich eine Abweichung von 0,5 – 1,0 °C des Schmelzpunktes feststellen. Um die Bildung unspezifischer qPCR-Produkte auszuschließen, wurden diese Produkte sequenziert, wobei die gleichen Proben wie auch für *C. cellulolyticum* ausgewählt wurden.

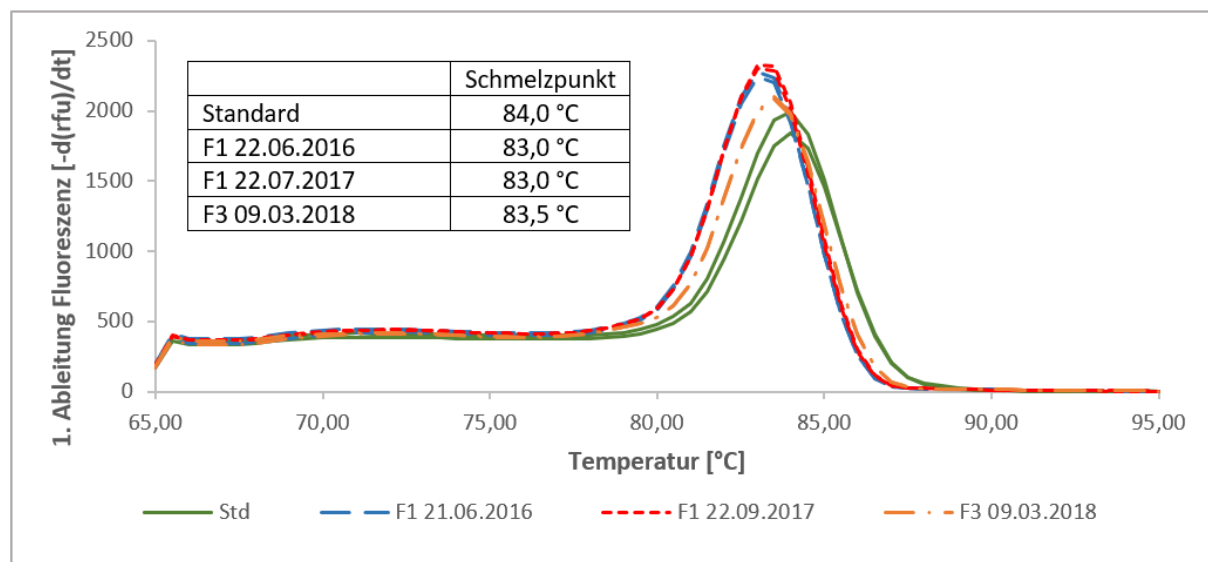


Abbildung 52: Schmelzpunktanalyse der qPCR-Produkte der Quantifizierung von *C. cellulovorans*. Die Kurve wurde in einem Temperaturbereich zwischen 65 °C und 95 °C bei einer Heizrate von 0,5 °C pro 5 s aufgenommen und jeweils die Fluoreszenz gemessen. Zur besseren Erkennung des genauen Schmelzpunktes ist die 1. Ableitung ermittelt und abgebildet worden.

In den sequenzierten Proben konnten 2 unterschiedliche Nucleotidsequenzen identifiziert werden, welche aus Tabelle 26 entnommen werden können. Erstere der Sequenzen ist dabei identisch zu den Sequenzierungsergebnissen des Standards und ist damit eindeutig *C. cellulovorans* zuzuordnen. Die zweite Gruppe der gefundenen Sequenzen weist allerdings im Vergleich zur Standardsequenz eine Abweichung von 2 Basenpaaren auf, sodass die Identität mittels BLAST überprüft wurde. Das Ergebnis dieser Analyse ergab den höchsten Score für *C. cellulovorans* und nur mit geringerer Wahrscheinlichkeit stimmt die Sequenz in Gruppe2 mit *C. aciditolerans* überein.

Tabelle 26: Zusammenfassung und Einteilung der Sequenzierungsergebnisse der qPCR-Produkte aus der Quantifizierung von *C. cellulovorans* durch GATC Biotech (Köln, Deutschland). Die Abweichungen in der Nucleotidsequenz sind in Rot gekennzeichnet und nach der ermittelten Sequenz in Gruppen geordnet.

Prod.	Sequenz
STD:	5'-GAGGTGACAGGAAGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCATTATG-3'
Grp 1	5'-GAGGTGACAGGAAGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCATTATG-3'
Grp 2	5'-GAGGTGACAGGAAGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTAGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCATTATG-3'

### 6.9 Ergebnisse des Nachweisversuchs von *C. thermocellum*

Neben *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* wurde auch versucht *C. thermocellum* nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte direkt aus dem Fermenter und aus einer Fermenterprobe, welche in CM3 Medium (Abschnitt 4.6.6) bebrütet wurde. Leider kann aus dem in Abbildung 53 abgebildeten qPCR-Lauf entnommen werden, dass sowohl in allen drei Fermentern, als auch in den angelegten Kulturen die cq-Werte mit den spezifischen *C.th* Primern nur auf Niveau der NTC liegen.

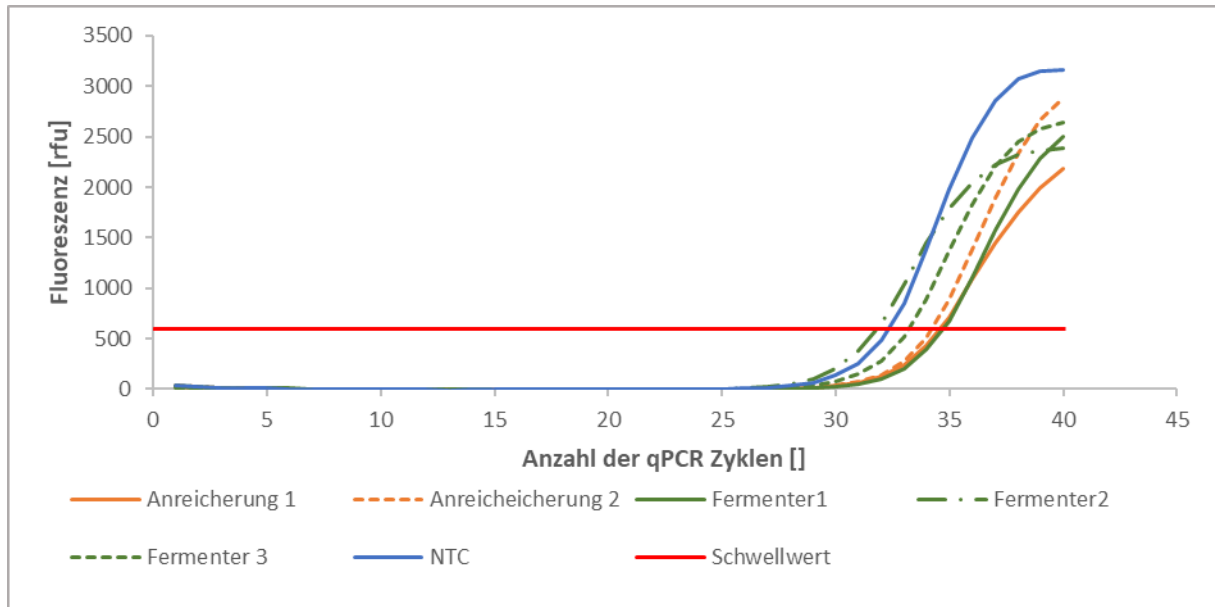


Abbildung 53: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Ermittlung der cq-Werte zum Nachweis von *C. thermocellum*. Der qPCR-Lauf wurde bei einer Primerkonzentration *C.th* von 400 nM und einer Annealingtemperatur von 60 °C für 30 s durchgeführt. Das Anlegen der Anreicherungskulturen erfolgte zu Beginn des Feedstarts, während die Fermenterproben am Fermentationstag 86 gezogen wurden.

## 7 Diskussion

### 7.1 Inokula

#### 7.1.1 Eignung des Inokulums

Für die Inokulierung der Biogasfermenter wurde Fermenterinhalt aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen, welche überwiegend mit cellulosehaltigem Material wie Grassilage und Maissilage betrieben werden, verwendet. Darüber hinaus wurde noch Getreide und Putenmist als Substrat verwendet.

Aus dem Vergleich mit Literaturdaten zeigt sich, dass beide Fermenter mit einem vergleichsweise hohen Trockensubstanzanteil betrieben wurden, da die üblichen 8 bis 15 % Trockensubstanz (Kaiser et al., 2008) doch mit 18,5 % und 14,2 % teilweise überschritten werden. Der Gehalt an organischer Trockensubstanz beträgt üblicherweise 70 bis 80 % der Trockensubstanz (Kaiser et al., 2008) und liegt somit bei beiden Anlagen im normalen Bereich.

Zur Einordnung der C:N:P:S und des C:N Verhältnisse, welche üblicherweise 450:15:5:1 und 10:1 bis 30:1 betragen sollten (Hauer, 1993; Kaiser et al., 2008), müssen diese umgerechnet werden. Dadurch kann für beide Inokula ein C:N Verhältnis von 14:1 abgeleitet werden, was die Anforderungen erfüllt, allerdings schon auf einen höheren Stickstoffanteil im Substrat schließen lässt. Dies wird noch deutlicher, wenn das unter Abschnitt 6.1.1 berechnete C:N:P:S Verhältnis auf 300:22:8:1 vereinfacht wird. Es zeigt sich, dass Stickstoff und Phosphor erhöht und Kohlenstoff geringer im Vergleich zu anderen Biogasanlagen ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist der Einsatz von hoch-N-belastetem Substrat wie Putenmist in den Biogasfermentern. Die komplexe Biozönose kann allerdings an solche Abweichungen angepasst werden, wie das auch schon für  $\text{NH}_4\text{-N}$  gezeigt wurde. Üblicherweise gelten für  $\text{NH}_4\text{-N}$  Grenzen von 50 – 2000  $\text{mg l}^{-1}$  (Kaiser et al., 2008), jedoch wurde bei angepasster Biozönose auch schon eine Biogasproduktion bei Konzentrationen von bis zu 3,7 – 4,2  $\text{gl}^{-1}$  festgestellt (Mahdy et al., 2017). Somit sind auch die gemessenen Konzentrationen von  $\text{NH}_4\text{-N}$  in beiden Inokula von 3,7 und 2,0  $\text{gl}^{-1}$  (Inokulum Hohenwart und Inokulum Schrassig) durchaus plausibel. Wie auch beim Ammoniumstickstoff so ist auch der gemessene pH-Wert leicht erhöht und liegt mit 7,8 im Inokulum 2 nur knapp unterhalb und im Inokulum 1 mit 8,2 etwas oberhalb üblicher Grenzwerte von 6,4 – 8,0 (Dissemond, 1993; Koster, 1989).

Trotz der vergleichsweise erhöhten Werte für Trockenmasse,  $\text{NH}_4\text{-N}$  und des pH-Wertes konnte während des Ausgärens der Inokula konstante Biogasbildung beobachtet werden, sodass diese zum Durchführen der Fermentationsversuche herangezogen wurden.

### 7.2 Langfristige Fermentation mit vollsynthetischem Medium

#### 7.2.1 Entwicklung des Fermentationsmediums

Für den Betrieb der Fermenteranlagen war es wichtig, ein geeignetes Medium zu finden, das einerseits ein stabiles Wachstum der sensiblen mikrobiellen Biozönose erlaubt und andererseits eine genau definierte chemische Zusammensetzung aufweist, damit der Effekt von möglichen Elicitormolekülen ohne Nebeneffekte beobachtet werden kann. Trotz gründlichster Recherche konnte kein bekanntes vollsynthetisches Medium gefunden werden, welches nachweislich für den permanenten Betrieb eines Biogasfermenters geeignet ist. Obwohl die aktuelle Forschung einen großen Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ausweist, wurden bis jetzt lediglich Batchprozesse mit synthetischen Medien durchgeführt (Hendriks et al., 2018; Pobeheim et al., 2010). Folglich war eine der wichtigsten Aufgaben zu Projektbeginn, ein Medium mit den geforderten Eigenschaften zu entwickeln.

Die dazu durchgeführten repeated Batchtests mit den Medien MJ, M141 und L47 zeigen insgesamt ein homogenes Bild mit der Ausnahme von Überimpfung<sup>2</sup> (Abbildung 12), bei welcher eine vergleichsweise lange Lagphase auftritt und auch die üblichen Endvolumina bei Verwendung des MJ-Mediums nicht erreicht werden. Eine mögliche Erklärung für diese Auffälligkeit ist eine Schädigung des verwendeten Inokulums durch Luftsauerstoff, da beim Befüllen der Kolbenprober diese Gefährdung nicht ausgeschlossen werden kann. Trotzdem lassen die Ergebnisse den eindeutigen Schluss zu, dass das MJ-Medium die größte Biogasproduktion bei vollständigem Substratabbau erlaubt. Der Umsatz kann durch Zusatz der Spurenelementlösung aus dem M141 Medium beschleunigt werden, jedoch wird durch die hohen Essigsäurekonzentrationen von bis zu  $6 \text{ g l}^{-1}$  deutlich, dass dieses Medium nicht die notwendigen Anforderungen methanogener Mikroorganismen erfüllt und somit das Substrat nicht vollständig zu Biogas umgesetzt werden kann. Eine andere Erklärung abseits der falschen Medienzusammensetzung könnte auch die Versuchsdauer von 20 d sein, da die Überimpfungen 2 und 4 gegen Ende noch eine Gasbildung erkennen lassen, die auf einen unvollständigen Substratabbau hinweist. Im Gegensatz dazu ist bei den Überimpfungen 1 und 3 der Verlauf der Gasproduktion gegen Versuchsende bereits abgeflacht und trotzdem sind bei diesen Ansätzen signifikante Essigsäurekonzentrationen vorhanden (Tabelle 20). Folglich kann die Versuchsdauer nicht die alleinige Ursache für die hohen Essigsäurekonzentrationen sein.

Von allen getesteten Medien ist das M141-Medium am besten an die Bedürfnisse von methanogenen Mikroorganismen angepasst, sodass eine 1:1 Mischung der Medien MJ- und M141 sowohl die für die hydrolytischen, als auch für die methanogenen Mikroorganismen benötigten Komponenten enthalten müsste. Aufgrund eines knappen Zeitplans wurde diese 1:1 Mischung für den Beginn des kontinuierlichen Betriebs der Biogasfermenter ohne weitere Vorversuche verwendet.

Beim Einsatz im Fermenter zeigten sich rasch einige Limitierungen, welche kurzfristig behoben werden konnten. So bewirkte eine Veränderung der Calcium und Magnesium Zugabe eine bessere Löslichkeit dieser. Das Verwenden der Spurenelementlösung des 141 Methanogenium Mediums anstelle der RPMI 1640 Vitaminlösung, sowie eines Phosphatpuffersystems anstelle der 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, wirkte sich positiv auf die Kosten des neu entwickelten Mediums aus. Darüber hinaus konnte durch die Zugabe von Vitamin B12 auf Methionin verzichtet werden. Ein Problem welches trotz der Anpassung der Pufferkomponenten und pH-Wert Erhöhung des Substrats nicht in den Griff zu bekommen war, war das kontinuierliche Absinken des pH-Wertes der Fermenterbrühe. Zunächst wurde bewusst auf eine externe pH-Regulierung verzichtet, da dies in realen Biogasanlagen üblicherweise nicht notwendig ist. Hier sorgt ein Bicarbonat-Puffersystem für einen stabilen pH-Wert und das Substrat stellt ausreichend Pufferkapazität bereit, um den Einfluss von gebildeten flüchtigen Fettsäuren auszugleichen, sodass der pH-Wert zwischen 6,8 und 7,3 gehalten werden kann (Dobre et al., 2014). Erst als sich abzeichnete, dass keine der unternommenen Medienanpassungen den gewünschten Effekt erzielten, wurde der pH-Wert manuell auf 6,5 und schließlich auf 7,0 eingestellt. Das Fermentationssystem reagierte auf diesen externen Eingriff mit der Erhöhung der Konzentration an flüchtigen Fettsäuren (Abbildung 13, ab Tag 96), was ein Anzeichen für eine gestörte acetoklastische oder hydrogenotrophe Methanogenese ist. Leider fiel in diesen Zeitraum auch ein, durch ein Unwetter verursachter Stromausfall, welcher aufgrund des dadurch entstandenen Ausfalls der elektrischen Heizung der Fermenter eine zusätzliche Belastung der Fermenter bedeutete und schließlich zum vollständigen Erliegen der Biogasproduktion führte. Erst die erneute Zugabe der für den Prozessstart verwendeten Inokula ermöglichte ein Fortführen der Fermentation. Als die Essigsäurekonzentration sich wieder unter  $200 \text{ mg l}^{-1}$  befand, wurde der Prozess durch die Substratzufuhr über 2 Pumpenkanäle neu gestartet. Für die folgenden Experimente gilt dieser Neustart als eigentlicher Fermentationsbeginn.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse und der unternommenen Anpassungen in der Medienzusammensetzung konnten die Fermenter langfristig und kontinuierlich betrieben werden und es waren in den folgenden 855 Fermentationstagen lediglich 2 weitere Anpassungen notwendig. Nach 241 Tagen wurde nach vorangegangener Analyse die Konzentration der Spurenelemente Nickel, Selen, Wolfram und Eisen angepasst und nach 385 Tagen wurde, um die Raumbelastung weiter steigern zu können, die Cellulosekonzentration erhöht.

### 7.2.2 Austesten der Grenzen des vollsynthetischen Fermentermediums

Aus dem Verlauf der Biogasproduktion in Fermenter 3, dessen Ergebnisse in Abschnitt 6.2.4 wiedergegeben sind, geht deutlich hervor, dass mit dem neu entwickelten synthetischen Medium eine kontinuierliche Biogasproduktion über einen langen Zeitraum hinweg möglich ist. So konnte der Betrieb über 588 Tage ohne Zugabe von frischem Inokulum aufrechterhalten werden. In dieser Zeit konnte eine Raumbelastung von  $8,3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  bei einer hydraulischen Verweilzeit von 9,6 d über einen Zeitraum von 69 d realisiert werden, währenddessen die organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure auf niedrigem Niveau verblieben und sich auch die Restsubstratkonzentration nur in geringem Ausmaß erhöhte. Der Zeitraum von 69 d entspricht unter den gewählten Bedingungen sieben hydraulischen Verweilzeiten, daher ist auch davon auszugehen, dass ein permanenter Betrieb mit diesen Bedingungen möglich ist. Nach dem Verein Deutscher Ingenieure (VDI-Richtlinie 4630) sind bei einem Wechsel des Eingangssubstrats drei – fünf Verweilzeiten notwendig, um wieder konstante Bedingungen im Fermenter zu erhalten, denn nach 3 Verweilzeiten kann davon ausgegangen werden, dass bei vollständiger Durchmischung 95 % der Fermenterbrühe ausgetauscht wurden. Diese Anforderung wurde mit 7 Verweilzeiten deutlich überschritten.

Als dann in weiterer Folge die Raumbelastung auf  $12,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  erhöht und gleichzeitig die hydraulische Verweilzeit auf 6,4 d verkürzt wurde, führte dies innerhalb von 42 Tagen zum Versäuern des Fermenters und zum vollständigen Erliegen der Biogasproduktion. Auch dieses „Umkippen“ nach einer zu hohen Belastung kann als weiteres Anzeichen für die Eignung des entwickelten synthetischen Mediums als Ersatz für natürliche Substrate angesehen werden. Denn wie auch bei realen Biogasanlagen war vorab schon eine Erhöhung der flüchtigen Fettsäuren und auch der Restsubstratkonzentration festzustellen. So wurde beispielsweise bei einer Steigerung der Raumbelastung um den Faktor 2,8 innerhalb von 49 d bei einer HRT von 28,5 d ebenfalls ein signifikanter Anstieg der flüchtigen Fettsäuren bei einer Monofermentation mit Zuckerrübe beobachtet (Goux et al., 2015). Außerdem wurden bereits ähnliche Prozesslimitierungen für die einstufige Vergärung von Haushaltsabfall publiziert, wo das Optimum bei einer HRT von 7 d und einer OLR von  $3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  ermittelt wurde und bei einem Betrieb bei einer HRT von 5 d und einer OLR von  $4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  wurde durch einen erhöhten Wert für organische Säuren ein instabiler Prozess angezeigt (Aslanzadeh et al., 2014).

Als nach der Versäuerung versucht wurde, erneut eine Raumbelastung von  $8,3 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  zu erzielen, konnte dies mit kurzfristigen Maßnahmen nicht erreicht werden, da die flüchtigen Fettsäuren einen instabilen Prozess anzeigten. Erst als im Anschluss daran ein langsamerer Ansatz verfolgt wurde, konnte kurzzeitig eine Raumbelastung von  $7,1 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  erzielt werden, bevor das Projekt aufgrund der zeitlichen Limitierung abgebrochen werden musste.

## 7.3 Eignung der Teststrategie sowie der unterschiedlichen Kinetikmodelle

### 7.3.1 Die Analyse des Celluloseabbaus

Durch den kontinuierlichen Betrieb der Fermenter mit dem neu entwickelten synthetischen Fermentermedium kann die Unsicherheit von Substratveränderungen ausgeschlossen werden. Trotzdem wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von Cellulose auch zwischen den Elicitortests wiederholt überprüft, um Veränderungen feststellen zu können, anstatt einen anfangs ermittelten



Wert als Referenz zu verwenden. Dies verlangte jedoch nach einer Testmethode, welche in kurzer Zeit die Ermittlung der Hydrolysegeschwindigkeit erlaubt. Beim Abwarten von konstanten Bedingungen im Fermenter ist nach Änderungen ein konstanter Betrieb von drei bis fünf hydraulischen Verweilzeiten erforderlich (VDI-Richtlinie 4630), was mit der minimalen für Elicitortests verwendeten Verweilzeit von 16 d einem Zeitbedarf von 48 – 80 d entsprochen hätte. Um diesen Zeitbedarf zu verringern, wurde der unter Abschnitt 5.6.2 beschriebene Ansatz verwendet, in welchem die Celluloseabbaugeschwindigkeit auf Basis der abnehmenden Substratkonzentration nach Unterbrechen der Substratzugabe ermittelt wird. Dieser Ansatz beruht darauf, dass nicht die Auswirkung des Elicitors auf die gesamte Fermenterbiozönose ermittelt wird, sondern lediglich Veränderungen der durch Cellulasen bewirkten Hydrolyse erfasst werden müssen, die aufgrund des raschen Wachstums von Clostridien und deren rascher Proteinproduktion (Gelhaye et al., 1993; Matsui et al., 2013), bereits nach einer Woche nach Elicitorzusatz erfasst werden. Gemeinsam mit einer 2-fachen Wiederholung nach je 7 Tagen verkürzt sich der Zeitaufwand für die Ermittlung der Hydrolysegeschwindigkeit von Cellulose auf 28 d.

Bezüglich der Länge der Substratunterbrechung wurde basierend auf Beobachtungen während der ersten Testserie von Elicitoren bei einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  festgestellt, dass die Substratabnahme besonders in den ersten 12 h nach dem Unterbrechen der Substratabnahme erfolgt und diese zu späteren Zeitpunkten nicht mehr einer Reaktion 1. oder 2. Ordnung entspricht. Deshalb wurde die Feedunterbrechung von 49,5 h auf 26 h reduziert, wobei das Probenahmeintervall in den ersten Stunden verdichtet wurde (siehe auch Abschnitt 6.3.2). Als weitere Anpassung wurde die Raumbelastung auf  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  verdoppelt und die hydraulische Verweilzeit auf 16 d verkürzt, um einer verringerten Restsubstratkonzentration entgegen zu wirken. Um die Ergebnisse trotz dieser Umstellung der Feedstopp-Dauer vergleichbar zu halten, wurden für die abschließenden Auswertungen nur Messwerte bis 30 h nach der Feedunterbrechung herangezogen. Dies hatte neben der besseren Vergleichbarkeit den zusätzlichen positiven Effekt, dass über alle Kinetikermittlungen hinweg die Modellfehler RMSE um ein Viertel und MRD sogar um über ein Drittel reduziert werden konnten.

Ein wichtiger Schritt bei der Verwendung von restsubstratbasierten Modellen, war es abzuklären, ob sich im Substrat nicht bzw. schwer abbaubare Bestandteile befanden. Dazu wurde ein Modell 1. Ordnung mit einer Anpassung an unvollständigen Substratabbau verwendet (Gleichung [16]), welches auf alle zur Kinetikermittlung erfassten Datensätze angewandt wurde. Nach dem Fitten des Modells an die ermittelten Restsubstratkonzentrationen konnte anhand des  $\beta$ -Werts abgelesen werden, mit welchem angenommenen, nicht abbaubaren Substratanteil der Verlauf des Substratabbaus am besten erklärt werden kann. Die wahrscheinlichste Erklärung war dabei eine nicht abbaubare Substratfraktion von 0 %, also die vollständige Abbaubarkeit, während in den Fällen, wo das Substrat als nicht abbaubar angesehen wurde, kein eindeutiger Schluss auf einen bestimmten Anteil möglich ist. Dieses Ergebnis zusammen mit der aus der Literatur bekannten vollständigen Abbaubarkeit von mikrokristalliner Cellulose, welche sogar als Referenzsubstanz für die anaerobe Substratabbaubarkeit verwendet wird (VDI-Richtlinie 4630), führt zu der Schlussfolgerung, dass nicht abbaubare Anteile im Substrat nicht anzunehmen sind, und daher bei der Berechnung der Hydrolysegeschwindigkeit von Cellulose nicht weiter berücksichtigt werden.

### 7.3.2 Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung

Aus den Ergebnissen der Vergleiche über die Modellfehler im Abschnitt 6.3.4 geht hervor, dass zwischen den Modellen 1. und 2. Ordnung keine deutlichen Unterschiede in der Anpassung an die gemessenen Restsubstratkonzentrationen bestehen. In der Fachliteratur hingegen werden dem Modell 2. Ordnung als komplexerem Modell Vorteile zugesprochen, da dieses auch eine Veränderung der Biomassekonzentration berücksichtigen kann. Dies bringt vor allem in Batchprozessen Vorteile, wo

eine stärkere Zunahme der Biomassekonzentration zu beobachten ist (Holwerda und Lynd, 2013). Das ist bei dem verwendeten System der Feedunterbrechung nicht zu erwarten, da die Biomasse durch den langfristigen und kontinuierlichen Betrieb schon zu Experimentbeginn vorhanden ist und nach dem Unterbrechen der Substratzufuhr von keinem Biomassewachstum mehr auszugehen ist. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Biomassekonzentration von *C. cellulovorans* in Abbildung 49, wo eine konstante Biomassekonzentration über die gesamte Dauer der Unterbrechung der Substratzufuhr festgestellt wurde. Die Biomassekonzentration von *C. cellulolyticum* (Abbildung 48) verringert sich sogar, befindet sich aber im Konzentrationsniveau deutlich unter dem von *C. cellulovorans* und dürfte daher nur geringen Einfluss auf den Celluloseabbau haben.

Hinzu kommt bei dem Modell 2. Ordnung die Schwierigkeit, die Biomasse gravimetrisch zu quantifizieren, da diese über den zellwandgebundenen Multienzymkomplex an nicht umgesetzter, unlöslicher Cellulose gebunden ist. Der Versuch einer Näherung erfolgte anhand des Ausbeutekoeffizienten  $Y_{x/s}$  nach VDI-Richtlinie 4630, sowie aus der organischen Trockensubstanz abzüglich des Restsubstrats. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst und es zeigt sich, dass die aus dem Ausbeutekoeffizienten berechneten Konzentrationen ungefähr um den Faktor 2 geringer sind als die Abschätzung aus der organischen Trockensubstanz, was die Unsicherheit, die einfachen Abschätzungen anhaftet, verdeutlicht. Eine Erklärung für die große Differenz zwischen den Biomassekonzentrationen könnten sein, dass der für reale Biogasanlagen gültige Ausbeutekoeffizient  $Y_{x/s}$  nicht im Versuch mit synthetischem Medium gilt.

Wie oben bereits diskutiert, bringt der Einsatz des Modells 2. Ordnung keine Verbesserung gegenüber dem Modell 1. Ordnung, da der größte Vorteil, die Berücksichtigung einer Veränderung in der Biomassekonzentration, nicht zur Geltung kommt. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Biomassekonzentration, wegen der Bindung an die Zellwand nur abgeschätzt werden konnte, sodass für die weitere Analyse der Hydrolysegeschwindigkeit von Cellulose, sowie für den Einfluss der Anwendung von Elicitoren das Modell 1. Ordnung verwendet wird. Modelle 1. Ordnung sind aktuell weiter verbreitet und gehören zum Standardverfahren, um den Substratabbau in Biogasanlagen zu charakterisieren (VDI-Richtlinie 4630). Darüber hinaus sind dazu bereits Hydrolysegeschwindigkeiten von Cellulose publiziert und ermöglichen so eine Einordnung in einen größeren Kontext (Gujer und Zehnder, 1983; Liebetrau et al., 2004).

Tabelle 27: Übersicht über berechnete Biomassekonzentrationen  $[x_t]$  nach 2 Methoden zu Beginn der Kinetikermittlung der Referenzwerte ohne Elicitorzusatz. Referenzwert Fermenter 2 während den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  wurde als 4-fach Bestimmung durchgeführt, während die anderen Biomassekonzentrationen aus 3-fach Ansätzen errechnet wurden.

	<b>Biomasse (<math>x_t</math>) [<math>\text{gl}^{-1}</math>] berechnet nach Gleichung [18]</b>	<b>Biomasse (<math>x_t</math>) [<math>\text{gl}^{-1}</math>] berechnet aus der oTS abzüglich der Restsubstratkonzentration</b>
Referenzwert Fermenter 1 vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	4,14 $\pm$ 0,04	8 $\pm$ 5
Referenzwert Fermenter 1 nach den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	4,20 $\pm$ 0,01	10 $\pm$ 1
Referenzwert Fermenter 1 vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,73 $\pm$ 0,03	11,8 $\pm$ 0,5
Referenzwert Fermenter 1 während den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,71 $\pm$ 0,02	11 $\pm$ 1
Referenzwert Fermenter 1 während den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,69 $\pm$ 0,05	11,6 $\pm$ 0,8
Referenzwert Fermenter 2 vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	4,16 $\pm$ 0,05	10 $\pm$ 6
Referenzwert Fermenter 2 vor den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,76 $\pm$ 0,03	11,6 $\pm$ 0,5
Referenzwert Fermenter 2 während den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,69 $\pm$ 0,01	12,3 $\pm$ 0,5
Referenzwert Fermenter 2 während den Abbaukinetikermittlungen bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$	6,64 $\pm$ 0,07	12,2 $\pm$ 0,8

### 7.3.3 Bewertung der Kinetikermittlung anhand des produzierten Biogasvolumenstroms

Ohne genauere Betrachtung der ermittelten k-Werte fällt sofort auf, dass diese Art von Modellen nicht für die weitere Analyse der Hydrolysegeschwindigkeit herangezogen werden kann, weil einige Probleme einer reproduzierbaren Auswertung entgegenstehen.

Die großen Schwankungen der in Abschnitt 6.3.1 zusammengefassten Messwerte bedingt durch die aufgrund der Messmethode diskreten Werte und eine hohe Anfälligkeit des Volumenstroms auf äußere Einflüsse, wie Probennahme oder pH-Wertschwankungen, erschweren das Anpassen des Modells an die Messwerte. Die jedoch wichtigste Beobachtung ist der zeitliche Unterschied zwischen dem Unterbrechen der Substratzufuhr und der Reduktion des Biogasvolumenstroms. Dieser ist bei 8 von 10 Analysen zu beobachten und beträgt bei 3 davon über 10 h. Aufgrund dieser Tatsache ist anzunehmen, dass noch weiterhin Biogas aus Zwischenprodukten produziert wird und somit die Hydrolyse nicht der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist, wie es für die Quantifizierung der Hydrolysegeschwindigkeit auf Basis der produzierten Gasmenge erforderlich ist (Batstone et al., 2002) und auch die Proportionalität zwischen Substratabbau und Produktbildung ist nicht gegeben wie es an

anderer Stelle gefordert wird (VDI-Richtlinie 4630). Somit ist eine Ableitung der Geschwindigkeit des Hydrolyseprozesses aus der Gasproduktion des verwendeten Systems nicht zulässig, weshalb dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wird.

## 7.4 Ergebnisse der Ermittlungen der Cellulosehydrolyserate

### 7.4.1 Entwicklung der Abbaugeschwindigkeit im Fermenter

Aus den Batchexperimenten im Kolbenprober in Abschnitt 6.4.1 geht hervor, dass im Laufe der kontinuierlichen Fermentation vermutlich eine Anpassung der Fermenterbiozönose an das Substrat mikrokristalline Cellulose stattgefunden hat. Dies wird deutlich, da der Abbau von mikrokristalliner Cellulose mit Fermenterablauf als Inokulum deutlich rascher ablief als mit dem Fermenterinokulum als Ausgangsmaterial. Darüber hinaus wurde auch anderswo beschrieben, dass eine Anpassung an das Substrat mikrokristalline Cellulose erfolgt ist (Ahmed et al., 2019).

Die mittels Unterbrechung der Substratzufuhr bestimmten Abbaugeschwindigkeiten zeigen keinen eindeutigen Trend, was vermutlich an den unterschiedlichen dazwischenliegenden Kinetikermittlungen mit verschiedenen Elicitoren liegt. Einzig auffällig ist, dass der jeweils 1. Referenzwert in beiden Fermentern die niedrigste Celluloseabbaugeschwindigkeit aufweist. Auch wenn dieser Effekt in Fermenter 2 etwas geringer als in Fermenter 1 ausfällt wird dadurch die Hypothese der Anpassung der Fermenterbiologie an das Fermentermedium gestützt.

Neben der Anpassung an das Fermentermedium, was die Einordnung im Vergleich zu bereits publizierten Werten erschwert, sind zum jetzigen Zeitpunkt auch keine standardisierten direkten Testverfahren zur Ermittlung der Substratabbaugeschwindigkeit definiert (VDI-Richtlinie 4630), weshalb auf ein Biogasvolumen basiertes Verfahren im Batchmaßstab zurückgegriffen wurde (Abschnitt 5.2). Die Ergebnisse zeigen, dass das zur Inbetriebnahme der Fermenter verwendete Inokulum eine Hydrolyserate von Cellulose ermöglicht, die etwas höher bzw. vergleichbar mit bekannten Abbaugeschwindigkeiten ist (Gujer und Zehnder, 1983; Liebetrau et al., 2004), wohingegen Versuche mit Fermenterablauf, bei welchem die Biologie bereits an den Abbau von mikrokristalliner Cellulose angepasst ist, die Hydrolyseraten deutlich höher lagen.

### 7.4.2 Einfluss der Elicitoren auf den Celluloseabbau

Die Auswahl der Elicitoren erfolgte nach gründlicher Literaturrecherche. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Berichte über den positiven Effekt auf die Cellulosehydrolyse im Falle von Glucose (Xu et al., 2013), Xylan (Nataf et al., 2010), Fructose und Sorbitol (Johnson, 1983), sowie eine mögliche Bindungsstelle für Polysaccharide mit 3 – 6 Glucoseeinheiten (Yaniv et al., 2014) bekannt. Um diese Bindungsstelle gezielt anzusprechen wurde eine durch teilweise saure Hydrolyse von Cellulose erzeugte Mischung aus Cellooligosacchariden getestet und darüber hinaus noch die Polysaccharide Chitosan und Lichenan eingesetzt. Aufgrund der positiven Berichte über Glucose, welches das Monomer der Cellulose (bzw. Cellooligosacchariden) ist, wurde auch Xylose getestet, welches das Monomer des ebenfalls getesteten Xylans ist.

In der ersten Testserie wurden Glucose, Cellooligosaccharide und Xylan getestet (Abbildung 21). Dabei ließ sich nur beim selbst hergestellten Cellooligosaccharidmix eine mögliche positive Wirkung ableiten, da die  $k$ -Werte innerhalb der Fehlertoleranz leicht anstiegen. Aufgrund der nicht eindeutigen Aussage wurde die Analyse des Effekts der Cellooligosaccharide bei höherer Raumbelastung wiederholt. Ebenfalls wurde zeitnah zur Analyse der Cellooligosaccharide der Effekt von Cellobiose überprüft, welche als Inhibitor der cellulolytischen Aktivität bekannt ist (Xu et al., 2013), sich aber nicht vollständig aus der Cellooligosaccharidmischung abtrennen ließ. Durch die ermittelten Werte konnte gezeigt werden, dass die maximal zu erwartende Konzentration von  $0,2 \text{ mgg}^{-1}$  Cellobiose in der Cellooligosaccharidmischung noch keinen störenden Einfluss auf die Versuche hat. Die postulierte positive Wirkung von Glucose auf die cellulolytische Aktivität (Xu et al., 2013) konnte nicht beobachtet

werden, was mit aktuellerer Forschung in anderen Clostridien übereinstimmt. Bei einem Versuch von Li et al. (2018) zeigte sich beim Wachstum von *C. thermocellum* auf Glucose als einzige Kohlenstoffquelle eine geringere Proteinkonzentration als auch eine verringerte cellulolytische Aktivität als bei den zum Vergleich auf Cellulose angezogenen Kulturen. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch dieser Forschungsergebnisse liefert ebenfalls die Arbeit von Li et al. (2018) in welcher die beobachtete Produktion von vergleichsweise geringen Mengen an cellosomalem Protein in *C. thermocellum* nicht, wie in anderen Arbeiten vermutet, auf eine induktive Wirkung von Glucose zurückführt (Johnson, 1983; Xu et al., 2013), sondern folgert, dass cellosomale Proteine konstitutiv exprimiert werden.

Darüber hinaus konnte auch bei Xylan keine positive Wirkung auf den Celluloseabbau festgestellt werden.

Nach der Erhöhung der Raumbelastung auf  $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  (Abbildung 22) konnte wie auch schon bei  $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$  bei der hergestellten Cellooligosaccharidmischung eine wiederholte Tendenz zur Steigerung der hydrolytischen Aktivität beobachtet werden, jedoch verhinderte eine zu große Messunsicherheit eine genauere Aussage. Bezüglich weiterer Elicitoren, zeigten die in anderen Arbeiten bereits positiv getestete Elicitoren Fructose und Sorbitol kein eindeutiges Ergebnis. Für Fructose wurde in der Konzentrationsstufe  $0,06 \text{ mgg}^{-1}$  eine leichte Erhöhung und bei Wiederholung eine leichte Verringerung des Celluloseabbaus gemessen und bei Sorbitol konnte nach einer geringfügigen Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit die Reproduktion aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden. Die weiteren Elicitoren, die zwar getestet wurden, für welche es allerdings keine Belege für eine induzierende Wirkung auf die cellulolytische Aktivität der Biomasse in der Fachliteratur gibt, zeigten keine Verbesserung des Celluloseabbaus. Auffällig in Abbildung 22 ist, dass für Xylose in den Konzentrationsstufen  $0,06$  und  $6 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose eine deutliche Verschlechterung zum davor durchgeführten Referenzwert an Tag 386 beobachtet wird. Dieser ist, verglichen mit den anderen Referenzwerten ungewöhnlich hoch, sodass für die Bewertung des Einflusses von Xylose auch der Referenzwert am Tag 540 miteinbezogen wurde, wobei eine ähnliche Celluloseabbaugeschwindigkeit wie beim Einsatz von Xylose festgestellt wurde. Somit bleibt als vielversprechendster Elicitor für die Induktion der hydrolytischen Aktivität im Biogasprozess die selbst hergestellte Mischung aus Cellooligosacchariden, welche in allen 3 durchgeführten Versuchsreihen eine positive Tendenz zeigte. Der eindeutige Beweis für einen positiven Effekt der Mischung aus Cellooligosacchariden kann aufgrund der ermittelten Standardabweichung der Ergebnisse nicht erbracht werden. Verglichen mit bisher bekannten Forschungsergebnissen ist es allerdings naheliegend, dass eine induzierende Wirkung zu erwarten ist. So ist beispielsweise bei cellulolytischen Pilzen bereits lange bekannt, dass Celluloseabbauprodukte wie Cellobiose als Induktor für die Cellulaseexpression wirken (Mandels und Reese, 1960; Znameroski et al., 2012). Auch die hergestellte Mischung aus Cellooligosacchariden zählt zu den Abbauprodukten der Cellulose und verfügt darüber hinaus über eine ausreichend hohe Anzahl an Glucoseeinheiten um sich an bekannte planare Bereiche der Oberfläche von an Cellulose bindende Polysaccharid-Sensor-CBM anzulagern (Yaniv et al., 2014), welche aufgrund ihrer Größe Verbindungen aus 3 oder 6 Glucoseringen aufnehmen können. Auch konnte bereits experimentell nachgewiesen werden, dass beim Wachstum auf Cellulose hauptsächlich C4 bis C6-Einheiten als Zwischenprodukte produziert werden (Zhang und Lynd, 2005).

Generell waren der Einfluss von Cellulose und deren Abbauprodukte auf die Cellulaseproduktion von Clostridien der Gegenstand einiger Forschung. So konnten Badalato et al. (2017) zeigen, dass die Enzymproduktion von *C. cellulolyticum* abhängig vom Substrat ist. Die getesteten Substrate Papiertaschentücher, Filterpapier und Watte pads enthalten kein Lignin. Trotzdem konnten Unterschiede im Proteom von *C. cellulolyticum* festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Regulation der hydrolytischen Enzyme auf Basis der vorhandenen Kohlenhydrate erfolgt. Auch wird

dem Kristallisationsgrad der Cellulose von den Autoren ein bedeutender Einfluss zugesprochen. Einen Schritt weiter gingen Li et al. (2018), hier wurde neben der gebildeten Menge an Protein auch die cellulolytische Aktivität bestimmt und es zeigte sich auch eine unterschiedliche cellulolytische Aktivität je nach verwendetem Induktor. Das beweist somit eindeutig, dass nicht nur die gebildete Menge an cellulosomalem Protein sondern auch die Zusammensetzung des Cellulosoms vom Substrat abhängig ist. In derselben Forschungsarbeit konnte zudem mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Bildern gezeigt werden, dass es auch beim Wachstum auf Cellotriose und Cellopentaose zu einer Produktion von cellulosomalem Protein kommt, welche mit dem Wachstum auf Avicel vergleichbar ist. Die Arbeit von Li et al. (2018) unterstützt somit die auch in diesem Projekt erzielten Ergebnisse, welche auf eine induktive Wirkung von Cellooligosacchariden schließen lassen.

Eine Herausforderung, die die gesamte Analyse des Einflusses der Elicitoren auf die Abbaugeschwindigkeit der Cellulose betraf, war, dass die errechnete Messungenauigkeit, in Relation zu den absoluten Messwerten, verhältnismäßig hoch war, und damit das Erkennen von positiven und negativen Effekten beeinträchtigte.

Eine Erklärung für diese Beobachtung ist die Vielzahl an Faktoren, die den anaeroben Abbau von Cellulose beeinflussen. So sind am Celluloseabbau in Biogasanlagen eine Vielzahl von Mikroorganismen in einer komplexen Biozönose beteiligt (Li et al., 2013; Qiao et al., 2013; Schluter et al., 2008; Stolze et al., 2015). Durch die Einführung eines synthetischen Mediums zur kontinuierlichen Fermentation konnte zumindest ein Einfluss des Substrats ausgeschlossen werden, aber dennoch blieben die komplexe Biozönose, ein langer Betriebszeitraum und die unterschiedlichen eingesetzten Elicitoren als Einflussfaktoren bestehen, sodass nicht von einem univariaten System auszugehen ist. Um dennoch belastbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die mutmaßlich positive Effekte von Elicitoren mehrfach wiederholt.

Für die selbst hergestellte Cellooligosaccharidmischung wurde nach den Referenzwerten an Tag 190, Tag 386 und Tag 701 eine Verbesserung des Celluloseabbaus, wenn auch innerhalb der Messunsicherheit, beobachtet. Dies stimmt mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Forschungsarbeiten überein, weshalb die Cellooligosaccharidmischung für die Modifikationsversuche zum Zweck einer langsameren Bioabbaubarkeit verwendet wurden.

## 7.5 Analyse und Effekte modifizierter Cellooligosaccharide

### 7.5.1 Bewertung der Zusammensetzung der Cellooligosaccharide

Aus den Analysenergebnissen ging hervor, dass die nach der abgewandelten Methode von Akpinar und Penner (2008) (Abschnitt 5.7.1) synthetisierten Cellooligosaccharide die Anforderungen erfüllten und eine Mischung aus Cellooligosacchariden mit Schwerpunktkettenlänge von 3-6 Monomeren hergestellt wurde. Lediglich das Auftreten einer Restmenge von 2 % Cellobiose hätte sich negativ auf die Wirkung des Gemisches auswirken können, da Cellobiose als Inhibitor des Celluloseabbaus gilt (Xu et al., 2013). Ein inhibierender Einfluss der Cellobiose wurde durch die Ermittlung der Abbaukinetik bei einer Cellobiosekonzentration von  $0,2 \text{ mgg}^{-1}$  Cellulose, was der maximal erwarteten Konzentration im Fermenter entsprach, vorab ausgeschlossen.

### 7.5.2 Wahl der Modifikationsstrategie

Die Ergebnisse der durchgeführten Vortests im Kolbenprober zeigten eindeutig, dass eine mögliche Methylierung der Cellooligosaccharide als Modifikationsansatz nicht geeignet ist. Obwohl Methylcellulose für cellulolytische Mikroorganismen nicht toxisch ist und diese bei gleichzeitigem Vorhandensein von Methylcellulose und löslichen Substraten weiter wachsen können (Cheng et al., 1991), ist eine eindeutige Inhibierung in den durchgeführten Batchexperimenten erkennbar. Beim Vorhandensein von geringen Mengen kam es zu einer starken Beeinträchtigung und bei höheren Konzentrationen fast zum vollständigen Erliegen der Biogasproduktion. Die Ursache für diese

Beobachtung liegt vermutlich an einer bereits gut dokumentierten Eigenschaft von Methylcellulose, dass sich cellulolytische Mikroorganismen bevorzugt an Methylcellulose anlagern, diese aber nicht als Substrat verwerten können. Somit stehen keine vitalen Zellen für den Abbau der ebenfalls vorhandenen Cellulosefasern zur Verfügung (Kudo et al., 1987; Miron et al., 2001). Als Alternative zur Methylierung wurde die Chlorierung herangezogen, da diese wie beispielsweise beim Süßstoff Sucralose bereits erfolgreich angewandt wird. Sucralose wird nur unvollständig abgebaut und ist in geringen Mengen auch nicht toxisch (Goldsmith, 2000; Schiffman und Rother, 2013). Dies konnte auch durch Batchexperimente mit chlorierter Cellobiose belegt werden, bei welchen in der Konzentrationsstufe  $80 \text{ mg l}^{-1}$  keine Beeinträchtigung und bei  $500 \text{ mg l}^{-1}$  nur eine geringe Verschlechterung der Biogasausbeute festgestellt wurde (Abbildung 25). Die leichte Abnahme des Gasertrages bei der höheren Konzentration an chlorierter Cellobiose muss aber nicht zwingend von der Chlorierung bewirkt werden, da Cellobiose selbst bekanntermaßen ein Inhibitor der Cellulosehydrolyse ist (Xu et al., 2013).

### 7.5.3 Analyse und Effekte der chlorierten Oligosaccharide

Die Chlorierung der selbst hergestellten Celooligosaccharide konnte nicht selbst durchgeführt werden, weshalb diese von der ChiroBlock® GmbH (Bitterfeld-Wolfen, Deutschland) nach der oben beschriebenen Methode (Abschnitt 5.7.3) durchgeführt wurde.

Im Zuge der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse der Produkte wurden Beweise für das Vorhandensein von chlorierten Celooligosacchariden und deren Bruchstücke gefunden (Abschnitt 6.5.3). Somit wurde von einer erfolgreichen Chlorierung ausgegangen und die beiden Celooligosaccharidmischungen mit einem Chlorgehalt von 7,25 % und 12,12 % für die weitere Analyse verwendet.

Aus den Vorversuchen im Batchmaßstab (Abschnitt 6.5.2) kann entnommen werden, dass bis zu den Konzentrationen von  $25 \text{ mg l}^{-1}$  bei der geringer chlorierten Celooligosaccharidfraktion mit einem Chlorgehalt von 7,25 % und bei der höher chlorierten Fraktion mit einem Chlorgehalt von 12,12 % bis zu einer Konzentration von  $50 \text{ mg l}^{-1}$  keinerlei inhibierende Effekte zu beobachten sind. Diese Konzentrationen wurden auch so im Fermenter eingesetzt, was einer Applikationsmenge von  $0,3 \text{ mg g}^{-1}$  Cellulose bei der höher chlorierten Fraktion und  $0,6 \text{ mg g}^{-1}$  Cellulose bei der niedriger chlorierten Fraktion entspricht. Aus Zeitgründen musste auf die genaue Ermittlung einer maximal anwendbaren Konzentration leider verzichtet werden, dies ist besonders bei der geringer chlorierten Fraktion von Bedeutung, da diese erst gegen Ende der experimentellen Arbeiten geliefert wurde und nur 2 Konzentrationen getestet werden konnten.

Aus den Ergebnissen der Kinetikermittlungen im Fermenter mit der höher und niedriger chlorierten Fraktion an Celooligosacchariden in Abbildung 23 geht hervor, dass bei einer sehr hohen Messunsicherheit, ein Vergleich zum Referenzwert wider Erwarten keine Verbesserung des k-Werts anzeigte und die Abbaugeschwindigkeit tendenziell unter der der nicht modifizierten Celooligosaccharide lag. In Fermenter 2 ist bei der niedrig chlorierten Fraktion in der höchsten getesteten Konzentration von  $0,6 \text{ mg g}^{-1}$  Cellulose sogar ein deutlicher Rückgang der Hydrolysegeschwindigkeit festzustellen. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte sein, dass, durch die Modifikation der Celooligosaccharide, die Rezeptoren des CBM nicht mehr an die mutmaßlichen Induktoren binden können, oder dass ein positiver Effekt von einer inhibierenden Wirkung auf das Biomassewachstum analog zum Wachstum auf Methylcellulose (Kudo et al., 1987; Miron et al., 2001) überlagert wird. Obwohl durch Vorversuche (Abschnitt 6.5) eine verträgliche Zugabemenge ermittelt wurde, deutet die festgestellte Abnahme der Konzentrationen von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* (Abbildung 45) eher auf eine inhibierende oder gar toxische Wirkung der modifizierten Elicitoren auf die Biomasse hin.

Im Zusammenhang mit einem möglicherweise inhibierenden Effekt ist ein Vergleich mit den Batchversuchen mit chlorierter Cellobiose (Abbildung 25) interessant. In diesem fällt auf, dass die Inhibierung deutlich früher einsetzt, da bei chlorierter Cellobiose auch bei einer Konzentration von  $500 \text{ mg l}^{-1}$  nur geringe Effekte auftraten. Um dieses unerwartete Phänomen genauer zu analysieren, müssten als erster Schritt die chlorierten Cellooligosaccharide vor der Applikation weiter aufgereinigt werden, da diese nur einen garantierten Reinheitsgrad von 90 % aufweisen und somit 10 % Nebenprodukte der Synthese enthalten sein können. Tritt dieser inhibierende Effekt auch weiterhin auf, so kann auch die Kettenlänge der Cellooligosaccharide eine mögliche Ursache sein, ähnlich zu den nachgewiesenen Effekten bei Methylcellulose, wo cellulolytische Mikroorganismen bevorzugt an die methylierte Cellulose binden, diese aber nicht abbauen können und somit die cellulolytische Aktivität zum Erliegen kommt (Kudo et al., 1987; Miron et al., 2001). Ein möglicher Ansatz für einen Folgeversuch könnte sein, die chlorierten Cellooligosaccharide chromatographisch nach der Kettenlänge aufzutrennen und anschließend über Batchtests zu analysieren, ob der inhibierende Effekt über alle Kettenlängen gleichmäßig auftritt, oder mit der Kettenlänge variiert.

## 7.6 Diskussion der Ergebnisse molekularbiologischer Methoden

### 7.6.1 Auswahl der Nachweismethode und Mikroorganismen

Wie auch schon in der Einleitung erklärt erfolgt die Quantifizierung von Mikroorganismen mittels qPCR oftmals auf Basis der Kopienzahl von 16s rDNA. Der direkte Schluss ist jedoch oftmals nicht möglich, da deren genaue Anzahl im Genom nicht für alle Mikroorganismen bekannt ist, und sich auch die Kopienzahl im Zuge des Zellwachstums in unterschiedlichen Phasen der Zellteilung verändern kann (Ludwig und Schleifer, 2000). Darüber hinaus hat auch die Extraktionseffizienz der metagenomischen DNA einen Einfluss auf das Ergebnis, da nicht sichergestellt ist, dass auch alle zu quantifizierenden Gene auch quantitativ isoliert werden (Junicke et al., 2014).

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, haben Junicke et al. (2014) aufgezeigt. In diesem Ansatz wurden lebende Kulturen von *Desulfovibrio sp. G11* und *Methanospirillum hungatei JF1* Kulturen zur Erstellung von Biomasseverdünnungsreihen mit bekannter Konzentration verwendet. Aus dieser Verdünnungsreihe wurde die gDNA isoliert und als Standard zu Quantifizierung der genannten Mikroorganismen aus einer Mischkultur herangezogen. Ein auftretendes Problem einer uneinheitlichen DNA-Extraktion von der Filtermembran während der DNA-Isolierung bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen wurde durch Zugabe von DNA aus Herings sperma vor dem Zellaufschluss gelöst. Der gleiche Ansatz der Quantifizierung wurde auch in dieser Arbeit gewählt, um sicher zu stellen, dass die Isolierung der DNA das Quantifizierungsergebnis nicht beeinflusst. Dies kann mit den Ergebnissen der Abschnitte 6.6.7 und 6.6.8 belegt werden, wo eindeutig gezeigt werden konnte, dass sowohl die Probennahme wie auch die Isolierung genomischer DNA aus den Fermenterproben reproduzierbar ist.

Auffällig ist, dass die Effizienz der qPCR basierend auf der gDNA aus den Biomasseverdünnungsreihen für beide Mikroorganismen nicht die geforderten 90 % erreicht. Da jedoch aus den Vorversuchen (Abbildung 34) eindeutig hervorgeht, dass alle Anforderungen an das qPCR-System erfüllt sind und darüber hinaus die beiden erstellten Kalibriergeraden einen linearen Zusammenhang zwischen der Biomassekonzentration und den gemessenen cq-Werten ausweisen, werden beide Geraden zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* verwendet. Auch bei vergleichbaren Arbeiten weist die eine erstellte Kalibriergerade auf Basis von Biomasseverdünnungsreihen eine Effizienz von unter 90 % auf (Bandelj et al., 2013; Junicke et al., 2014).

Aus der Analyse der Konsistenz der ermittelten qPCR-Ergebnisse in Abbildung 40 und Abbildung 43 ergab sich die Notwendigkeit 3 Analysen zu überprüfen. Da die Analyseergebnisse vom 15.05.2018, 17.11.2018 und 12.12.2018 sich zum Teil stark von den sonst üblichen Werten unterschieden, wurden



diese Messungen wiederholt. Da die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen des 15.05.2018 wesentlich plausibler und in Übereinstimmung mit den sonstigen Ergebnissen sind, werden zur Auswertung nur die Messwerte der Wiederholung herangezogen. Ebenso werden die Messungen am 12.12.2018 nicht verwendet, da an diesem Tag die sowohl durchgeführte Quantifizierung von *C. cellulolyticum* als auch von *C. cellulovorans* auffällig abweichen. Im Gegensatz dazu konnte für die wiederholte qPCR-Analyse vom 17.11.2018 nur eine geringfügige Änderung des Vergleichswerts vom 15.09.2017 erzielt werden, sodass eine Unterscheidung nicht möglich ist und die Ergebnisse beider Läufe berücksichtigt werden.

Die untersuchten Mikroorganismen wurden nach deren Vorkommen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen ausgewählt. Aus bekannter Literatur kann entnommen werden, dass *C. thermocellum* ein weit verbreiteter Vertreter cellulolytischer Mikroorganismen ist und in 5 unterschiedlichen Arbeiten zu Biogasanlagen bei der Analyse der Zusammensetzung der Biozönose nachgewiesen wurde. In den gleichen Arbeiten wurde auch viermal das Vorkommen von *C. cellulolyticum* bestätigt (Li et al., 2013; Qiao et al., 2013; Schluter et al., 2008; Stolze et al., 2015; Wirth et al., 2012). Auch *C. cellulovorans* konnte bereits in Biogasanlagen nachgewiesen werden und zeigte beim Vergleich von Trocken- und Nassfermentation in beiden Prozesstypen ein ähnliches Niveau wie *C. cellulolyticum* (Stolze et al., 2015). Da das Auftreten dieser Clostridien folglich zu erwarten ist und diese darüber hinaus über die notwendigen Enzyme verfügen um Cellulose in kristalliner Form abzubauen (Zverlov et al., 2015), wurden diese zum Monitoring via qPCR ausgewählt.

Trotz dieser sorgfältigen Vorauswahl war nur eine Quantifizierung von 2 der 3 Mikroorganismen möglich. *C. thermocellum* konnte in den Reaktorproben und Anreicherungen daraus nicht nachgewiesen werden (Abbildung 53). Eine Erklärung ist möglicherweise, dass die Fermentation bei 44 °C durchgeführt wurde und das Wachstumsoptimum für diesen thermophilen Mikroorganismus je nach Stamm bei 50 bis 68 °C liegt (Akinosho et al., 2014).

### 7.6.2 Primerdesign

Heute sind effiziente Werkzeuge vorhanden um optimale Primer für das gewünschte Einsatzgebiet zu suchen. So konnten mit Hilfe des online Tools Primer3 web version 4.00 Primer ausgewählt werden, welche den formalen Anforderungen des Herstellers des SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix entsprechen. Die Primer ergeben Amplicons von 75 - 200 bp, weisen keine Wiederholungen länger als 4 gleiche Basen, bzw. 3 im Fall von Guanin oder Cytosin auf, und bilden keine Dimere. Darüber hinaus liegt der GC-Gehalt zwischen 50 und 60 % und der Schmelzpunkt zwischen 50 und 60°C. Lediglich die Anforderung, dass am 3'-Ende ein Guanin oder Cytosin vorhanden sein soll, konnte bei beiden vorwärts Primern zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* nicht erfüllt werden (verwendete Primer siehe Tabelle 12).

Bezüglich der Spezifität der Primer konnte anhand des Vergleichs mit der Datenbank des SILVA rRNA Datenbankprojekts (Klindworth et al., 2013), einer großen Datenbank für 16s ribosomale RNA für Bakterien, Archaeen und Eukaryonten, gezeigt werden, dass ein unspezifisches Binden im Bereich bekannter 16s rDNA ausgeschlossen werden kann. Durch Methoden des Datenbankvergleichs alleine ist es schwierig eine umfassende Absicherung der Spezifität zu erreichen, weshalb diese auch unter realen Bedingungen im Labor in Form von qPCR-Läufen mit genomischer DNA von am Lehrstuhl vorhandenen *Clostridien* überprüft wurde. Durch die beobachteten hohen Zyklenzahlen auf Niveau von NTCs bei Ansätzen mit nicht Ziel DNA in Verbindung mit Positivkontrollen konnte diese Fehlerquelle so weit wie möglich ausgeschlossen werden (Abbildung 30 u. Abbildung 31). Jedoch wurden als weitere Methode der Absicherung der Spezifität nach jedem PCR-Lauf der Schmelzpunkt der PCR-Produkte ermittelt und die Produktlänge mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Im Zuge der qPCR-Analysen wurden trotz sorgfältigem Primerdesign Unregelmäßigkeiten des Schmelzpunktes der qPCR-Produkte bei gleichzeitiger konstanter Produktlänge festgestellt. Diese Beobachtung wurde durch eine Sequenzierung der qPCR-Produkte überprüft. Aus dem Ergebnis der Sequenzierung ergibt sich nach einer BLAST Analyse, dass zwar Unterschiede zu den Typstämmen bestehen trotzdem aber mit *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* die größte Übereinstimmung aufweisen. Da darüber hinaus noch bekannt ist, dass auch innerhalb der verschiedenen 16s rDNA Kopien im gleichen Genom Unterschiede auftreten (GenBank accession *NC\_011898.1*) werden die gebildeten Produkte als spezifisch angesehen.

### 7.6.3 Optimierung der qPCR-Bedingungen

Nach dem Primerdesign war die Optimierung der PCR-Bedingungen der nächste Schritt, um die geforderten Qualitätsansprüche an das qPCR System zu erreichen. Die dazu unternommenen Vorversuche zur Quantifizierung von *C. cellulolyticum* ergaben eine optimale Primerkonzentration von 200 nM und eine Annealingtemperatur von 59 °C (Abschnitte 6.6.3 und 6.6.4). Die Annealingtemperatur wurde trotz des Optimums bei 59 °C aufgrund der geringen Unterschiede für die weiteren Versuche auf 60 °C festgelegt, da bei höheren Temperaturen die Spezifität der Primer/Template Bindung zunimmt (Hecker und Roux, 1996) und 60°C für den SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix als Optimum angegeben wird.

Die ermittelten Bedingungen wurden abschließend getestet, indem eine Verdünnungsreihe über 6 Zehnerpotenzen angelegt und daraus eine Kalibriergerade erstellt wurde (Abbildung 34). Die dabei ermittelte Effizienz von 96,4 % und der Korrelationskoeffizient von 0,9964 zeigen, dass das entwickelte System geeignet ist, belastbare Aussagen zur Quantifizierung von Clostridien zu tätigen, da die allgemeinen Mindestanforderungen an Kalibrationsgeraden für qPCR-Analysen mit einer Effizienz zwischen 90 und 110 % sowie einem Korrelationskoeffizient von  $\geq 0,985$  erreicht wurden (Rogers-Broadway und Karteris, 2015). Die erreichte Effizienz zeigt außerdem, dass die beim Primerdesign nicht erreichten Guanin oder Cytosin Basen am 3'-Ende der Vorwärtsprimer die Effizienz nicht maßgeblich verschlechtern.

Die Optimierung für *C. cellulovorans* erfolgte im Zuge einer am Lehrstuhl durchgeführten Bachelorarbeit, wobei als optimale Reaktionsbedingungen eine Primerkonzentration von 400 nM, eine Annealingtemperatur von 60 °C und ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l ermittelt wurden. Auch hier erfüllen die auf diese Weise erstellten Kalibrationsgeraden mit genomischer DNA die Mindestanforderungen (Fernandez Aguilar, 2018).

Bei der Isolierung von metagenomischer DNA aus einer komplexen Probenmatrix wie Biogasreaktoren können vorhandene Inhibitoren wie Schwermetalle, phenomische Substanzen und Huminsäuren sich negativ auf das Ergebnis der qPCR auswirken (Smalla et al., 1993; Tebbe und Vahjen, 1993; Wilson, 1997). Um sicherzustellen, dass solche Inhibitoren im Zuge der Isolation erfolgreich abgetrennt wurden, wurde der ein Vergleich zwischen einer Verdünnungsreihe in nukleasefreiem Wasser und einer in isolierter Fermenter-gDNA angestellt, wobei diese eine fast idente Steigung und somit Effizienz aufwies (Abbildung 35). Die angewandte Methode zur Isolation von metagenomischer DNA aus dem Fermenter, bestehend aus den Waschschritten mit AE-Puffer (Köllmeier, 2014) und dem DNeasy® PowerSoil® Kit, ist somit geeignet mögliche Inhibitoren aus den Laborfermentern zuverlässig abzutrennen.

### 7.6.4 qPCR – Quantifizierungsergebnisse

Für die nachgewiesenen Mikroorganismen *C. cellulolyticum* und *C. cellulovorans* zeigt sich auf den ersten Blick, dass diese in den Fermentern nicht in gleichen Konzentrationen auftreten. Während in Fermenter 3 die Konzentrationen für *C. cellulovorans* um 1  $\text{gl}^{-1}$  betragen (Abbildung 46 und Abbildung 47) bleiben die Konzentrationen bei *C. cellulolyticum* bei 0,2  $\text{gl}^{-1}$  und darunter, sodass sich die beiden

Konzentrationen um den Faktor 5 – 10 unterscheiden. Schon am ersten Tag der Kultivierung der Biozönose im Fermenter wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Clostridienspezies festgestellt, auch wenn die Konzentration im Besonderen bei *C. cellulovorans* insgesamt niedriger als im späteren Verlauf war.

Als mögliche Erklärung für diesen deutlichen Unterschied kann die Fermentationstemperatur genannt werden, welche auch schon bei den Inokula 44 °C betrug. Zwar sind in der Literatur keine genauen Daten zu den Abhängigkeiten der Wachstumsraten von der Temperatur bekannt, jedoch kann von der höheren optimalen Wachstumstemperatur für *C. cellulovorans* ein besseres Wachstum bei 44 °C abgeleitet werden. Die von der DSMZ angegebene optimale Wachstumstemperatur für *C. cellulovorans* beträgt 37 °C, die von *C. cellulolyticum* hingegen nur 35 °C (DSMZ, 2019b, 2019a). Darüber hinaus wird ein Einfluss der Medienzusammensetzung als Ursache für unwahrscheinlich erachtet, da zur Kultivierung beider Clostridien in Reinkultur von der DSMZ das CM3-Medium empfohlen wird (DSMZ, 2016), weshalb gleiche Anforderungen an das Fermentationsmedium vermutet werden. Außerdem ist für beide Clostridienspezies eine Konzentrationserhöhung im Laufe der kontinuierlichen Fermentation zu beobachten, da die gemessenen Konzentrationen an Tag 0 die niedrigsten bis zur Versäuerung des Fermenters am Tag 587 darstellen. Somit wird aufgrund der Erhöhung davon ausgegangen, dass kein Mangel im Fermentationsmedium auftritt.

Eine weitere Auffälligkeit in Fermenter 3 ist, dass die Reduktion der berechneten Gesamtbioasse mit zunehmender Raumbelastung und der damit verbundenen Reduktion der hydraulischen Verweilzeit zurückgeht. Diese lag Anfangs zwischen 15 und 20 g l<sup>-1</sup>, stieg im ersten Jahr der Fermentation und erreicht das Maximum von 21,5 g l<sup>-1</sup> am 394. Tag nach dem Beginn der Substratzufuhr. Dann jedoch ist ein Abnehmen der Gesamtbioasse zu beobachten, welches vermutlich auf das Auswaschen langsam wachsender Mikroorganismen der Biozönose zurückzuführen ist (Goux et al., 2015). Im gleichen Zeitraum nahm die Konzentration von *C. cellulovorans* leicht zu, während bei *C. cellulolyticum* keine Änderung erkennbar war, woraus sich eine relative Anreicherung der beiden Clostridienstämme ergibt. Offensichtlich können sich diese aufgrund der potentiell höheren Wachstumsraten besser an die kürzere Verweilzeit anpassen, als andere vornehmlich anaerobe mit höheren Generationszeiten wie langsam wachsende acetoklastische Archaeen, welche deshalb sukzessive ausgewaschen wurden (Giallo et al., 1983; Jabłoński et al., 2015). Die relative Zunahme der Clostridien bei der damit verbundenen Abnahme der acetoklastischen Methanogenen wäre auch eine wahrscheinliche Erklärung für das Versäuern des Fermenters am 587. Tag nach dem Feedstart. Im Anschluss an dieses Ereignis konnte beim Versuch, die Raumbelastung wieder zu erhöhen, die Konzentration der Gesamtbioasse wieder leicht gesteigert werden, während aufgrund des großen Probenahmeintervall keine eindeutige Aussage über den Verlauf der Konzentrationen von *C. cellulovorans* und *C. cellulolyticum* erhalten wird. Allerdings kann aufgrund des, über den gesamten Prozesszeitraum konstanten, Auftretens der cellulolytischen Spezies abgeleitet werden, dass das gewählte Medium für langfristige Analysen geeignet ist.

In Fermenter 1 und 2 wurde versucht die Auswirkungen der Elicitortests auf die cellulolytischen Leitspezies zu verfolgen (Abbildung 44 und Abbildung 45). Wie in Fermenter 3 zeigt sich hier das gleiche Bild, da die Konzentration von *C. cellulovorans* erneut deutlich über der von *C. cellulolyticum* liegt. Darüber hinaus kann trotz der großen Messintervalle keine langfristige Änderung der Biomassezusammensetzung aufgrund der Elicitortests erkannt werden, mit der Ausnahme der niedrig chlorierten Cellulooligosaccharide. Bei diesen wurde in den Konzentrationsstufen 0,06 und 0,6 mg g<sup>-1</sup> ein kontinuierlicher Konzentrationsrückgang von *C. cellulovorans* und später auch *C. cellulolyticum* sowie der Celluloseabbaugeschwindigkeit festgestellt. Somit kann aufgrund dieser Ergebnisse in Fermenter 2 auf eine Inhibierung der cellulolytischen Clostridien geschlossen werden. Dies war aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen im Kolbenprober (Abbildung 29) nicht zu erwarten, sodass bezüglich

einer inhibierenden oder toxischen Wirkung der chlorierten Cellooligosaccharide noch Forschungsbedarf besteht.

Eine Abweichung von den Fermentern 1 und 2, in welchen die Elicitortests durchgeführt wurden, zum konstanten Fermenterfeed in Fermenter 3 ist die Konzentration von *C. cellulolyticum*. Während die Konzentration in Fermenter 3 bis zu  $0,2 \text{ g l}^{-1}$  beträgt kommt diese in Fermenter 1 und 2 nicht über  $0,1 \text{ g l}^{-1}$  hinaus. Eine mögliche Erklärung für die im Verhältnis doch recht große Abweichung liefern die Untersuchungen der Biomassekonzentrationen während der Unterbrechung der Substratzufuhr. Hier bleiben die gemessenen Konzentrationen von *C. cellulovorans* über den gesamten Zeitraum von 26 h konstant, während bei *C. cellulolyticum* nach 10 h die Konzentrationen deutlich abnehmen (Abbildung 48 und Abbildung 49). Somit konnte gezeigt werden, dass *C. cellulolyticum* sensibler auf inkonstante Substratzufuhr reagiert und somit hier auch weniger stark als in Fermentern mit konstantem Substratfeed auftritt.

### 7.7 Bewertung der erreichten Forschungsergebnisse

Der größte Erfolg dieser Arbeit liegt sicherlich in der Einführung eines vollsynthetischen Mediums zur Biogasproduktion, mit welchem es möglich war, eine maximale Raumbelastung von  $8,3 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei einer minimalen hydraulischen Verweilzeit von 9,6 d zu erreichen. Somit konnte ein Ziel dieser Arbeit, eine kontinuierliche Cellulosemonofermentation zur Biogasproduktion unter definiert reproduzierbaren Bedingungen vollständig erfüllt werden.

Auch konnte ein Weg gezeigt werden die Substratabbaugeschwindigkeit innerhalb von relativ kurzer Zeit zu ermitteln, womit mutmaßliche und bereits in der Literatur beschriebene Elicitoren auf deren induktiven Effekt getestet wurden. Ein eindeutiger Beweis konnte jedoch nicht erbracht werden, da die festgestellten Messunsicherheiten mögliche Effekte überlagerten. Folglich kann diese Zielsetzung nicht als abgeschlossen betrachtet werden, sodass Folgeexperimente notwendig sind. Der vielversprechendste Elicitor, ein selbst hergestelltes Gemisch aus Cellooligosacchariden, welches bei 3 unabhängigen Kinetikermittlungen eine positive Tendenz erahnen lies wurde nach Vorversuchen durch Chlorierung chemisch modifiziert. Da die Modifikation mittels massenspektrometrischer Analysen bestätigt wurde, wird auch die Modifikation als erfüllt angesehen. Nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte hingegen, ob durch die Modifikation auch eine verringerte Bioabbaubarkeit im Reaktor erreicht wurde. Ein dafür vorgesehener Nachweis über die Messung gebildeter Biogasmenge war nicht möglich, da bei über  $50 \text{ mg l}^{-1}$  eine Inhibierung auftrat und für eine Quantifizierung über die gebildete Biogasmenge größere Konzentrationen erforderlich sind.

Die angestrebte molekularbiologische Quantifizierung cellulolytischer Clostridien konnte nach erfolgreicher Methodenentwicklung für ausgewählte Leitspezies umgesetzt, und somit dieses Ziel erreicht werden. Die Ergebnisse zeigten eine stabile Population im synthetischen Medium an.

## 8 Ausblick

Mit der Entwicklung eines synthetischen Mediums zur Biogasproduktion, welches es ermöglicht unter definiert reproduzierbaren Bedingungen Analysen durchzuführen und der gleichzeitigen Vorstellung einer Methode zur Ermittlung der Substratabbaugeschwindigkeit wurde eine stabile Basis geschaffen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen könnten in Zukunft nachfolgende Experimente reproduzierbar durchgeführt werden, da das in der Literatur beschriebene Problem der ungleichen Substrate (Hendriks et al., 2018) nun ausgeschlossen werden kann und einzig die Wahl des Inokulums als Unsicherheit bei der Reproduktion künftiger Experimente übrigbleibt. Auch konnte das Fehlen eines genormten Verfahrens zur Ermittlung der Substratabbaukinetik in kontinuierlichen Experimenten (VDI-Richtlinie 4630) umgangen werden, da in dieser Arbeit ein eigener Standard zur Ermittlung der Substratabbaugeschwindigkeit während eines kontinuierlichen Biogasproduktionsprozesses, basierend auf der sinkenden Substratkonzentration bei Unterbrechung der Substratzugabe, gesetzt wurde.

Naheliegender als auf diese Art durchführbares Folgeexperiment ist eine Erweiterung des Elicitorspektrums. Den positiven Ergebnissen mit Cellooligosacchariden folgend sind die nächsten logischen Elicitoren Oligosaccharide, welche ebenfalls ein gerades Backbone mit  $\beta$  1-4-glykosidischen Bindungen aufweisen, sodass beispielsweise Hemicellulosen wie Mannane oder Galactane oder deren hydrolytische Spaltprodukte in Betracht gezogen werden können. Die Theorie dahinter ist, dass diese wie auch die Cellooligosaccharide an die von Yaniv et al. (2014) beschriebene planare Struktur in drei Polysaccharid-Sensor-CBM binden könnten.

An vielen Stellen werden Saccharide als Elicitoren angeführt (Johnson, 1983; Nataf et al., 2010; Xu et al., 2013) und auch der Fokus dieser Arbeit lag auf Mono-, Oligo- und Polysacchariden. Allerdings könnte mit dem etablierten System auch die Wirkung weitere Stoffgruppen problemlos überprüft werden. So konnte bereits für *Aspergillus niger*, einem cellulaseproduzierenden Pilz, gezeigt werden, dass ein Extrakt aus vorbehandelter Bambussprossenschale die Produktion von Cellulasen bewirkt (Zhang et al., 2017). Das Besondere an dieser Beobachtung ist, dass die Autoren den Effekt nicht den vorhandenen Sacchariden zuschreiben, sondern einem Ligninabbauprodukt ohne aromatischer Ringstruktur. Dem folgend könnten auch Ligninderivate auf deren Eignung für die Induktion der cellulolytischen Aktivität im Biogasprozess getestet werden.

Abseits der Testung neuer oder abgewandelter Elicitoren ist es auch von großem Interesse, den genauen Wirkungsmechanismus der Cellooligosaccharidmischung aufzuklären. Der erste Schritt dazu wäre zu untersuchen, ob alle Cellooligosaccharide der im Zuge dieser Arbeit hergestellten Mischung einen gleichermaßen positiven Effekt auf die cellulolytische Aktivität aufweisen, oder ob dieser nur bei einzelnen Verbindungen auftritt. Eine Möglichkeit das zu untersuchen wäre, die Cellooligosaccharidmischung chromatographisch aufzutrennen und anschließend nach Isolation und Identifikation der unterschiedlichen Saccharide diese einzeln auf Induktion der cellulolytischen Aktivität zu testen. Können im Zuge dieser Untersuchung eine oder mehrere besonders wirksame Verbindungen identifiziert werden, wäre der nächste logische Schritt genau zu analysieren, wie diese mit Oberflächenproteinen von cellulolytischen Clostridien in Kontakt treten. Dies könnte mit Hilfe von molekularem Docking *in silico* erfolgen, bei welchem die Anlagerung der Cellooligosaccharide an kohlenhydratbindende Module analysiert wird. Als mögliche Ziele könnten hier beispielsweise die drei von Yaniv et al. (2014) beschriebenen kohlenhydratbindenden Regionen des *RsgI*-CBM3 Moduls aus *C. thermocellum* herangezogen werden, von welchen auch bereits die 3D-Struktur analysiert und veröffentlicht wurde. Als zusätzliche Absicherung der Ergebnisse der Dockingversuche ist es auch möglich, das kohlenhydratbindende Protein gemeinsam mit dem mutmaßlichen Elicitor zu kristallisieren und davon mittels Röntgenkristallographie die Struktur zu bestimmen.

Aufbauend auf einem genauen Modell des Bindungsverhaltens wäre es auch möglich, eine sehr spezifische und gezielte Modifikationsstrategie zu verfolgen. Wie im Abschnitt 7.5.3 bereits diskutiert wurde, haben sich nach der Chlorierung inhibierende Effekte gezeigt, welche so nach den Vorversuchen mit chlorierter Cellobiose nicht zu erwarten waren. Folglich besteht bezüglich der Modifikation zum Zweck der geringeren Bioabbaubarkeit bei gleichzeitigem Erhalt der induktiven Wirkung noch Verbesserungsbedarf. Denkbare Verbesserungen wären hier beispielsweise das gezielte Chlorieren einzelner Cellooligosaccharide mit definierter Kettenlänge und Struktur, bei welchen bereits zuvor die Wirksamkeit bestätigt wurde. Alternativ dazu ist auch eine vollkommen andere Modifikationsstrategie vorstellbar, so könnten beispielsweise die glycosidischen Bindungspartner der Cellooligosaccharide verändert werden, sodass Thioglycoside oder Selenoglycoside entstehen. Diese müssten dann immer noch eine identische Struktur wie unveränderte wirksame Cellooligosaccharide aufweisen, um dann in gleicher Weise an die kohlenhydratbindenden Module andocken zu können.

Letztlich sind jedoch Prognosen über mögliche Modifizierungsstrategien nur Spekulation, ohne über den genauen Induktionsmechanismus von cellulolytischen Enzymen in Clostridien Bescheid zu wissen. Dieser ist bereits Gegenstand aktueller Forschung (Badalato et al., 2017; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018) und auch diese Arbeit konnte dazu einen Beitrag in Form des vorgestellten synthetischen Mediums zur Biogasproduktion leisten.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abdulle, A., Wanner, G., 2002. 200 years of least squares method. *Elemente der Mathematik* 57, 45–60. <https://doi.org/10.1007/PL00000559>.
- Ahmed, A.M.S., Buezo, K.A., Saady, N.M.C., 2019. Adapting anaerobic consortium to pure and complex lignocellulose substrates at low temperature: kinetics evaluation. *Int. j. recycl. org. waste agric.* 8, 99–110. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0238-2>.
- Akinosho, H., Yee, K., Close, D., Ragauskas, A., 2014. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Front Chem* 2, 66. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00066>.
- Akpinar, O., Penner, M.H., 2008. Preparation of cellooligosaccharides: Comparative study. *J. Food Agric. Environ.* 6, 55–61.
- Akuzawa, M., Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., 2011. Distinctive Responses of Metabolically Active Microbiota to Acidification in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Microb Ecol* 61, 595–605. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9788-1>.
- Andrade, D., Pérez, C., Heuwinkel, H., 2009. Biogasgewinnung aus Grassilage: Untersuchungen zur Prozessstabilität. *Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009—Band 3*, 529–538.
- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>.
- Arrigo, Y., Henneberger, S., Wyss, U., 2015. Verdaulichkeit und Abbaubarkeit von Ganzpflanzensilagen aus Getreide und Erbsen.
- Aslanzadeh, S., Rajendran, K., Taherzadeh, M.J., 2014. A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.008>.
- Badalato, N., Guillot, A., Sabarly, V., Dubois, M., Pourette, N., Pontoire, B., Robert, P., Bridier, A., Monnet, V., Sousa, D.Z., Durand, S., Mazéas, L., Buléon, A., Bouchez, T., Mortha, G., Bize, A., 2017. Whole proteome analyses on *Ruminiclostridium cellulolyticum* show a modulation of the cellulolysis machinery in response to cellulosic materials with subtle differences in chemical and structural properties. *Plos One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170524>.
- Bandelj, P., Logar, K., Usenik, A.M., Vengust, M., Ocepek, M., 2013. An improved qPCR protocol for rapid detection and quantification of *Clostridium difficile* in cattle feces. *FEMS Microbiol. Lett.* 341, 115–121. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12102>.
- Batstone, D.J., Jensen, P.D., 2010. Anaerobic Processes, in: Wilderer, P.A. (Ed.), *Treatise on Water Science, Four-Volume Set*. Elsevier Science, pp. 615–639.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci Technol* 45, 65–73.
- Batstone, D.J., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms. *Water research* 40, 3099–3108. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.014>.
- Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R., 1994. The cellulosome — A treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 12, 379–386. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90039-6).

- Bayer, E.A., Setter, E., Lamed, R., 1985. Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 163, 552–559.
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews* 70, 567–590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>.
- Bio-Rad Laboratories, 2006. Real-Time PCR: Applications Guide.
- Bischofsberger, W., 2005. *Anaerobtechnik*, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Blumer-Schuetz, S.E., Brown, S.D., Sander, K.B., Bayer, E.A., Kataeva, I., Zurawski, J.V., Conway, J.M., Adams, M.W.W., Kelly, R.M., 2014. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 393–448. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12044>.
- Boone, D.R., Whitman, W.B., Rouvière, P., 1993. Diversity and Taxonomy of Methanogens, in: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, vol. 16. Springer US; Imprint; Springer, Boston, MA, pp. 35–80.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical journal* 382, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>.
- Bornscheuer, U., Buchholz, K., Seibel, J., 2014. Enzymatischer Abbau von (Ligno)Cellulose. *Angew. Chem.* 126, 11054–11073. <https://doi.org/10.1002/ange.201309953>.
- Bustin, S., Nolan, T., 2017. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *Eur J Clin Invest* 47, 756–774. <https://doi.org/10.1111/eci.12801>.
- Bustin, S.A., 2014. The reproducibility of biomedical research: Sleepers awake! *Biomolecular Detection and Quantification* 2, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.002>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Chandel, A.K., Singh, O.V., 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied microbiology and biotechnology* 89, 1289–1303. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3057-6>.
- Chandler, J.A., Jewell, W.J., Gossett, J.M., van Soest, P.J., Robertson, J.B. (Eds.), 1980. Predicting methane fermentation biodegradability.
- Cheng, K.J., Kudo, H., Duncan, S.H., Mesbah, A., Stewart, C.S., Bernalier, A., Fonty, G., Costerton, J.W., 1991. Prevention of fungal colonization and digestion of cellulose by the addition of methylcellulose. *Can. J. Microbiol.* 37, 484–487. <https://doi.org/10.1139/m91-081>.
- Conrad, R., Klose, M., Claus, P., Enrich-Prast, A., 2010. Methanogenic pathway, <sup>13</sup>C isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnology and Oceanography* 55. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.2.0689>.



- Contois, D.E., 1959. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *Journal of general microbiology* 21, 40–50. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-1-40>.
- Daniel-Gromke, J., 2017. Anlagenbestand Biogas und Biomethan - Biogaserzeugung und -nutzung in Deutschland: (FKZ 37EV 16 111 0). DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leipzig, 76 pp.
- Dassa, B., Borovok, I., Lamed, R., Henrissat, B., Coutinho, P., Hemme, C.L., Huang, Y., Zhou, J., Bayer, E.A., 2012. Genome-wide analysis of *Acetivibrio cellulolyticus* provides a blueprint of an elaborate cellulosome system. *Bmc Genomics* 13, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-210>.
- Davis, B. d., Mingioli, E.S., 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* 60, 17–28.
- Demain, A.L., Newcomb, M., Wu, J.H.D., 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 69, 124–154. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.124-154.2005>.
- Deppenmeier, U., 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 71, 223–283.
- Desvaux, M., 2005. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 741–764. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.003>.
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2011. *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, 906 pp.
- DIN EN ISO 11734:1998-11, 1998. Wasserbeschaffenheit\_ - Bestimmung der vollständigen anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Faulschlamm\_ - Verfahren durch Messung der Biogasproduktion (ISO\_11734:1995); Deutsche Fassung EN\_ISO\_11734:1998. Beuth Verlag GmbH, Berlin. <https://doi.org/10.31030/8015049>.
- DIN EN ISO 17294-2:, 2016. Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2:2016); German version EN ISO 17294-2:2016. Beuth Verlag GmbH, Berlin. <https://doi.org/10.31030/2353617>.
- Ding, S.-Y., Rincon, M.T., Lamed, R., Martin, J.C., McCrae, S.I., Aurilia, V., Shoham, Y., Bayer, E.A., Flint, H.J., 2001. Cellulosomal Scaffoldin-Like Proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* 183, 1945–1953. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1945-1953.2001>.
- Dissemond, H., 1993. *Biogasnutzung aus der Landwirtschaft. Reports / Umweltbundesamt UBA 93 088.* Österreich, Wien, 27 pp.
- Dobre, P., Nicolae, F., Matei, F., 2014. Main factors affecting biogas production-An overview. *Romanian Biotechnological Letters* 19, 9283–9296.
- Drake, H.L., 1995. *Acetogenesis.* Springer US, Boston, MA, 512 pp.
- DSMZ, 2015. 141. Methanogenium Medium. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium141.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf) (accessed 7 August 2020).

- DSMZ, 2016. 520. Clostridium cellulolyticum (CM3) Medium. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium520.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium520.pdf) (accessed 7 August 2020).
- DSMZ, 2019a. Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: Clostridium cellulovorans. DSM 3052. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-3052> (accessed 13 Dezember 2019).
- DSMZ, 2019b. Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: Ruminiclostridium cellulolyticum. DSM 5812. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-5812> (accessed 13 Dezember 2019).
- Eastman, J.A., Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of Particulate Organic Carbon during the Acid Phase of Anaerobic Digestion. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 53, 352–366.
- Eder, J., Barbara, E., Dorothea, H., Brite, D., Lichti, F., 2012. Silomais als Biogassubstrat. Freising.
- Eurostat, 2017. European Statistics. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/main/home> (accessed 7 Juli 2019).
- Fan, L.T., Lee, Y.-H., Beardmore, D.H., 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 177–199. <https://doi.org/10.1002/bit.260220113>.
- Fernandez Aguilar, J., 2018. Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von Clostridium cellulovorans mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Bachelorarbeit. Straubing.
- Ferry, J.G., 2010. The chemical biology of methanogenesis. *Planetary and Space Science* 58, 1775–1783. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2010.08.014>.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B., 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4117–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>.
- Filion, M. (Ed.), 2012. Quantitative real-time PCR in applied microbiology. Caister Acad. Press, Norfolk, 242 pp.
- Flotats, X., Palatsi, J., Ahring, B.K., Angelidaki, I., 2006. Identifiability study of the proteins degradation model, based on ADM1, using simultaneous batch experiments. *Water Sci Technol* 54, 31–39. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.523>.
- Gavala, H.N., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 2003. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 81, 57–93.
- Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Lyberatos, G., 1999. On the performance of a centralised digestion facility receiving seasonal agroindustrial wastewaters. *Water Sci Technol* 40, 339–346. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00382-0).
- Gelhay, E., Petitdemange, H., Gay, R., 1993. Adhesion and growth rate of Clostridium cellulolyticum ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* 175, 3452–3458. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3452-3458.1993>.

- Giallo, J., Gaudin, C., Belaich, J.P., Petitdemange, E., Caillet-Mangin, F., 1983. Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic *Clostridium* sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 843–849.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T., 1998. Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions. *Water Sci Technol* 37, 335–343. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00126-7).
- Goldsmith, L.A., 2000. Acute and subchronic toxicity of sucralose. *Food and Chemical Toxicology* 38, 53–69. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00028-4).
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T., Benizri, E., Delfosse, P., 2015. Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnol. Biofuels* 8, 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0309-9>.
- Greenberg, N.M., Warren, R.A., Kilburn, D.G., Miller, R.C., 1987. Regulation and initiation of *cenB* transcripts of *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* 169, 4674–4677. <https://doi.org/10.1128/jb.169.10.4674-4677.1987>.
- Greenspan, D., 2008. *Numerical Solution of Ordinary Differential Equations: For Classical, Relativistic and Nano Systems*. Wiley-VCH, Hoboken, 216 pp.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Water Sci. Technol.* 15, 127–167. <https://doi.org/10.2166/wst.1983.0164>.
- Han, S.O., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R.H., 2003. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* 185, 6067–6075. <https://doi.org/10.1128/jb.185.20.6067-6075.2003>.
- Hatfield, R., Fukushima, R.S., 2005. Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Science* 45, 832. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0238>.
- Hattori, S., 2008. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes Environ* 23, 118–127. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.118>.
- Hauer, I., 1993. *Österr. Biogas-, Klärgas- und Deponiegasanlagen im Praxisbetrieb*. ÖKL.
- Hecker, K.H., Roux, K.H., 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques* 20, 478–485. <https://doi.org/10.2144/19962003478>.
- Helffrich, D., Oechsner, H., 2003. *Hohenheimer Biogasertragstest*. 2003 58, 2. <https://doi.org/10.15150/lt.2003.1461>.
- Hendriks, A.T.W.M., van Lier, J.B., Kreuk, M.K. de, 2018. Growth media in anaerobic fermentative processes: The underestimated potential of thermophilic fermentation and anaerobic digestion. *Biotechnol. Adv.* 36, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.004>.
- Henrissat, B., 2019. CAZy - carbohydrate active enzymes: Carbohydrate-active enzymes database. <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html> (accessed 16 September 2019).

- Henze, M., 2008. Biological wastewater treatment : principles, modelling and design. IWA Pub, London.
- Herr, P., 2013. Asche und Erz. Die Mitverarbeitung von Klärschlammasche in der Düngemittelindustrie nutzt bestehende Produktionsanlagen für die Phosphorrückgewinnung. *ReSource* 26, 20–26.
- Hiltner, P., Dehority, B.A., 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 642–648.
- Holwerda, E.K., Lynd, L.R., 2013. Testing Alternative Kinetic Models for Utilization of Crystalline Cellulose (Avicel) by Batch Cultures of *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2389–2394. <https://doi.org/10.1002/bit.24914>.
- Holzappel, B., Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit* 37, 120–126. <https://doi.org/10.1002/biuz.200610332>.
- Huang, W., Wang, Z., Zhou, Y., Ng, W.J., 2015. The role of hydrogenotrophic methanogens in an acidogenic reactor. *Chemosphere* 140, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.047>.
- IEA Publications, 2017. Technology Roadmap: Delivering Sustainable Bioenergy. OECD Publishing, Paris, 94 pp.
- Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, 2008. Getreideganzpflanzensilage zur Biogaserzeugung: LfL-Information. Freising.
- Jabłoński, S., Rodowicz, P., Łukaszewicz, M., 2015. Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1360–1368. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000065>.
- Jain, S., Lala, A.K., Bhatia, S.K., Kudchadker, A.P., 1992. Modelling of hydrolysis controlled anaerobic digestion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53, 337–344. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530404>.
- Johnson, E.A., 1983. Regulation of Cellulase Activity and Synthesis in *Clostridium Thermocellum*. (Doctoral dissertation). Massachusetts Institute of Technology, 174 pp.
- Johnson, E.A., Madia, A., Demain, A.L., 1981. Chemically Defined Minimal Medium for Growth of the Anaerobic Cellulolytic Thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1060–1062.
- Junicke, H., Abbas, B., Oentoro, J., van Loosdrecht, M., Kleerebezem, R., 2014. Absolute quantification of individual biomass concentrations in a methanogenic coculture. *AMB Express* 4, 35. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0035-x>.
- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>.
- Kablan, T., Clément, Y.B.Y., Françoise, K.A., Mathias, O.K., 2008. Determination and modelling of moisture sorption isotherms of chitosan and chitin. *Acta Chimica Slovenica* 55, 677–682.
- Kaiser, F., Metzner, T., Effenberger, M., Gronauer, A., 2008. Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.
- Kiener, A., Leisinger, T., 1983. Oxygen Sensitivity of Methanogenic Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80017-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80017-4).

- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Koeck, D.E., Pechtl, A., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 2014a. Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.002>.
- Koeck, D.E., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2014b. Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: Genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Systematic and Applied Microbiology* 37, 311–319.
- Köllmeier, T., 2014. Analyse spezialisierter Bakteriengemeinschaften und deren cellulolytische Hauptvertreter für die Hydrolyse in thermophilen Biogasanlagen. München, 163 pp.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 1997. Energie für die Zukunft: Erneuerbare Energieträger: Weißbuch für eine Gemeinschaftsstrategie und Aktionsplan. Brüssel.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 2007a. Begrenzung des globalen Klimawandels auf 2 Grad Celsius Der Weg in die Zukunft bis 2020 und darüber hinaus: Mitteilung der Kommission an den Rat, das Europäische Parlament, den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen. COM2007 2, Brüssel.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 2007b. Eine Energiepolitik für Europa: Mitteilung der Kommission an den Rat und das Europäische Parlament. COM2007 1, Brüssel.
- Koster, I.W., 1989. Toxicity in anaerobic digestion: with emphasis on the effect of ammonia, sulfide and long-chain fatty acids on methanogenesis. Wageningen.
- Kovács, E., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2013. Biogas production from protein-rich biomass: fed-batch anaerobic fermentation of casein and of pig blood and associated changes in microbial community composition. *Plos One* 8, e77265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077265>.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögren, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>.
- Kudo, H., Cheng, K.J., Costerton, J.W., 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33, 267–272. <https://doi.org/10.1139/m87-045>.
- Leibovitz, E., Béguin, P., 1996. A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. *J. Bacteriol.* 178, 3077–3084. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3077-3084.1996>.
- Leibovitz, E., Ohayon, H., Gounon, P., Béguin, P., 1997. Characterization and subcellular localization of the *Clostridium thermocellum* scaffoldin dockerin binding protein SdbA. *J. Bacteriol.* 179, 2519–2523. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2519-2523.1997>.
- Lemaire, M., Ohayon, H., Gounon, P., Fujino, T., Béguin, P., 1995. OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domains to components of the cell envelope. *J. Bacteriol.* 177, 2451–2459. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2451-2459.1995>.

- LFL Pflanzenbau, 2020. Mais für die Biogasanlage. Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft. <https://www.lfl.bayern.de/ipz/mais/026660/index.php> (accessed 1 Mai 2020).
- Li, A., Chu, Y.N., Wang, X.M., Ren, L.F., Yu, J., Liu, X.L., Yan, J.B., Zhang, L., Wu, S.X., Li, S.Z., 2013. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol. Biofuels* 6. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-3>.
- Li, R., Feng, Y., Liu, S., Qi, K., Cui, Q., Liu, Y.J., 2018. Inducing effects of cellulosic hydrolysate components of lignocellulose on cellulosome synthesis in *Clostridium thermocellum*. *Microb. Biotechnol.* 11, 905–916. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13293>.
- Liebetrau, J., Kraft, E., Bidlingmaier, W., 2004. The influence of the hydrolysis rate of co-substrates on process behavior. In: Guiot, S.G. (Ed.), *Proceedings of the Tenth World Congress on Anaerobic bioconversion*, 1296–1300.
- Liebetrau, J., Pfeiffer, D., Thrän, D., 2015. *Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich*, 2nd ed. DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leibzig.
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>.
- Lo Liew, N., Shi, J., Li, Y., 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: International Conference on Lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy* 46, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.014>.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 2000. How Quantitative is Quantitative PCR with Respect to Cell Counts? *Systematic and Applied Microbiology* 23, 556–562. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80030-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80030-2).
- Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.08.009>.
- MacDonald, P., Henderson, N., Heron, S., 1991. *The biochemistry of silage*, 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, 340 pp.
- Macias-Corral, M., Samani, Z., Hanson, A., Smith, G., Funk, P., Yu, H., Longworth, J., 2008. Anaerobic digestion of municipal solid waste and agricultural waste and the effect of co-digestion with dairy cow manure. *Bioresource Technol* 99, 8288–8293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.057>.
- MacKenzie, C.R., Bilous, D., 1982. Location and kinetic properties of the cellulase system of *Acetivibrio cellulolyticus*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1158–1164. <https://doi.org/10.1139/m82-171>.
- Mahdy, A., Fotidis, I.A., Mancini, E., Ballesteros, M., González-Fernández, C., Angelidaki, I., 2017. Ammonia tolerant inocula provide a good base for anaerobic digestion of microalgae in third generation biogas process. *Bioresource Technol* 225, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.086>.
- Mandels, M., Reese, E.T., 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 79, 816–826.
- Marchessault, R.H., Howsmon, J.A., 1957. Experimental Evaluation of the Lateral-Order Distribution in Cellulose. *Textile Research Journal* 27, 30–41. <https://doi.org/10.1177/004051755702700105>.

- Marchessault, R.H., Sundararajan, P.R., 1983. 2 - Cellulose, in: ASPINALL, G.O. (Ed.), *The Polysaccharides*. Academic Press, pp. 11–95.
- Mardanov, A.V., Kochetkova, T.V., Beletsky, A.V., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Ravin, N.V., Skryabin, K.G., 2012. Complete genome sequence of the hyperthermophilic cellulolytic crenarchaeon "Thermogladius cellulolyticus" 1633. *Journal of bacteriology* 194, 4446–4447. <https://doi.org/10.1128/JB.00894-12>.
- Matsui, K., Bae, J., Esaka, K., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M., 2013. Exoproteome profiles of *Clostridium cellulovorans* grown on various carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6576–6584. <https://doi.org/10.1128/AEM.02137-13>.
- Mayer, F., Coughlan, M.P., Mori, Y., Ljungdahl, L.G., 1987. Macromolecular Organization of the Cellulolytic Enzyme Complex of *Clostridium thermocellum* as Revealed by Electron Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2785–2792.
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., Rohlin, L., Gunsalus, R.P., 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 58–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.005>.
- McInerney, M.L., 1988. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. *Biology of anaerobic organisms*.
- McLean, B.W., Bray, M.R., Boraston, A.B., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., Kilburn, D.G., 2000. Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein engineering* 13, 801–809. <https://doi.org/10.1093/protein/13.11.801>.
- Melcher, M., Scharl, T., Luchner, M., Striedner, G., Leisch, F., 2017. Boosted structured additive regression for *Escherichia coli* fed-batch fermentation modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 321–334. <https://doi.org/10.1002/bit.26073>.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M., 2001. Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *J Dairy Sci* 84, 1294–1309. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70159-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2).
- Miron, Y., Zeeman, G., van B Lier, J., Lettinga, G., 2000. The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water research* 34, 1705–1713. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00280-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00280-8).
- Mohanty, A.K., Misra, M., Hinrichsen, G., 2000. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromol. Mater. Eng.* 276-277, 1–24. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1439-2054\(20000301\)276:1<1:AID-MAME1>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1439-2054(20000301)276:1<1:AID-MAME1>3.0.CO;2-W).
- Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (Eds.), 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser Boston, Boston, MA, 1 Online-Ressource (XXII), 458.
- Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R.H., 2002. Determination of subunit composition of *Clostridium cellulovorans* cellulosomes that degrade plant cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1610–1615. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1610-1615.2002>.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).

- Nagy, T., Simpson, P., Williamson, M.P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., Orosz, L., 1998. All three surface tryptophans in Type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Letters* 429, 312–316. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00625-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00625-5).
- Nataf, Y., Bahari, L., Kahel-Raifer, H., Borovok, I., Lamed, R., Bayer, E.A., Sonenshein, A.L., Shoham, Y., 2010. *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18646–18651. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012175107>.
- Ng, T.L., Eheart, J.W., Cai, X., Miguez, F., 2010. Modeling *Miscanthus* in the soil and water assessment tool (SWAT) to simulate its water quality effects as a bioenergy crop. *Environmental science & technology* 44, 7138–7144. <https://doi.org/10.1021/es9039677>.
- Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A., 2009. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. IUPAC, Research Triangle Park, NC.
- Ortiz-Tena, J.G., Ruhmann, B., Schieder, D., Sieber, V., 2016. Revealing the diversity of algal monosaccharides: Fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation. *Algal Res.* 17, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.008>.
- Pagès, S., Bélaïch, A., Bélaïch, J.P., Morag, E., Lamed, R., Shoham, Y., Bayer, E.A., 1997. Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins* 29, 517–527.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technol* 74, 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X).
- Pap, B., Györkei, Á., Boboescu, I.Z., Nagy, I.K., Bíró, T., Kondorosi, É., Maróti, G., 2015. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresour. Technol.* 177, 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.021>.
- Park, J., Park, S., Kim, M., 2014. Anaerobic degradation of amino acids generated from the hydrolysis of sewage sludge. *Environmental technology* 35, 1133–1139. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.863951>.
- Parrish, D.J., Fike, J.H., 2009. Selecting, establishing, and managing switchgrass (*Panicum virgatum*) for biofuels. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 581, 27–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8_2).
- Patón, M., Rodríguez, J., 2019. A compilation and bioenergetic evaluation of syntrophic microbial growth yields in anaerobic digestion. *Water research* 159, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.013>.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Control* 21, 411–490. <https://doi.org/10.1080/10643389109388424>.
- Perevalova, A.A., Svetlichny, V.A., Kublanov, I.V., Chernyh, N.A., Kostrikina, N.A., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Bonch-Osmolovskaya, E.A., 2005. *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 995–999. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63378-0>.



- Pérez, R., 1997. Feeding pigs in the tropics. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 185 pp.
- Pizzi, A., Eaton, N., 1985. The Structure of Cellulose by Conformational Analysis. 2. The Cellulose Polymer Chain. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 22, 105–137. <https://doi.org/10.1080/00222338508063300>.
- Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., Guebitz, G.M., 2010. Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresour. Technol.* 101, 836–839. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.076>.
- Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., 2000. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 459–465. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00195-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00195-7).
- Qiao, J.T., Qiu, Y.L., Yuan, X.Z., Shi, X.S., Xu, X.H., Guo, R.B., 2013. Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. *Bioresour. Technol.* 143, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.014>.
- Rajoka, M.I., Malik, K.A., 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* 59, 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00136-8).
- Richards, M.A., Lie, T.J., Zhang, J., Ragsdale, S.W., Leigh, J.A., Price, N.D., 2016. Exploring Hydrogenotrophic Methanogenesis: a Genome Scale Metabolic Reconstruction of *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.* 198, 3379–3390. <https://doi.org/10.1128/JB.00571-16>.
- Rogers-Broadway, K.-R., Karteris, E., 2015. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Exp Ther Med* 10, 1261–1264. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712>.
- Rühmann, B., Schmid, J., Sieber, V., 2015. High throughput exopolysaccharide screening platform: From strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydr. Polym.* 122, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.021>.
- Saddler, J.N., Khan, A.W., Martin, S.M., 1980. Regulation of cellulase synthesis in *Acetivibrio cellulolyticus*. *Microbios* 28, 97–106.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)* 230, 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>.
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 929–936. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65571-0>.
- Sanders, W.T.M., 2001. Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. Wageningen, Univ., Diss., 2001, 101 pp.
- Saunders, N., Lee, M.A. (Eds.), 2013. Real-time PCR: Advanced technologies and applications. Caister Academic, Norfolk, UK, 1 online resource (vi, 283).
- Scarlat, N., Dallemand, J.-F., Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy* 129, 457–472. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006>.

- Schiffman, S.S., Rother, K.I., 2013. Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 16, 399–451. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>.
- Schink, B., Stams, A.J.M., 2013. Syntrophism Among Prokaryotes, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The prokaryotes*, 4th ed. Springer, Berlin, pp. 471–493.
- Schluter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Krahn, I., Krause, L., Kromeke, H., Kruse, O., Mussgnug, J.H., Neuweger, H., Niehaus, K., Puhler, A., Runte, K.J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehover, P., Goesmann, A., 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.008>.
- Schnurer, A., Schink, B., Svensson, B.H., 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International journal of systematic bacteriology* 46, 1145–1152. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1145>.
- Schober, C.M., 2008. Untersuchungen zum Einsatz technischer und mikrobiell hergestellter Enzymsysteme zur Hydrolyse der Lignocellulose in Maissilage. Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss, 2008. Logos-Verl., Berlin, 159 pp.
- Sevier, C.S., Kaiser, C.A., 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 836–847. <https://doi.org/10.1038/nrm954>.
- Singh, K.M., Pandya, P.R., Tripathi, A.K., Patel, G.R., Parnerkar, S., Kothari, R.K., Joshi, C.G., 2014. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta gene* 2, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.01.001>.
- Sleat, R., Mah, R.A., Robinson, R., 1984. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 88.
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L.C., Wolters, A., van Elsas, J.D., 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 78–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02999.x>.
- SOER, 2015. State of the Environment Report (SOER): Waste - municipal solid waste generation and management. European Environment Agency. <https://www.eea.europa.eu/soer-2015/countries-comparison/waste> (accessed 22 Juli 2019).
- Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S.C., Long, S.P., 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science (New York, N.Y.)* 329, 790–792. <https://doi.org/10.1126/science.1189268>.
- Sousa, D.Z., Smidt, H., Alves, M.M., Stams, A.J.M., 2009. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS microbiology ecology* 68, 257–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00680.x>.
- South, C.R., Hogsett, D.A.L., Lynd, L.R., 1995. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 797–803. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00016-K](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00016-K).
- Stachowiak, H., 1973. *Allgemeine Modelltheorie*. Springer, Wien, 494 pp.

- Stack, R.J., Hungate, R.E., 1984. Effect of 3-Phenylpropanoic Acid on Capsule and Cellulases of *Ruminococcus albus* 8. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 218–223.
- Stams, A.J.M., Plugge, C.M., 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature reviews. Microbiology* 7, 568–577. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2166>.
- Stolze, Y., Zakrzewski, M., Maus, I., Eikmeyer, F., Jaenicke, S., Rottmann, N., Siebner, C., Puhler, A., Schluter, A., 2015. Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnol. Biofuels* 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0193-8>.
- Stone, J.E., Scallan, A.M., Donefer, E., Ahlgren, E., 1969. Digestibility as a Simple Function of a Molecule of Similar Size to a Cellulase Enzyme, in: Reese, E.T., Hajny, G.J. (Eds.), *Cellulases and Their Applications*, vol. 95. American Chemical Society, pp. 219–241.
- Strümpfel, F., 2019. VERBIO weiht weltweit erste Strohverarbeitungsanlage zur Biomethanproduktion ein - Corporate News < Aktuelles & Publikationen < Investor Relations | VERBIO AG - Biofuel and Technology. <https://www.verbio.de/investor-relations/aktuelles-publikationen/corporate-news/verbio-weiht-weltweit-erste-strohverarbeitungsanlage-zur-biomethanproduktion-ein/> (accessed 22 Juli 2019).
- Sun, C., Liu, R., Cao, W., Yin, R., Mei, Y., Le Zhang, 2015. Impacts of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment on Chemical Composition and Biochemical Methane Potential of Agricultural Crop Stalks: Energy & Fuels. *Energy Fuel* 29, 4966–4975. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00838>.
- Tang, H., Ou, J.F., Zhu, M.J., 2015. Development of a quantitative real-time PCR assay for direct detection of growth of cellulose-degrading bacterium *Clostridium thermocellum* in lignocellulosic degradation. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1333–1344. <https://doi.org/10.1111/jam.12801>.
- Tebbe, C.C., Vahjen, W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657–2665.
- Thurner, S., Konrad, M., Strobl, M., 2013. Substratbereitstellung von Grünland aus verfahrenstechnischer Sicht: Biogas Forum Bayern. Freising.
- Tong, X., McCarty, P.L., 1991. Microbial hydrolysis of lignocellulosic materials, in: *Methane from community wastes*. Elsevier Science Publishers Ltd, Barking, pp. 61–100.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., Steitz, T.A., 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *Embo J* 15, 5739–5751.
- Trache, D., Hussin, M.H., Hui Chuin, C.T., Sabar, S., Fazita, M.R.N., Taiwo, O.F.A., Hassan, T.M., Haafiz, M.K.M., 2016. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application-A review. *International journal of biological macromolecules* 93, 789–804. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.056>.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40, e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- van Foreest, F., 2012. Perspectives for Biogas in Europe. OIES paper: NG 70. Oxford Institute for Energy Studies. <https://www.oxfordenergy.org/wpcms/wp-content/uploads/2012/12/NG-70.pdf>.

- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste management (New York, N.Y.)* 28, 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technol* 56, 229–237. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00034-X).
- VDI-Richtlinie 4630, V.D.I. VDI Richtlinie 4630 (2016): Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche.
- Veeken, A., Hamelers, B., 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technol* 69, 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00188-6).
- Vrieze, J. de, Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technol* 112, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>.
- Wang, Z.-W., Li, Y., 2014. A theoretical derivation of the Contois equation for kinetic modeling of the microbial degradation of insoluble substrates. *Biochemical Engineering Journal* 82, 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.002>.
- Weiser, C., Zeller, V., Reinicke, F., Wagner, B., Majer, S., Vetter, A., Thraen, D., 2014. Integrated assessment of sustainable cereal straw potential and different straw-based energy applications in Germany. *Applied Energy* 114, 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.016>.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wirth, R., Kovacs, E., Maroti, G., Bagi, Z., Rakhely, G., Kovacs, K.L., 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5, 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>.
- Wolfe, R.S., 2011. Techniques for cultivating methanogens. *Methods in enzymology* 494, 1–22. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385112-3.00001-9>.
- Wu, X., Yao, W., Zhu, J., 2010. Effect of pH on continuous biohydrogen production from liquid swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor. *Int J Hydrogen Energ* 35, 6592–6599. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.097>.
- Xu, C.G., Huang, R.R., Teng, L., Wang, D.M., Hemme, C.L., Borovok, I., He, Q., Lamed, R., Bayer, E.A., Zhou, J.Z., Xu, J., 2013. Structure and regulation of the cellulose degradome in *Clostridium cellulolyticum*. *Biotechnol. Biofuels* 6. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-73>.
- Xu, Q., Gao, W., Ding, S.-Y., Kenig, R., Shoham, Y., Bayer, E.A., Lamed, R., 2003. The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J. Bacteriol.* 185, 4548–4557. <https://doi.org/10.1128/jb.185.15.4548-4557.2003>.
- Yamada, K., Xu, H.-L., 2001. Properties and Applications of an Organic Fertilizer Inoculated with Effective Microorganisms. *Journal of Crop Production* 3, 255–268. [https://doi.org/10.1300/J144v03n01\\_21](https://doi.org/10.1300/J144v03n01_21).
- Yang, S.-J., Kataeva, I., Hamilton-Brehm, S.D., Engle, N.L., Tschaplinski, T.J., Doepfke, C., Davis, M., Westpheling, J., Adams, M.W.W., 2009. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass,

- without pretreatment, by the thermophilic anaerobe "Anaerocellum thermophilum" DSM 6725. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4762–4769. <https://doi.org/10.1128/AEM.00236-09>.
- Yaniv, O., Fichman, G., Borovok, I., Shoham, Y., Bayer, E.A., Lamed, R., Shimon, L.J.W., Frolov, F., 2014. Fine-structural variance of family 3 carbohydrate-binding modules as extracellular biomass-sensing components of *Clostridium thermocellum* anti-sigma(I) factors. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 70, 522–534. <https://doi.org/10.1107/S139900471302926x>.
- Zhang, J.-G., Li, Q.-M., Thakur, K., Faisal, S., Wei, Z.-J., 2017. A possible water-soluble inducer for synthesis of cellulase in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* 226, 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.028>.
- Zhang, Y., Tang, B., Du, G., 2018. Transcriptional regulator XYR1 activates the expression of cellobiose synthase to promote the production of cellulase from glucose. *Biotechnology Letters* 40, 973–979. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2549-9>.
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2005. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7321–7325. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408734102>.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>.
- Zinder, S.H., Koch, M., 1984. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* 138, 263–272. <https://doi.org/10.1007/BF00402133>.
- Znameroski, E.A., Coradetti, S.T., Roche, C.M., Tsai, J.C., Iavarone, A.T., Cate, J.H.D., Glass, N.L., 2012. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118440109>.
- Zverlov, V.V., Köck, D.E., Schwarz, W.H., 2015. The Role of Cellulose-Hydrolyzing Bacteria in the Production of Biogas from Plant Biomass, in: Kamm, B. (Ed.), *Microorganisms in Biorefineries*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 335–361.
- Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 2008. Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems--*Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 298–307. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.008>.

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick über die 4 Reaktionsschritte der Biogaserzeugung .....	7
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Cellulosoms nach Yanif et al. (2014) .....	16
Abbildung 3: Wachstum von <i>C. cellulolyticum</i> auf Cellulose nach Xu et al. (2013) .....	18
Abbildung 4: Ein Model der Regulation des Celluloseabbaus in <i>C. cellulolyticum</i> .....	19
Abbildung 5: Eine vorgeschlagene Genregulation der cellulosomalen Gene .....	20
Abbildung 6: RT-PCR Analyse der Genexpression von $\sigma$ -Faktoren (Nataf et al., 2010) .....	21
Abbildung 7: Abbildung der Cellulose bindenden Region des RsgI-CBM3 Moduls entnommen aus Yaniv et al. (2014).....	22
Abbildung 8: Strukturformel von SYBR-green .....	34
Abbildung 9: Schema eines qPCR-Laufes erstellt mit der CFX Manager <sup>TM</sup> Software .....	35
Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrationsgeraden einer qPCR.....	36
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der getesteten Substrate .....	45
Abbildung 12: Überblick über die Gasproduktion der durchgeführten Batchversuche .....	69
Abbildung 13: Zusammenfassung des Fermentationsbeginns im Fermenter 3.....	71
Abbildung 14: Ganglinien der erfolgreichen Leistungssteigerung im Fermenter 3 .....	74
Abbildung 15: Zusammenfassung der Versuche im Fermenter 3 nach dem Versäuern.....	75
Abbildung 16: Elicitortests basierend auf der Biogasproduktion.....	77
Abbildung 17: Vergleich der Feedunterbrechung für 30 h und 49,5h .....	78
Abbildung 18: Überblick über die nach Gleichung [4] ermittelten $\beta$ -Werte.....	79
Abbildung 19: Vergleich der Modelle 1. und 2. Ordnung .....	80
Abbildung 20: Vergleich des Verlaufs der k-Wert Ermittlung im Kolbenprober .....	81
Abbildung 21: Ermittlung der Reaktionskonstanten k nach dem Modell 1. Ordnung für eine Versuchsreihe bei einer OLR von $2,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$ .....	83
Abbildung 22: Ermittlung der Reaktionskonstanten k nach dem Modell 1. Ordnung für eine Versuchsreihe bei einer OLR von $4,8 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$ .....	84
Abbildung 23: Ermittlung der Reaktionskonstanten für eine Versuchsreihe mit chlorierten Cellooligosacchariden .....	85
Abbildung 24: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von Methylcellulose .....	86
Abbildung 25: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von chlorierter Cellobiose... ..	86
Abbildung 26: Chromatogramm der Cellooligosaccharidmischung im ESI Detektor nach Auftrennung in der HPLC .....	87

Abbildung 27: Chromatogramm der chlorierten Cellooligosaccharide im Massenspektrometer nach Auftrennung in der HPLC .....	87
Abbildung 28: Massenspektrum der chlorierten Cellooligosaccharide .....	88
Abbildung 29: Gasproduktion im Kolbenprober mit und ohne Zusatz von chlorierten Cellooligosacchariden .....	88
Abbildung 30: qPCR-Lauf mit 60 °C Annealingtemperatur für 60 s mit Primern spezifisch für <i>C. cellulovorans</i> .....	90
Abbildung 31: qPCR-Lauf mit 60 °C Annealingtemperatur für 30 s mit Primern spezifisch für <i>C. cellulolyticum</i> .....	91
Abbildung 32: qPCR-Lauf zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für <i>C. cellulolyticum</i> .....	92
Abbildung 33: qPCR-Lauf zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration für <i>C. cellulolyticum</i> .....	92
Abbildung 34: Ermittlung der qPCR-Effizienz für <i>C. cellulolyticum</i> .....	93
Abbildung 35: Kontrolle auf eventuell vorhandene Hemmstoffe .....	94
Abbildung 36: Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktion aus dem Fermenter .....	94
Abbildung 37: Reproduzierbarkeit der Probennahme aus dem Fermenter .....	95
Abbildung 38: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Quantifizierung von <i>C. cellulolyticum</i> .....	96
Abbildung 39: Eine Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von <i>C. cellulolyticum</i> .....	96
Abbildung 40: Überblick über die Reproduzierbarkeit der qPCR-Läufe von <i>C. cellulolyticum</i> .....	97
Abbildung 41: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Quantifizierung von <i>C. cellulovorans</i> .....	98
Abbildung 42: Eine Kalibrationsgerade zur Quantifizierung von <i>C. cellulovorans</i> .....	99
Abbildung 43: Überblick über die Reproduzierbarkeit der qPCR-Läufe von <i>C. cellulovorans</i> .....	99
Abbildung 44: Veränderung der Konzentration von <i>C. cellulolyticum</i> und <i>C. cellulovorans</i> im Fermenter 1 während der Elicitortests .....	100
Abbildung 45: Veränderung der Konzentration von <i>C. cellulolyticum</i> und <i>C. cellulovorans</i> im Fermenter 2 während der Elicitortests .....	101
Abbildung 46: Verlauf der Gesamt- und Clostridienbiomasse zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation im Fermenter 3 .....	102
Abbildung 47: Verlauf der Gesamt- und Clostridienbiomasse bei Erhöhung der Raumbelastung im Fermenter 3 .....	103
Abbildung 48: Verlauf der <i>C. cellulolyticum</i> konzentration während einer Feedunterbrechung von 26 h .....	104
Abbildung 49: Verlauf der <i>C. cellulovorans</i> konzentration während einer Feedunterbrechung von 26 h .....	104

Abbildung 50: Agarosegel zur Analyse der qPCR-Produkte .....	105
Abbildung 51: Schmelzpunktanalyse der qPCR-Produkte der Quantifizierung von <i>C. cellulolyticum</i> .....	106
Abbildung 52: Schmelzpunktanalyse der qPCR-Produkte der Quantifizierung von <i>C. cellulovorans</i> .....	107
Abbildung 53: Zunahme der Fluoreszenzwerte im qPCR-Lauf zur Ermittlung der cq-Werte zum Nachweis von <i>C. thermocellum</i> .....	108

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über bereits in Biogasanlagen nachgewiesenen Mikroorganismen .....	12
Tabelle 2: Zusammensetzung des L47 Mediums.....	45
Tabelle 3: Zusammensetzung des MJ Mediums.....	46
Tabelle 4: Zusammensetzung des 141 Methanogenium Mediums (M141) .....	46
Tabelle 5: Zusammensetzung des in dieser Arbeit zur kontinuierlichen Biogasproduktion entwickelten synthetischen Fermentermediums .....	47
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Vitaminlösung.....	47
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung .....	48
Tabelle 8: Zusammensetzung des 520 Ruminoclostridium cellulolyticum (CM3) Mediums .....	48
Tabelle 9: Zusammensetzung von LB-Agar mit Ampicillin .....	49
Tabelle 10: Zusammensetzung des LB-Mediums mit Ampicillin .....	49
Tabelle 11: Zusammensetzung des SOC-Mediums .....	49
Tabelle 12: Überblick über die verwendeten Primer .....	51
Tabelle 13: Überblick über die Batchversuche im Kolbenprober .....	53
Tabelle 14: Überblick über die getesteten Elicitoren .....	55
Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Ansätze zur Modellierung des Substratabbaus.....	59
Tabelle 16: qPCR Reaktionsansätze mit dem SYBR-Green Supermix.....	64
Tabelle 17: Reaktionsansatz für PCR Ansätze mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase .....	65
Tabelle 18: Zusammensetzung des Gibbson Master Mix.....	66
Tabelle 19: Zusammenfassung der ermittelten Eigenschaften beider verwendeter Inokula.....	68
Tabelle 20: Detaillierter Überblick über die Batchversuche zur Medienauswahl.....	70
Tabelle 21: Überblick über die im Fermenter ermittelten Reaktionskonstanten 1. Ordnung.....	82
Tabelle 22: Überblick über die batchweise ermittelten Reaktionskonstanten.....	82
Tabelle 23: Ergebnis der Primerspezifitätsabfrage für die spezifischen <i>C. cellulovorans</i> Primer .....	89
Tabelle 24: Ergebnis der Primerspezifitätsabfrage für die spezifischen <i>C. cellulolyticum</i> Primer .....	89



Tabelle 25: Zusammenfassung und Einteilung der Sequenzierungsergebnisse der qPCR-Produkte aus der Quantifizierung von <i>C. cellulolyticum</i> .....	107
Tabelle 26: Zusammenfassung und Einteilung der Sequenzierungsergebnisse der qPCR-Produkte aus der Quantifizierung von <i>C. cellulovorans</i> .....	107
Tabelle 27: Übersicht über berechnete Biomassekonzentrationen .....	114

### 10.3 Abkürzungsverzeichnis

ADM1	<i>Anaerobe Digestion Model 1</i>
bp	Basenpaare
C:N:P:S-Verhältnis	Kohlenstoff:Stickstoff:Phosphor:Schwefel-Verhältnis
C:N-Verhältnis	Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnis
C1-Verbindungen	Organische Verbindungen mit einem Kohlenstoffatom
CBD	carbohydrate binding domain – kohlenhydratbindende Domäne
CBM	carbohydrate binding module – kohlenhydratbindendes Modul
cre	cAMP-response-element – cAMP-Reaktionselement
<i>for</i>	forward primer; vorwärts gerichteter Primer, codiert für das 5`Ende
gDNA	genomische DNA
Getreide GPS	Getreide Ganzpflanzensilage
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	hydraulic retention time – hydraulische Verweilzeit
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MRD	mean relative deviation – mittlere relative Abweichung
mrd.	Milliarde(n)
Nm <sup>3</sup> , Nml	Normvolumen, Volumen bei Standardbedingungen in m <sup>3</sup> oder ml
OLR	Organic loading rate – organische Raumbelastung
oTS	Organische Trockensubstanz
qPCR	quantitative polymerase chain reaction - Quantitative Polymerase Kettenreaktion
<i>rev</i>	reverse primer; rückwärts gerichteter Primer, codiert für das 3`Ende

---

RMSE	Root mean squared error – Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung
T	Temperatur
TCS	Two component system - Zweikomponentensystem
TS	Trockensubstanz

10.4 Weiterführende Abbildungen

Daten der Kolbenprober zur Medienentwicklung - Einzelwerte:

