

**Optimierung des Lignocelluloseabbaus in Biogasanlagen  
mit Hilfe von Basidiomyceten**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

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

genehmigte Dissertation

von

**Waldemar Golubzow, M. Sc.**

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 14.08.2018

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas und die kontinuierliche Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Diana Linke, die mich bei meiner Arbeit herzlich mit Rat und Tat betreut und unterstützt hat und für die geleistete Vorarbeit bei diesem Projekt. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die praktischen Ratschläge.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Scheper (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die Übernahme des Korreferats und bei Herrn Prof. Dr. Kirschning (Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die Übernahme des Vorsitzes meiner Disputation bedanken.

Ein weiteres großes Dankeschön möchte ich hiermit an Frau Meike Takenberg für die praktische Unterstützung bei den Laborarbeiten richten.

Einen besonderen Dank spreche ich an Frau Christiane Dieckmann und Frau Iryna Atamaniuk von der Technischen Universität Hamburg-Harburg für die angenehme Zusammenarbeit und die Biogasmessungen der Proben aus. Ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kollegen für die gemeinsame tolle Zeit und insbesondere bei Frau Miriam Meyer für unsere unvergesslichen Posaunen/Klavier-Duette.

Den Mitarbeiterinnen des Sekretariats, Frau Suzanne Scheerbaum und Frau Ute Beckmann, danke ich für die Hilfe in organisatorischen Dingen.

Außerdem danke ich meinen HiWis Katharina Weißenborn und Maike Lüftner sowie meinem Forschungspraktikanten Anton Enders für die praktische Unterstützung im Labor.

Zudem danke ich meiner Mutter Ida Frank und meinen Freunden, die immer für mich da waren.

## **Vorbemerkungen**

Diese Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „LignoMyc – Optimierung des Lignocelluloseabbaus in Biogasanlagen mit Hilfe von Basidiomyceten“ in Kooperation mit dem Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft (IUE) der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) durchgeführt. Das Projekt wurde durch die Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) finanziell unterstützt (Förderkennzeichen: 22015413 und 22015814). Die praktischen Arbeiten wurden im Zeitraum von Januar 2015 bis Dezember 2017 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....   | <b>I</b>    |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>V</b>    |
| <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>VII</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>VIII</b> |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>1</b>    |
| 1.1    Biogas.....  | 2           |
| 1.1.1    Biogas und seine Entstehung.....                                 | 2           |
| 1.1.2    Biogasanlagen .....  | 4           |
| 1.1.3    Biogasaufbereitung.....  | 5           |
| 1.1.4    Messung der Biogausausbeute .....                                | 6           |
| 1.1.5    Vorhersage der Biogausausbeute am Beispiel von Weizenstroh ..... | 7           |
| 1.2    Lignin .....   | 10          |
| 1.3    Ligninolytische Enzyme aus Basidiomyceten.....                     | 11          |
| 1.3.1    Laccasen .....   | 12          |
| 1.3.2    Manganperoxidasen.....   | 13          |
| 1.3.3    Ligninperoxidasen .....  | 14          |
| 1.4    Motivation und Zielsetzung.....                                    | 14          |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....                                      | <b>18</b>   |
| 2.1    Chemikalien.....   | 18          |
| 2.2    Allgemeine Geräte.....   | 18          |
| 2.3    Kultivierung.....  | 19          |
| 2.3.1    Basidiomycetenstämme.....  | 19          |
| 2.3.2    Stammhaltung.....  | 20          |
| 2.3.3    Nährmedien .....   | 20          |
| 2.3.4    Ansetzen und Ernte von Vorkulturen .....                         | 21          |
| 2.3.5    Ansetzen submerser Hauptkulturen.....                            | 22          |
| 2.3.6    Ansetzen emerser Hauptkulturen .....                             | 22          |
| 2.3.7    Probenahme .....   | 23          |
| 2.4    Ausplattieren .....  | 24          |
| 2.5    Enzymassays .....  | 24          |
| 2.5.1    ABTS-Assay.....  | 24          |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.5.2    | Cellulase-Assay .....  | 25        |
| 2.5.3    | Xylanase-Assay .....   | 27        |
| 2.6      | Folin-Ciocalteu-Assay .....  | 28        |
| 2.7      | Ergosterolbestimmung .....   | 28        |
| 2.8      | Ligninbestimmung .....   | 30        |
| 2.9      | Messung der Biogasausbeute .....   | 30        |
| 2.10     | Übersicht der methodischen Vorgehensweise in dieser Arbeit von der Kultivierung bis zur Biogasmessung .....  | 33        |
| <b>3</b> | <b>Experimenteller Teil, Ergebnisse und Diskussion .....</b>   | <b>36</b> |
| 3.1      | Verwendete Gärreste .....  | 36        |
| 3.2      | Vorarbeiten zur Auswahl geeigneter Basidiomyceten für das Screening .....  | 37        |
| 3.2.1    | Emerse Kultivierungen zur Vorauswahl von Basidiomyceten für das Screening .....  | 37        |
| 3.2.2    | Submerse Kultivierungen zur Vorauswahl von Basidiomyceten für das Screening ..   | 42        |
| 3.3      | Screening nach geeigneten Basidiomyceten für einen effizienten Ligninabbau in Weizenstrohgärrest in emerser und submerser Kulturführung .....      | 48        |
| 3.3.1    | Ergebnisse .....   | 50        |
| 3.3.2    | Diskussion .....   | 59        |
| 3.3.3    | Bewertung der Ergebnisse .....   | 68        |
| 3.4      | Ermittlung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses und Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Ergosterolgehalt und Biogasausbeute ..... | 69        |
| 3.4.1    | Ergebnisse .....   | 72        |
| 3.4.2    | Diskussion .....   | 75        |
| 3.4.3    | Bewertung der Ergebnisse .....   | 79        |
| 3.5      | Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes .....  | 80        |
| 3.5.1    | Ergebnisse .....   | 82        |
| 3.5.2    | Diskussion .....   | 85        |
| 3.5.3    | Bewertung der Ergebnisse .....   | 88        |
| 3.6      | Variation des pH-Wertes .....  | 89        |
| 3.6.1    | Ergebnisse .....   | 91        |
| 3.6.2    | Diskussion .....   | 94        |
| 3.7      | Kurzzusammenfassung bisheriger Erkenntnisse .....  | 97        |
| 3.8      | Submerse Kultivierung von <i>Coprinopsis cinerea</i> (Wollstieliger Tintling) .....  | 98        |
| 3.8.1    | Ergebnisse .....   | 100       |
| 3.8.2    | Diskussion .....   | 103       |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.8.3    | Bewertung der Ergebnisse.....   | 107        |
| 3.9      | Submerse Kultivierung von <i>Coprinopsis cinerea</i> in unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen unter Nährstoffzugabe..... | 108        |
| 3.9.1    | Ergebnisse .....  | 110        |
| 3.9.2    | Diskussion .....  | 113        |
| 3.9.3    | Bewertung der Ergebnisse.....   | 116        |
| 3.10     | Untersuchung der Biogasausbeute in Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung des Gärrestes.....                                    | 117        |
| 3.10.1   | Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.....   | 118        |
| 3.11     | Wachstumsfähigkeit zweier Basidiomyceten auf unterschiedlich thermisch vorbehandelten Gärresten.....                                    | 119        |
| 3.11.1   | Ergebnisse .....  | 121        |
| 3.11.2   | Diskussion .....  | 121        |
| 3.11.3   | Bewertung der Ergebnisse und Ausblick .....   | 122        |
| 3.12     | Emerse Kultivierung ausgewählter Basidiomyceten in luftbegasten Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest.....                           | 123        |
| 3.12.1   | Ergebnisse .....  | 126        |
| 3.12.2   | Diskussion .....  | 128        |
| 3.12.3   | Bewertung der Ergebnisse.....   | 132        |
| 3.13     | Untersuchung des zeitlichen Wachstumsverhaltens dreier Basidiomyceten auf drei verschiedenen Gärresten.....                             | 132        |
| 3.13.1   | Ergebnisse .....  | 135        |
| 3.13.2   | Diskussion und Ausblick.....  | 136        |
| 3.14     | Kultivierung dreier ausgewählter Basidiomyceten auf Grünschnittgärrest und Reisstrohgärrest .....                                       | 137        |
| 3.14.1   | Ergebnisse .....  | 139        |
| 3.14.2   | Diskussion .....  | 143        |
| 3.14.3   | Bewertung der Ergebnisse.....   | 146        |
| <b>4</b> | <b>Fazit und Bewertung.....</b>   | <b>148</b> |
| <b>5</b> | <b>Ausblick.....</b>  | <b>161</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang .....</b>   | <b>164</b> |
| 6.1      | Thermodynamische Daten.....   | 164        |
| 6.2      | Inokulummassen der submersen Kultivierung in 3.3.1 .....  | 164        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 6.3      | Laccase- und Peroxidaseaktivitäten zu 3.2.2.1..... | 165        |
| 6.4      | Biogasausbeuten zu 3.6.1 .....                     | 168        |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                   | <b>169</b> |
| <b>8</b> | <b>Lebenslauf.....</b>                             | <b>186</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| $\Delta_R G^0$ | Freie Standardreaktionsenthalpie  |
| $\Delta_F H^0$ | Standardbildungsenthalpie   |
| $\Delta_R H^0$ | Standardreaktionsenthalpie  |
| $\Delta S^0$   | Standardentropie  |
| $\Delta_R S^0$ | Standardreaktionsentropie   |
| ABTS           | 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)  |
| Ar-            | Arylrest  |
| BGA            | Biogasausbeute  |
| d              | Tag(e)  |
| DNSA           | 3,5-Dinitrosalicylsäure   |
| eq             | Äquivalente   |
| GAE            | Gallussäureäquivalente  |
| GSG            | Grünschnittgärrest  |
| GVO            | Gentechnisch veränderter Mikroorganismus  |
| ITS            | <i>Internal transcribed spacer</i>  |
| LiP(s)         | Ligninperoxidase(n)   |
| $m$            | Masse   |
| $M$            | Molare Masse  |
| MnP(s)         | Manganperoxidase(n)   |
| $n$            | Stoffmenge  |
| NmL/(goTS)     | Norm-Milliliter Biogas pro Gramm oTS  |
| NL/(kgoTS)     | Norm-Liter Biogas pro Kilogramm oTS   |
| $\nu$          | Stöchiometrischer Koeffizient   |
| $\omega$       | Massenanteil  |
| oTS            | organische Trockensubstanz  |
| $p$            | Druck   |
| ppm            | <i>parts per million</i>  |
| rpm            | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)  |
| $R$            | Universelle Gaskonstante $0,08314 \text{ L}\cdot\text{bar}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
| RCF            | <i>Relative centrifuge force</i>  |
| RSG            | Reisstrohgärrest  |
| RT             | Raumtemperatur  |

---

|          |  |
|----------|--|
| SNL      | Standardnährlösung                           |
| spp.     | <i>Species</i> (Arten)                       |
| <i>T</i> | Temperatur                                   |
| TS       | Trockensubstanz (synonym zu „Trockenmasse“)  |
| U        | Unit ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) |
| <i>V</i> | Volumen                                      |
| var.     | Variante                                     |

Alle in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten wurden mit dem ersten Buchstaben der Gattung und den ersten beiden Buchstaben der Spezies sowie der internen Stammnummer abgekürzt. So wurde beispielsweise *Pleurotus ostreatus* mit der Stammnummer 65 als „POS65“ abgekürzt oder *Coprinopsis cinerea* 324 als „CCI324“. Die Liste der in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten findet sich in Tabelle 7.

## Zusammenfassung

Zur Gewinnung von Biogas wird Biomasse in Biogasanlagen vergoren. So resultiert z.B. aus der Fermentation von Getreidestroh in der Biogasanlage der s.g. „Strohgärrest“, der als fester Rückstand übrig bleibt. Da Strohgärreste hohe Gehalte an Lignin aufweisen, einem schwer abbaubaren Biopolymer, würde eine weitere anaerobe Fermentation trotz des vorhandenen Gärpotentials zu keiner wirtschaftlich nennenswerten Biogausausbeute-Steigerung führen.

Ziel der Arbeit war es, den Ligninabbau mit Hilfe von ausgewählten Weißfäulepilzen in pflanzlichen Gärresten (mit einer Inkubationsdauer von höchstens 4 Wochen) zu maximieren und somit den Gärrest zur Weitervergärung aufzuschließen, um gesteigerte Biogausausbeuten zu erzielen.

Da Biogas lediglich aus leicht fermentierbaren C-Quellen der pflanzlichen Substrate gebildet werden kann (Cellulose und Hemicellulose), galt es, geeignete Weißfäulepilze zu identifizieren, die Lignin möglichst selektiv und effizient abbauen, ohne selbst die Kohlenhydrate als Nahrungsquellen zu nutzen. Je mehr Lignin und je weniger Kohlenhydrate durch den Basidiomyceten während der Kultivierung in den Gärrestkulturen abgebaut werden, desto höher ist die erwartete Biogausausbeute.

Der Vorteil dieser biologischen Nachbehandlung mit Pilzen im Vergleich zum physikalischen oder chemischen Aufschluss von Lignin ist der schonende und selektive Abbau aufgrund der Enzymspezifität. Dieser erlaubt es, extreme Temperaturen, extreme pH-Werte und energieintensive Zerkleinerungsverfahren zum Zweck des Ligninabbaus zu vermeiden.

Es wurden in dieser Arbeit zunächst ausgewählte Weißfäulepilze auf Weizenstrohgärrest sowohl submers als auch emers kultiviert, um die vielversprechendsten Stämme zu identifizieren. In submerser Kulturführung wurden dabei diverse Parameter variiert (pH-Wert, Kultivierungsdauer, Massenverhältnisse von Gärrest und Pilz-Inokulum etc.), um maximale Ligninabbauleistungen und folglich maximale Biogausausbeuten in möglichst kurzer Zeit zu erzielen. In emerser Kultivierung wurde eine gezielte Belüftung der mit Pilzen beimpften Gärreste durchgeführt, um den Ligninabbau zu beschleunigen. Neben Weizenstrohgärrest kamen hierbei in einem zusätzlichen Experiment als alternative Substrate Reisstroh- und Grünschnittgärrest zum Einsatz.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Nachbehandlung der verwendeten Gärreste mit Weißfäulepilzen nicht zu erhöhten Biogausausbeuten geführt hat. Der wissenschaftliche Neuheitswert dieser Arbeit liegt in der erstmaligen umfassenden Nachbehandlung pflanzlicher Gärreste mit Hilfe von Weißfäulepilzen unter Variation verschiedener Kultivierungsbedingungen zum Zweck der Ligninabbau-Maximierung und somit auch der Biogausausbeute-Maximierung.

**Schlagwörter:** Biogasanlagen, Gärrest, Lignocelluloseabbau, Basidiomyceten, Weißfäulepilze, Ligninolytische Enzyme, Steigerung der Biogausausbeute

---

## Abstract

For the production of biogas, anaerobic fermentation of biomass is used in biogas plants. For example, the fermentation of crop straw in biogas plants results in the so-called “straw digestate” which remains as solid residue. Due to its high content of lignin, a hard degradable biopolymer, a further fermentation of this substrate wouldn't result in an economically significant increase of biogas yield despite the still available fermentation potential.

The aim of this work was to maximize the lignin degradation of plant substrates (primarily of wheat straw digestate) by means of selected white-rot fungi so that a further fermentation of these substrates in biogas plants results in increased biogas yields.

As biogas is only formed from easily biodegradable carbon sources (cellulose and hemicellulose) of plant substrates, it was a main objective to identify white-rot fungi which are able to degrade lignin as selectively and efficiently as possible without using the carbohydrates as nutrient sources. The more lignin and the less carbohydrates are degraded by basidiomycetes during cultivation in the digestate cultures the higher is the expected biogas yield.

The advantage of this biological post-treatment with fungi contrary to physical and chemical treatment methods of lignin degradation is the gentle and selective degradation of lignin due to the enzymatic specificity. In order to degrade lignin such a process makes it possible to avoid extreme temperatures, extreme pH values and energy-intensive mechanical grinding processes.

In this work selected white-rot fungi were cultivated in presence of wheat straw digestate both in submerged and emerged cultivations to identify the most promising strains. In submerged cultivations several parameters were varied (pH value, cultivation duration, mass ratio of digestate and fungal inoculum etc.) in order to achieve maximal lignin degradation and thus maximal biogas yields as fast as possible. In emerged cultivations deliberate aerations of the inoculated digestates were performed to accelerate the lignin degradation. Besides wheat straw digestate, in an additional experiment rice straw digestate and green waste digestate were used as alternative substrates.

To sum up the results, the post-treatment of the tested digestates with white-rot fungi didn't result in increased biogas yields. The scientific novelty value of this work is the first-time thoroughly performed post-treatment of plant digestates with white-rot basidiomycetes under variation of different cultivation conditions for the purpose of a maximization of the lignin degradation and hence of the biogas yield maximization.

**Keywords:** biogas plants, digestate, lignocellulose degradation, basidiomycetes, white-rot fungi, ligninolytic enzymes, increase of biogas yield

# 1 Einleitung

Angesichts der Endlichkeit fossiler Energieträger ist die energetische Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen im Hinblick auf Nachhaltigkeit von großer Bedeutung. Heutzutage wird die Konversion von Biomasse zu Biogas in Biogasanlagen in großem Maßstab praktiziert und nach Aufbereitung das Methan ins Erdgasnetz eingespeist.

Häufig ist das vollständige Ausschöpfen der Biogasausbeute eines Substrats jedoch nicht möglich. Insbesondere die Vergärung von pflanzlichem Material zeigt, dass mit steigendem Verholungsgrad (wie z.B. in Strohsubstraten) die Biogasausbeute umso geringer ausfällt. Die Ursache dafür ist das Lignin (lat. *lignum* Holz), das nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer ist. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist Lignin persistent und daher enzymatisch schwer abbaubar. Zusammen mit den Kohlenhydraten Cellulose und Hemicellulose, die Bestandteile von verholzten Pflanzenzellen sind, bildet es einen als „Lignocellulose“ bezeichneten dreidimensionalen Verbund. Die anaerobe Vergärung von Stroh in Biogasanlagen führt lediglich zum Abbau der zugänglichen Cellulose und Hemicellulose, während der restliche Anteil dieser Kohlenhydrate von Lignin weitestgehend umschlossen bleibt. Diese erschwerte Zugänglichkeit zu den verbliebenen Kohlenhydraten limitiert die vollständige Konversion von Stroh zu Biogas. Bestünde eine Möglichkeit, in solchen Substraten selektiv Lignin abzubauen, könnte der Biogasertrag maximiert werden.

Eine vielversprechende Methode für den selektiven Ligninabbau ist der Einsatz von Basidiomyceten (Ständerpilzen). Zu den Basidiomyceten gehören z.B. Speisepilze wie der Zucht-Champignon, Shiitake und verschiedene Seitlinge. Basidiomyceten sind die einzigen Mikroorganismen, die über ein effektives Enzymspektrum (Laccasen, Peroxidasen) verfügen, um Lignin abzubauen, was ihnen in der Natur ein Alleinstellungsmerkmal verleiht. Verglichen zu physikalischen Verfahren (Mahlen, Extrusion, Mikrowellenbehandlung, hohe Temperaturen etc.) oder chemischen Verfahren (Behandlung mit Säuren oder Laugen), die sehr kosten- und energieintensiv sind, stellt der Einsatz von Basidiomyceten ein wesentlich schonenderes und kostengünstigeres Verfahren dar.

In dieser Arbeit wurden Strohgärreste (überwiegend Weizenstrohgärrest) mit Weißfäulepilzen nachbehandelt, um den Ligninabbau und folglich die Biogasausbeute zu maximieren.

## 1.1 Biogas

### 1.1.1 Biogas und seine Entstehung

Biogas ist ein durch anaerobe Vergärung gebildetes Gasmisch, das überwiegend aus  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  besteht. Die Bildung von Biogas findet in der Natur z.B. in Mooren oder im Pansen von Wiederkäuern statt (FNR, 2013) und erfolgt im mikrobiologischen Sinne durch eine Vielzahl symbiotisch lebender Mikroorganismen, zu denen hauptsächlich fakultativ anaerobe Bakterien und Archaeen zählen. Während in aeroben Prozessen durch die Oxidation von Biomasse mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor Energie gewonnen wird, werden bei der anaeroben Biogasbildung andere Moleküle als Elektronenakzeptoren verwendet.

Die Entstehung von Biogas wird formal in vier Schritte eingeteilt: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese (Manyi-Loh *et al.*, 2015). Zeitlich betrachtet laufen diese Schritte gleichzeitig ab. Schematisch sind diese vier Phasen der Biogenese in Abbildung 1 gezeigt.

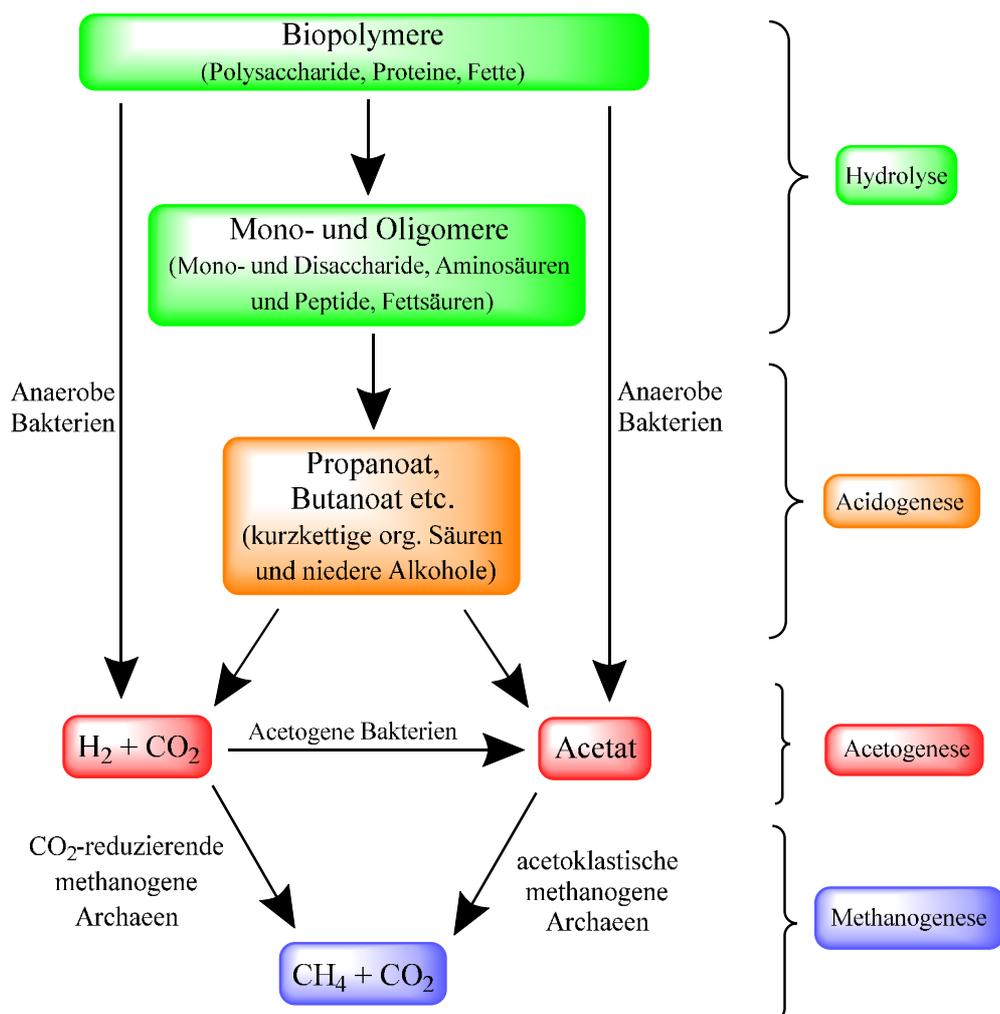


Abbildung 1: Schema der vier Phasen der Biogasbildung, übersetzt und ergänzt nach (Clifford, 2017).

Im ersten Schritt, der Hydrolyse, werden Nährstoff-Makromoleküle, zu denen Kohlenhydrate, Fette und Proteine zählen, in Monomere (Monosaccharide, Fettsäuren und Aminosäuren) und kleinere Oligomere gespalten. Enzymatisch wird diese Reaktion durch die Sekretion von Hydrolasen ermöglicht, zu denen vor allem Amylasen, Lipasen und Peptidasen zählen.

Der zweite und dritte Schritt werden als Acidogenese (Versäuerungsphase) und Acetogenese (Essigsäurebildungsphase) bezeichnet. Während die Acidogenese allgemein die Bildung kurz-kettiger organischer Säuren und niederer Alkohole bezeichnet, meint die Acetogenese speziell die Bildung von Essigsäure. Somit haben beide Begriffe hinsichtlich der dazugehörigen Prozesse einen Überschneidungsbereich. Bei diesen beiden Schritten handelt es sich chemisch um Oxidations- und Reduktionsreaktionen, bei denen erstmalig ein Gewinn von Energie verzeichnet wird. Als Elektronenakzeptoren dienen in diesem anaeroben Milieu z.B.  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{HCO}_3^-$ , die zu  $\text{H}_2$  und  $\text{CH}_4$  reduziert werden (Ferry, 2011). Einige thermodynamische Daten exemplarischer Reaktionen der Biogasentstehung sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Thermodynamische Daten beispielhafter Reaktionen, die an der Bildung von Biogas beteiligt sind. Die hier gezeigten Kenngrößen wurden mit Hilfe der Daten aus Tabelle 16 (Anhang) über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung für  $T = 293,15 \text{ K}$  berechnet.

| Schritt            | Reaktion   | $\Delta_R H^0 /$<br>$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $\Delta_R S^0 /$<br>$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ | $\Delta_R G^0 /$<br>$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
|--------------------|--|---|--|---|
| Acidogenese        | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$                               | -73,9   | 175,2  | -125,3  |
| Acido-/Acetogenese | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 3 \text{CH}_3\text{COOH}$   | -177,2  | 372,1  | -286,3  |
| Acidogenese        | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{CO}_2$                          | -2248,9   | 538,3  | -2406,7   |
| Acido-/Acetogenese | $2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$                                   | -180,1  | -378,9   | -69,0   |
| Acido-/Acetogenese | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2$ | 117,4   | 230,9  | 49,8  |
| Methanogenese      | $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$   | 15,1  | 206,3  | -45,4   |
| Methanogenese      | $\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$  | -165,0  | -172,6   | -114,4  |

Aus diesen Daten geht hervor, dass bestimmte Reaktionen der Acido- und Acetogenese Energie liefern, während andere unter Verbrauch von Energie ablaufen. Tendenziell sind Reaktionen begünstigt, bei denen  $\text{CO}_2$  gebildet oder  $\text{H}_2$  verbraucht wird.

Die Methanogenese ist im Zuge der Bildung von Biogas der letzte von vier Schritten. Zu der unmittelbaren Bildung von  $\text{CH}_4$  sind ausschließlich Archaeen in der Lage (Paul *et al.*, 2012). Sie zählen neben den Bakterien und Eukaryoten zu einer der drei Domänen, in die alle Lebewesen eingeteilt werden. Auf mechanistischer Ebene ist die Methanogenese noch nicht vollständig geklärt, was damit zusammenhängt, dass im Rahmen der postulierten Mechanismen die Intermediate des Katalysezyklus bisher nicht isoliert werden konnten (Wongnate *et al.*, 2016).

Die durchschnittliche Zusammensetzung von Rohbiogas ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Durchschnittliche Zusammensetzung von Rohbiogas (FNR, 2013).

| Bestandteil      | Konzentration |
|------------------|---------------|
| CH <sub>4</sub>  | 50-75 Vol.-%  |
| CO <sub>2</sub>  | 25-45 Vol.-%  |
| H <sub>2</sub> O | 2-7 Vol.-%    |
| N <sub>2</sub>   | < 2 Vol.-%    |
| NH <sub>3</sub>  | < 1 Vol.-%    |
| H <sub>2</sub>   | < 1 Vol.-%    |
| H <sub>2</sub> S | 20-20.000 ppm |

Die Bildung von NH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>S ist darauf zurückzuführen, dass Aminosäuren, die aus der hydrolytischen Spaltung von Proteinen entstehen, als Elektronenakzeptoren genutzt werden.

### 1.1.2 Biogasanlagen

Biogasanlagen dienen in erster Linie der Produktion von Biogas aus Pflanzenresten und Tiergülle. Der Trend zu dieser Art der Energiegewinnung aus Biomasse hat in Deutschland seit 1992 stark zugenommen, was sich aus Abbildung 2 anhand der gestiegenen Anzahl der Biogasanlagen entnehmen lässt.

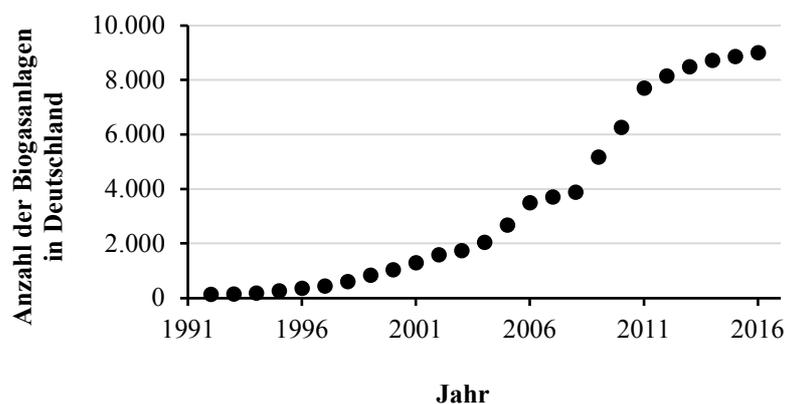


Abbildung 2: Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland von 1992-2017 (Statista – Das Statistik-Portal, 2018).

Als Spektrum der eingesetzten Substrate zur Biogaserzeugung werden hauptsächlich Pflanzenreste, tierische Exkremete, kommunaler Bioabfall und Reststoffe aus Industrie und Landwirtschaft verwendet. Die ungefähre Verteilung der eingesetzten Substrate ist in Abbildung 3 gezeigt. Erst nachdem diese pflanzlichen und tierischen Reste die Biogasanlage durchlaufen haben, werden die entstehenden vergorenen Reste auf Felder und Ackerflächen zwecks Düngung gebracht.

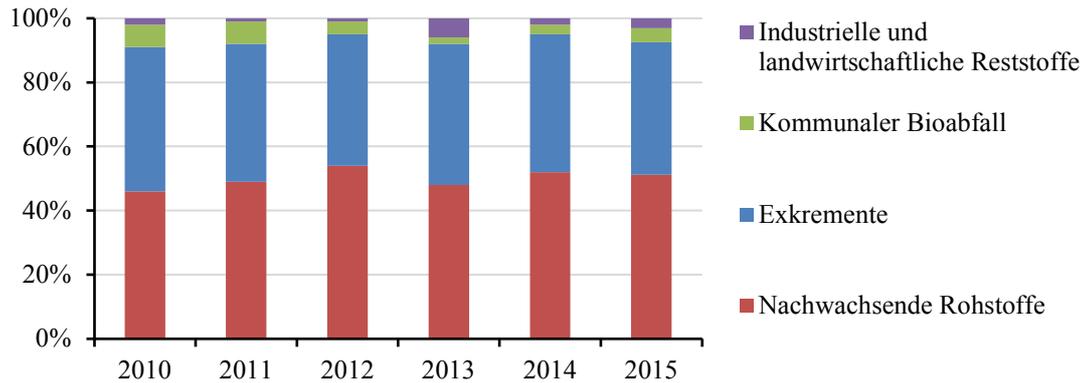


Abbildung 3: Substratanteile in Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 2010 bis 2015 (Statista – Das Statistik-Portal, 2018).

Da in dieser Arbeit hauptsächlich Weizenstrohgärrest von einer Versuchsanlage zur Strohvergärung bezogen wurde, wird im Folgenden kurz auf die dazugehörige technische Vorgehensweise eingegangen.

Dabei wird zur Herstellung von Kraftstoffen die gesamte Weizenpflanze genutzt. Nach dem Zermahlen des Pflanzenkorns wird eine s.g. Kaltmischung durchgeführt. Dazu werden diesem entstehenden Mehl Wasser und Enzyme zugegeben, sodass die Stärke in Zuckereinheiten gespalten wird. Anschließend wird Hefe zugegeben und durch anaerobe Fermentation Ethanol gebildet. Nach dem Abdestillieren und Absolutieren des Alkohols ist dieses als „Bioethanol“ bezeichnete Produkt verkaufsfähig. Der Destillationsrückstand wird als „Schlempe“ bezeichnet und stellt ein Abfallprodukt der Bioethanolproduktion dar. Zusammen mit kleingehäckseltem Stroh wird die Schlempe in die Biogasanlage überführt und mit einer mittleren Verweilzeit von 30 Tagen anaerob vergoren. Das entstehende Produkt ist dabei der Weizenstrohgärrest.

Dieser Weizenstrohgärrest wurde in den meisten Experimenten dieser Arbeit als Substrat für die Weißfäulepilze eingesetzt.

### 1.1.3 Biogasaufbereitung

Unmittelbar nach der Entstehung von Biogas weist es noch keine verkaufsfähige Reinheit auf. Im Verlauf des Aufbereitungsverfahrens werden aus diesem Gasgemisch  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und Wasser entfernt.

Die Entfernung von Gasen, die in wässriger Lösung Protonen bilden ( $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{S}$ ), kann z.B. mittels Aminwäsche durchgeführt werden, wobei das Rohbiogas durch eine Flüssigkeit, die organische Aminoalkohole enthält, geleitet wird. Dabei entstehen die entsprechenden Ammoniumsalze mit Carbonat und Sulfid als Gegenion, die anschließend als Dünger eingesetzt werden können.

Wasser kann aufgrund seines hohen Siedepunkts durch Auskondensieren entfernt werden, wobei  $\text{NH}_3$  wegen seiner guten Wasserlöslichkeit mitentfernt wird.

Die Entfernung von Sauerstoff kann beispielsweise durch Chemisorption am Kupferkontakt erfolgen, wobei Kupferoxid entsteht (Urban *et al.*, 2008).

Da Methan keinen Eigengeruch besitzt, werden diesem zur schnelleren Entdeckung von eventuellen Gaslecks Geruchsstoffe zugesetzt (Odorierung), die bereits in geringster Konzentration wahrnehmbar sind. Schließlich wird das Methan verdichtet, sodass dessen Druck gegenüber dem Gasdruck des Erdgasnetzes, in das es eingespeist werden soll, leicht erhöht ist.

#### 1.1.4 Messung der Biogausausbeute

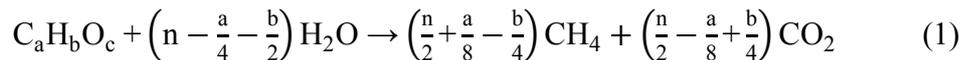
Die Messung der Biogausausbeute bedarf einer Normierung. Dies ist notwendig, weil das Gasvolumen unter anderem temperatur- und druckabhängig ist. Im einfachsten Fall lässt sich dieser Zusammenhang durch das ideale Gasgesetz beschreiben. Als Normierungsparameter werden hierbei standardmäßig eine Temperatur von  $0\text{ }^\circ\text{C}$  ( $273,15\text{ K}$ ) und ein Druck von  $1,013\text{ bar}$  verwendet (FNR, 2013).

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Biogas lediglich aus dem organischen Anteil des Substrats entstehen kann. Daher wird von einem Aliquot jeder Probe in einem parallelen Experiment nach der Trocknung (z.B. bei  $105\text{ }^\circ\text{C}$  Trocknung bis zur Gewichtskonstanz) die organische Trockensubstanz (oTS) durch Veraschung bestimmt (z.B. durch Erhitzen auf ca.  $600\text{ }^\circ\text{C}$ ). Dabei wird der organische Anteil zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert, während die anorganischen Bestandteile in Form von Oxiden zurückbleiben.

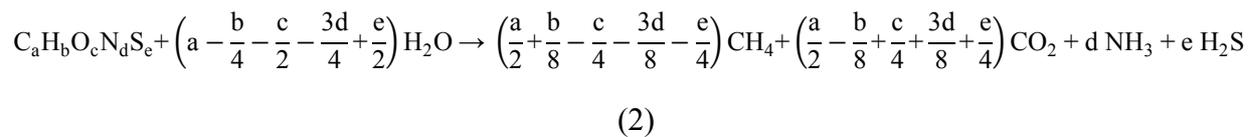
Unter Berücksichtigung der genannten Kenngrößen wird der Biogasertrag in der normierten Einheit „Norm-Milliliter pro Gramm organische Trockensubstanz“, abgekürzt als „NmL/(goTS)“, angegeben. Alle in dieser Arbeit genannten Biogausausbeuten haben diese Einheit.

### 1.1.5 Vorhersage der Biogasausbeute am Beispiel von Weizenstroh

Bei exakt bekannter Zusammensetzung des organischen Ausgangssubstrats kann dessen theoretische Biogasausbeute vorhergesagt werden. Zu diesem Zweck wurde in den 1950er Jahren von Buswell und Mueller eine empirische stöchiometrische Reaktion für die Biogasbildung aus organischer Materie entwickelt (Buswell & Mueller, 1952):



Werden Proteine im Ausgangssubstrat berücksichtigt, muss die Gleichung um die Elemente Stickstoff und Schwefel erweitert werden. Dies wurde von W. C. Boyle in Form einer erweiterten stöchiometrischen Gleichung berücksichtigt (Boyle, 1977):



Der Vergleich der beiden Gleichungen macht deutlich, dass im Falle der erweiterten Gleichung sich die Methanausbeute verringert, da ein Teil der H-Atome zur Bildung von  $NH_3$  und  $H_2S$  verbraucht wird.

Anhand eines Beispiels soll im Folgenden die Biogasausbeute von Weizenstroh vorhergesagt werden. Dazu werden Informationen über die mittlere Zusammensetzung des Substrats benötigt, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Tabelle 3: Durchschnittliche Zusammensetzung von Weizenstroh nach (Ghaffar & Fan, 2013; Khan & Mubeen, 2012).

| <b>Bestandteil</b> | <b>Massenanteil / %</b> | <b>Massenanteil TS / %</b> | <b>Massenanteil oTS / %</b> |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Cellulose          | 37,0                    | 40,7                       | 48,8                        |
| Hemicellulose      | 22,9                    | 25,2                       | 30,2                        |
| Lignin             | 20,1                    | 22,1                       | 26,5                        |
| Asche              | 10,9                    | 12,0                       | –                           |
| Wasser             | 9,1                     | –                          | –                           |

Zur Vorhersage der Biogasausbeute aus Stroh ist lediglich der organische Anteil (Cellulose, Hemicellulose und Lignin) relevant. Während für Cellulose und Hemicellulose die molekularen Wiederholeinheiten ( $C_6H_{10}O_5$  bzw.  $C_5H_8O_4$ ) als Berechnungsgrundlage verwendet werden können, muss die entsprechende Molekülformel, die die durchschnittliche Zusammensetzung von Lignin wiedergibt, überhaupt erst berechnet werden. Dazu werden Daten herangezogen, die aus Elementaranalysen von Lignin (Tabelle 4) berechnet wurden.

Tabelle 4: Elementarzusammensetzung verschiedener Lignin-Typen, modifiziert nach (Wörmeyer *et al.*, 2011). Der in dieser Literaturquelle angegebene Stickstoffgehalt ( $< 2,2\%$ ) der Lignin-Typen wurde in der hier gezeigten Tabelle in der Weise vernachlässigt, dass die Summe der Massenanteile der Elemente C, H und O  $100\%$  ergibt.

| Lignin-Typ               | Kohlenstoff (% (w/w)) | Wasserstoff (% (w/w)) | Sauerstoff (% (w/w)) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Alcell organosolv lignin | 64,14                 | 5,95                  | 29,92                |
| AL lignin                | 60,53                 | 5,86                  | 33,63                |
| AS lignin                | 60,45                 | 6,71                  | 32,85                |
| DAS lignin               | 68,48                 | 7,62                  | 23,89                |
| LHW 260 lignin           | 66,04                 | 5,44                  | 28,53                |
| $\emptyset$              | 63,93                 | 6,32                  | 29,76                |

Demnach besteht Lignin durchschnittlich aus den hier genannten Gewichtsprozentanteilen von  $63,93\%$  Kohlenstoff,  $6,32\%$  Wasserstoff und  $29,76\%$  Sauerstoff. Dividiert durch die Atommassen des jeweiligen Elements ergeben sich die stöchiometrischen Koeffizienten für die durchschnittliche Zusammensetzung des Lignins zu:

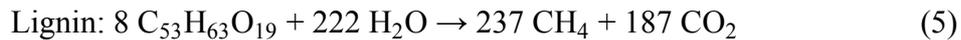
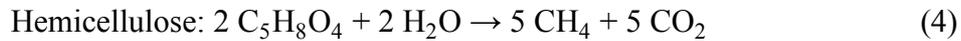
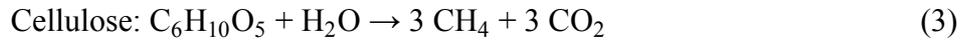
$$C: 63,93/12,011 = 5,3$$

$$H: 6,32/1,001 = 6,3$$

$$O: 29,76/15,999 = 1,9$$

Damit resultiert für Lignin eine mittlere Summenformel von  $C_{53}H_{63}O_{19}$  mit einer Molmasse von  $1003,63$  g/mol. Zur Berechnung der erwarteten Biogasausbeuten wurden für Cellulose die Wiederholeinheit  $M(C_6H_{10}O_5)$  mit  $162,07$  g/mol und für Hemicellulose die Wiederholeinheit  $M(C_5H_8O_4)$  mit  $132,06$  g/mol angenommen. Gemäß Tabelle 3 besteht 1 kg Weizenstroh aus  $370$  g Cellulose,  $229$  g Hemicellulose und  $201$  g Lignin. Dies entspricht Stoffmengen von  $2,28$  mol Cellulose,  $1,73$  mol Hemicellulose und  $0,20$  mol Lignin.

Für die formale hydrolytische Spaltung der Strohauptkomponenten ergeben sich folgende stöchiometrische Formeln.



Zur Berechnung der erwarteten Methanvolumina wurde das ideale Gasgesetz angewendet. Dabei musste zusätzlich das Verhältnis der stöchiometrischen Koeffizienten „ $v_E/v_P$ “ des Produkts (Methan) und des Edukts (Cellulose, Hemicellulose bzw. Lignin) in den folgenden Gleichungen berücksichtigt werden. Und die Tatsache, dass Stroh gemäß Tabelle 3 einen oTS-Anteil von 80 %, hat, führt dazu, dass der gesamte Term jeweils durch 0,8 dividiert werden muss.

$$\text{Cellulose: } V = \frac{\frac{v_E}{v_P} \cdot nRT}{p \cdot 0,80} = \frac{3}{1} \cdot 2,28 \text{ mol} \cdot 0,08314 \frac{\text{L} \cdot \text{bar}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \cdot 273,15 \text{ K}}{1,013 \text{ bar} \cdot 0,80} = 191,9 \text{ L} \quad (6)$$

$$\text{Hemicellulose: } V = \frac{\frac{v_E}{v_P} \cdot nRT}{p \cdot 0,80} = \frac{5}{2} \cdot 1,73 \text{ mol} \cdot 0,08314 \frac{\text{L} \cdot \text{bar}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \cdot 273,15 \text{ K}}{1,013 \text{ bar} \cdot 0,80} = 121,5 \text{ L} \quad (7)$$

$$\text{Lignin: } V = \frac{\frac{v_E}{v_P} \cdot nRT}{p \cdot 0,80} = \frac{237}{8} \cdot 0,2 \text{ mol} \cdot 0,08314 \frac{\text{L} \cdot \text{bar}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \cdot 273,15 \text{ K}}{1,013 \text{ bar} \cdot 0,80} = 166,0 \text{ L} \quad (8)$$

Somit beträgt die normierte (theoretisch maximal erhältliche) Biogausbeute von Weizenstroh (bei Umgebungsbedingungen von 0 °C und 1,013 bar) 479,4 NL/(kgoTS). Da allerdings Lignin anaerob nicht abbaubar ist, ergibt sich rechnerisch unter Vernachlässigung des Biogasanteils aus Lignin eine theoretisch maximal erhältliche Biogausbeute von 313,4 NL/(kgoTS).

Dagegen wurden bei der experimentellen Vergärung von Weizenstroh Methanvolumina zwischen 220 NL/(kgoTS) (Weißbach, 2009) und 293 NL/(kgoTS) (ARCHEA Service GmbH, 2017) erreicht.

Wird die durchschnittliche experimentell erreichte Biogasausbeute von 257 NL/(kgoTS)<sup>1</sup> zur theoretisch maximal erreichbaren Biogasausbeute aus Weizenstroh von 479,4 NL/(kgoTS) in Relation gesetzt, so bedeutet dies, dass in Strohvergärungsanlagen 54 % des Strohs zu Biogas umgewandelt werden. Im Umkehrschluss heißt das, dass ca. die Hälfte der Biomasse unvergoren bleibt. Im Falle einer vollständigen Lignindepolymerisation ließe sich theoretisch die Gesamt-Biogasausbeute somit fast verdoppeln.

## 1.2 Lignin

Die drei organischen Hauptbestandteile von Holz sind die drei Biopolymere Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Nach Cellulose ist Lignin das zweithäufigste natürlich vorkommende Polymer (Pérez *et al.*, 2002). In pflanzlichen Zellwänden füllt Lignin den Raum zwischen Cellulose und Hemicellulose aus (Abbildung 4). Dadurch, dass Lignin enzymatisch nur schwer abbaubar ist, stellt es eine Art Barriere dar (Leonowicz *et al.*, 2001) und bietet somit der Pflanze Schutz vor mikrobiellem Abbau der Kohlenhydrate Cellulose und Hemicellulose.

Die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Lignin und den Kohlenhydraten (Bi *et al.*, 2016) trägt somit zu einem Zusammenhalt der Lignocellulose-Matrix bei (Zakzeski *et al.*, 2010). Die schematische Verknüpfung von Lignin, Cellulose und Hemicellulose ist in Abbildung 4 gezeigt.

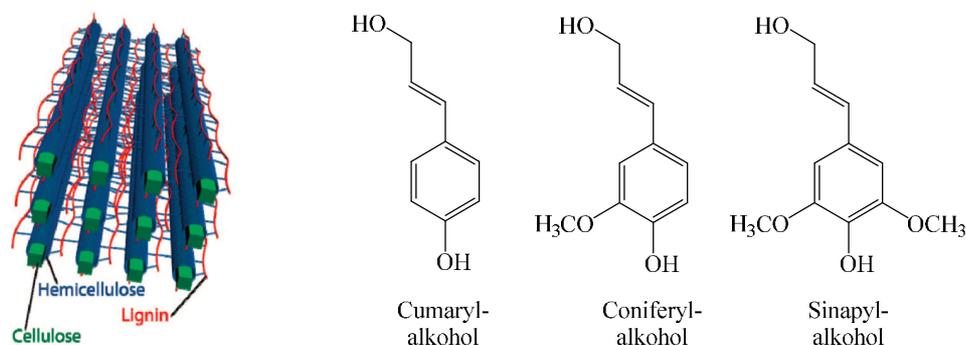


Abbildung 4: Schematische Struktur von Lignin in lignocellulosehaltigem Material (links), übernommen aus (Zakzeski *et al.*, 2010) und die Strukturen der drei Monolignole, die sich durch die Anzahl der Methoxy-Gruppen unterscheiden (rechts).

Trotz der Tatsache, dass die Grundstruktur des Lignins auf lediglich drei Phenylpropanoid-Bausteinen basiert (Abbildung 4, rechts), weist dieses Polymer einen stark verzweigten und heterogenen Aufbau auf (Abbildung 5), da sich durch eine Vielzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten heterogene Strukturen ausbilden.

<sup>1</sup> Dies entspricht dem gerundeten Mittelwert der o.g. Werte von 220 NL/(kgoTS) und 293 NL/(kgoTS).

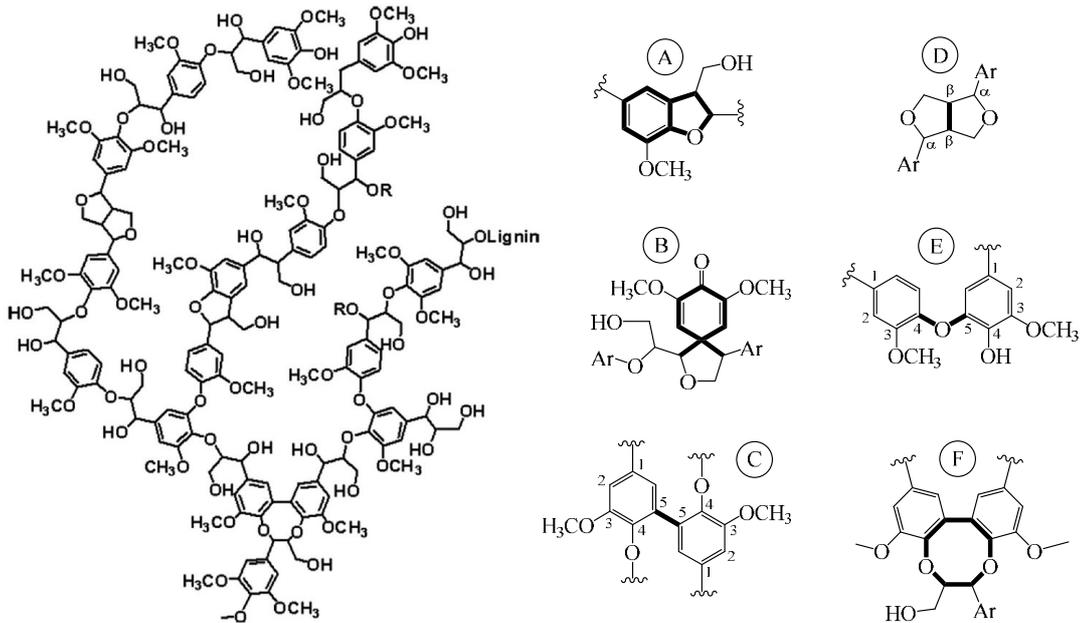


Abbildung 5: Beispielhafte Struktur von Lignin (Prieur *et al.*, 2017) (links) und ausgewählte Struktureinheiten in Lignin, abgeändert nach (Zakzeski *et al.*, 2012) (rechts). A = Cumaran, B = Spirodienon, C = 5,5-Verknüpfung, D =  $\beta,\beta$ -Verknüpfung, E = 4,O,5-Verknüpfung, F = Dibenzodioxocin. Die charakteristischen Strukturen und Verknüpfungstypen wurden fett markiert.

Die Biosynthese des Lignins erfolgt über einen radikalischen Mechanismus (Vanholme *et al.*, 2010). Dabei werden überwiegend Ether-Verbrückungen zwischen den Monolignolen sowie C-C-Verknüpfungen ausgebildet (Abbildung 5). Da diese nicht hydrolysierbar sind und Aromat-Bausteine keine sonstigen funktionellen Gruppen aufweisen, ist Lignin ein rigides und nur schwer abbaubares Polymer (Singh & Chen, 2008). Dadurch kann es einer Pflanzenzelle Schutz vor hydrolytischem Abbau der Cellulose durch Mikroorganismen bieten (Ruiz-Dueñas & Martinez, 2009). Allerdings stellt diese Schutzfunktion zugleich eine große Herausforderung dar, wenn der Ligninabbau selbst als Zielsetzung definiert wird. Ebenso wie Lignin biosynthetisch über einen radikalischen Mechanismus aufgebaut wird, kann ein enzymatischer Abbau ebenfalls nur über Ein-Elektronen-Oxidationen erfolgen (Srebotnik *et al.*, 1997).

### 1.3 Ligninolytische Enzyme aus Basidiomyceten

Basidiomyceten sind die am häufigsten untersuchten Mikroorganismen, anhand derer der Ligninabbau bisher studiert wurde (Huang *et al.*, 2013). Die ersten Ansätze zum Ligninabbau in Holz durch Weißfäulepilze wurden bereits in den 1930er Jahren durchgeführt (Leonowicz *et al.*, 2001). Mit Hilfe verschiedener ligninolytischer Enzyme und kleinerer Moleküle, die als Mediatoren fungieren, sind Weißfäulepilze in der Lage, Lignin effizient abzubauen (Dashtban *et al.*, 2010).

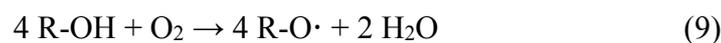
Am natürlichen Abbau von Lignin sind mehrere Enzyme beteiligt, die ausschließlich zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen gehören. Zu den wichtigsten ligninolytischen Enzymen aus Basidiomyceten zählen Laccasen, Manganperoxidasen und Ligninperoxidasen (Tripathi *et al.*, 2012). Es handelt sich hierbei vorwiegend um extrazelluläre Enzyme (Hatakka, 1994; Lang *et al.*, 1998). Insofern können Weißfäulepilze lignocellulose-reiche Habitate besiedeln (z.B. Totholz) und durch den Abbau von Lignin z.B. die leichter verwertbare Cellulose als Nährstoffquelle erschließen. Zudem ist Lignin als Molekül zu groß, als dass eine Einschleusung in die Zelle möglich wäre, sodass der Ligninabbau ausschließlich extrazellulär erfolgt.

Die wichtigsten Enzyme, die den Ligninabbau katalysieren, werden im Folgenden behandelt.

### 1.3.1 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Sie finden sich vorwiegend im Sekretom von Weißfäulepilzen, allerdings kommen Laccasen auch in bestimmten Pflanzen, Bakterien und Insekten vor (Wang *et al.*, 2015).

Für die Oxidation von Substraten verwenden sie molekularen Sauerstoff und reduzieren diesen zu Wasser (Kunamneni *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2002). Im Zuge des Abbaus von Lignin durch Basidiomyceten katalysieren Laccasen hauptsächlich die Oxidation phenolischer Substrate (Thurston, 1994). Dabei kann die laccase-katalysierte Reaktion wie folgt formuliert werden (R = phenylisch gebundener Rest):



Das Substratspektrum von Laccasen ist nicht auf phenolische Substanzen beschränkt. So kann z.B. die Oxidation bestimmter Triphenylmethan- und Azofarbstoffe durch Laccasen ebenfalls katalysiert werden (Legerská *et al.*, 2016).

Laccasen sind Multi-Kupfer-Oxidasen, die im aktiven Zentrum vier Kupfer-Ionen enthalten. Diese bilden ein trinukleares Cluster, was sie als solches durch relativ kurze Bindungslängen von 2-3 Å (Laccase aus *Trametes versicolor*) bzw. 4-5 Å (Laccase aus *Bacillus subtilis*) kennzeichnet (Morozova *et al.*, 2007; Piontek *et al.*, 2002), während das verbliebene Cu-Ion einen größeren Abstand zum trinuklearen Cluster von ca. 12-13 Å hat. Die Kupferionen durchlaufen dabei Oxidationsstufen von Cu(I) und Cu(II) (Solomon *et al.*, 2008), wobei nach dem Binden des Sauerstoffmoleküls (aus der Luft) die O–O-Bindung gespalten wird.

Wässrige Lösungen, die hinreichend hohe Laccase-Mengen enthalten, erscheinen blau, weshalb in der Literatur der Terminus „blaue Laccasen“ des Öfteren zu finden ist (Morozova *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Manganperoxidasen

Manganperoxidasen (EC 1.11.1.13), in der Literatur häufig als MnP abgekürzt, gehören wie auch Laccasen zu Enzymen, die Lignin abbauen können. Sie verwenden  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Oxidation von Mn(II)-Ionen zu reaktiveren Mn(III)-Ionen:



Wie auch Laccasen verbrauchen MnPs bei der katalysierten Reaktion Protonen, sodass die pH-Optima von MnPs aus verschiedenen Basidiomyceten ebenfalls im sauren Bereich liegen.

MnPs besitzen ein Häm als prosthetische Gruppe. Das Eisenion des Häms durchläuft dabei Oxidationsstufen von +III und +IV (Martínez, 2002). Dies ermöglicht die Bildung von Mn(III) aus Mn(II). Mn(III)-Ionen werden durch Carbonsäuren wie z.B. Oxalsäure oder Milchsäure chelatisiert (Hofrichter, 2002). Diese Mn(III)-Spezies fungieren anschließend als Redox-Mediatoren, die phenolische Strukturen des Lignins angreifen, wobei die gebildeten Radikale spontan zerfallen (Hofrichter, 2002; Peralta *et al.*, 2017). Ebenso ist es möglich, dass die entstehende radikalische Spezies ein  $\text{O}_2$ -Molekül einfängt, wobei das entsprechende Hydroperoxid-Radikal des Substrats entsteht (Hofrichter, 2002), welches anschließend ebenfalls weiter zerfällt.

In Experimenten mit Hilfe von Modellsubstanzen, die den Untereinheiten des Lignins ähneln, wurden durch eine MnP aus *Phanerochaete chrysosporium* C–C-Bindungsbrüche katalysiert (Hofrichter, 2002; Tuor *et al.*, 1992), wie in Abbildung 6 gezeigt.

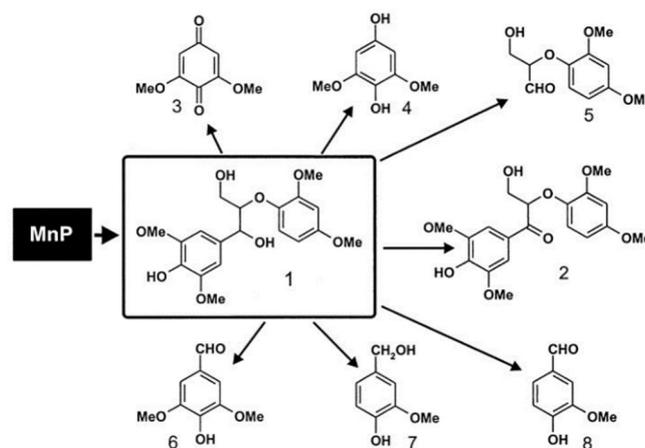


Abbildung 6: Produkte (2-8), die durch eine Behandlung der Modellsubstanz 1 mit einer gereinigten Manganperoxidase (MnP) aus *Phanerochaete chrysosporium* erhalten wurden (Hofrichter, 2002).

### 1.3.3 Ligninperoxidasen

Neben Laccasen und Manganperoxidasen (MnPs) zählen Ligninperoxidasen (LiPs) ebenfalls zu wichtigen Enzymen des ligninolytischen Systems von Weißfäulepilzen (Ben Hamman *et al.*, 1999). Wie MnPs nutzen LiPs ebenfalls  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat zur Oxidation von Ligninuntereinheiten.

In der Literatur werden LiPs von MnPs hinsichtlich ihres Ligninabbaupotentials meist dadurch unterschieden, dass MnPs die Eigenschaft zugeschrieben wird, phenolische Strukturen des Lignins zu oxidieren, während LiPs nicht-phenolische Ligninstrukturen oxidieren (Abdel-Hamid *et al.*, 2013; Falade *et al.*, 2017). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass LiPs ebenfalls zum Abbau phenolischer Strukturen in der Lage sind (Baciocchi *et al.*, 2001).

Die katalytische Reaktion zum Ligninabbau, mit der LiPs aus Weißfäulepilzen in der Literatur typischerweise in Verbindung gebracht werden (Falade *et al.*, 2017; Peralta *et al.*, 2017), ist die in Abbildung 7 gezeigte Spaltungsreaktion eines Dimers einer modellhaften Ligninuntereinheit.

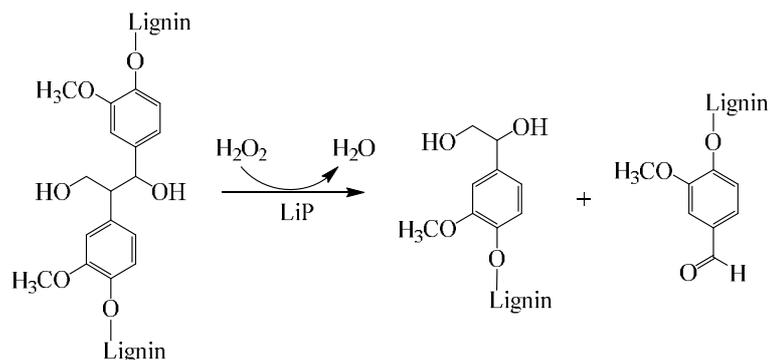


Abbildung 7: Durch Ligninperoxidasen (LiP) katalysierte Spaltungsreaktion der hier gezeigten modellhaften aromatischen Struktur mit nicht-phenolischen Lignin-Untereinheiten, modifiziert nach (Falade *et al.*, 2017) und (Peralta *et al.*, 2017).

## 1.4 Motivation und Zielsetzung

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Maximierung der Biogasausbeute von Gärresten pflanzlichen Ursprungs unter Einsatz von Weißfäulepilzen.

Da hierbei nicht das Weizenkorn zur Biogaserzeugung verwendet werden soll, sondern der Weizenstrohgärrest (ein gemeinsames Abfallprodukt aus der Bioethanol- und Biogasproduktion), steht dieses Vorhaben nicht in Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelproduktion.

Im Gegensatz zu chemischen und physikalischen Aufschlussverfahren, die für den Aufschluss des Gärrestlignins kosten- bzw. energieintensiv wären, führt der Einsatz von Basidiomyceten zu einem selektiven und schonenderen Ligninabbau (Singh *et al.*, 2014). In der Literatur wurden bezüglich

der Selektivität des Ligninabbaus Einbußen beobachtet: So hat z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, einer der am besten untersuchten Weißfäulepilze hinsichtlich des Ligninabbaus, nicht nur Lignin, sondern auch die Kohlenhydrate des lignocellulose-basierten Substrats abgebaut (Anderson & Akin, 2008). Dies stellt insofern einen Nachteil dar, weil bei der Fermentation von lignocellulosehaltigem Material (z.B. Stroh) in Biogasanlagen das Biogas lediglich aus den leichter zugänglicheren Kohlenstoffquellen (Cellulose und Hemicellulose) gebildet werden kann.

Diese Herausforderungen galt es in dieser Arbeit zu überwinden und Weißfäulepilze zu identifizieren und experimentell diejenigen Kultivierungsbedingungen zu finden, bei denen ein maximaler Ligninabbau bei minimalem Abbau von Cellulose und Hemicellulose erfolgt.

Diese Arbeit legt damit den Grundstein für die Idee, Weißfäulepilze als ligninabbauende Mikroorganismen in Gärresten (vor allem in Strohgärresten) zu nutzen, um die Wirtschaftlichkeit von Biogasanlagen zu erhöhen. Zugleich stellt diese Arbeit dadurch eine Erfolgsprüfung im kleinen Maßstab dar. Eine großtechnische Realisierung dieser Idee ist allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Im Erfolgsfall (d.h. falls durch die eingesetzten Weißfäulepilze ein wirtschaftlich attraktiver Biogausbeuteanstieg erreicht wird) kann ein *scale-up* dieses Vorhabens im großtechnischen Maßstab erarbeitet werden, das es erlaubt, den Weizenstrohgärrest aus der Biogasanlage mit Weißfäulepilzen unter aeroben Bedingungen so nachzubehandeln, dass das Lignin in einem hinreichenden Maße enzymatisch aufgeschlossen wird, um den nachbehandelten Gärrest erneut der Biogasanlage zuzuführen und somit die Biogausbeute zu erhöhen. Schematisch ist dies in Abbildung 8 dargestellt.

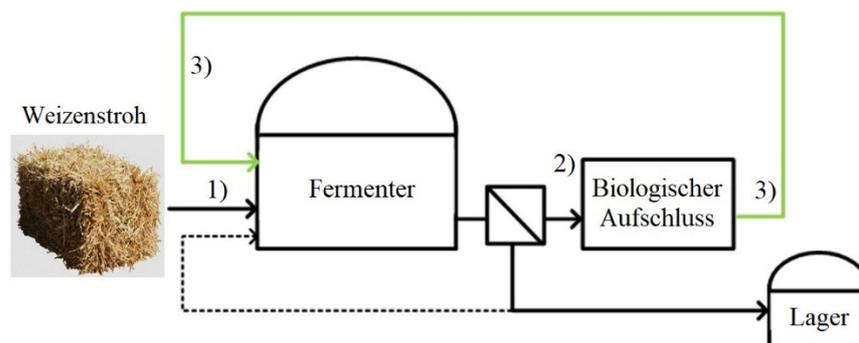


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Idee dieser Arbeit. Im Anschluss an die in Biogasanlagen bisher praktizierte einmalige Vergärung von Weizenstroh 1) soll der entstehende Weizenstrohgärrest durch Weißfäulepilze aerob aufgeschlossen werden 2) und schließlich in den anaeroben Fermenter (Biogasanlage) zurücküberführt werden 3).

Grundlegend können die Ziele und Verfahrensabläufe dieser Arbeit wie folgt gegliedert werden:

- 1) Durch erste Kultivierungsversuche wird eine Vorauswahl von Basidiomyceten getroffen, die für das Screening verwendet werden.
- 2) Screening nach geeigneten Weißfäulepilzen: Der Gärrest wird mit Weißfäulepilzen angeimpft und nach der Ernte der Kulturen wird deren Biogasausbeute vermessen. Für die nachfolgenden Kultivierungen werden die vielversprechendsten Basidiomyceten weiterverwendet.
- 3) Anhand der ausgewählten Basidiomyceten werden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet, bei denen eine maximale Biogasausbeute erreicht werden soll:
  - Das optimale Verhältnis von Gärrestmenge zur Inokulummasse. Mit demjenigen Verhältnis, das den größten Biogasausbeutezuwachs nach einer definierten Kultivierungszeit erbringt, wird in den darauffolgenden Kultivierungen weitergearbeitet.
  - Die Erntekinetik. Diejenige Kultivierungszeit, die die höchste Biogasausbeute erbringt, ist als optimale Kultivierungszeit zu erachten.
  - Variation des pH-Wertes. In diesem Arbeitsschritt werden ausgewählte Basidiomyceten bei nativem pH-Wert des Gärrestes und bei geändertem pH-Wert kultiviert. Dabei soll untersucht werden, welche der Bedingungen die höchste Biogasausbeute erbringen. Viele Basidiomyceten wachsen optimal bei leicht saurem pH-Wert, während der Gärrest einen leicht alkalischen pH-Wert (je nach Art des Gärrestes ca. pH 7,5 bis 9,0) aufweist. Am aussichtsreichsten wäre es, Pilze zu identifizieren, die bei dem nativen pH-Wert des Gärrestes wachstumsfähig sind und den pH ggf. selbst so regulieren können, dass die ligninolytischen Enzyme hohe Aktivitäten aufweisen, sodass hohe Ligninabbauleistungen erreicht werden.

Um zu beurteilen, inwieweit das Lignin im Gärrest durch die jeweiligen Weißfäulepilze abgebaut wurde, werden mehrere Analysen durchgeführt, anhand derer das Ausmaß des Erfolges beziffert wird. Die zu den Kultivierungsversuchen begleitenden analytischen Verfahren werden im Folgenden erläutert.

Zur Beurteilung des Einflusses der Basidiomyceten auf die Biogasausbeute des Gärrestes werden s.g. GB21-Versuche (Messung der Gasbildungsrate) durchgeführt. Dazu wurde jede geerntete Kultur mit Schlamm aus einer Kläranlage beimpft und anaerob vergoren (gemäß Abschnitt 2.9) und die Biogasausbeute volumetrisch abgelesen. Als entscheidende Kenngröße dient die Biogasausbeute-Differenz einer beimpften Kultur im Vergleich zur Blindprobe (nicht beimpfter Gärrest).

Je größer diese Differenz, desto größer ist die Tauglichkeit des Basidiomyceten und der dazugehörigen Kultivierungsparameter für den Ligninabbau.

Begleitend zu den Kultivierungsversuchen werden in regelmäßigen Abständen (2-3 × wöchentlich) Proben aus den Kulturen gezogen. Nach Zentrifugation werden im Kulturüberstand pH-Werte gemessen, um anhand der pH-Zeit-Profil-Kurven Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Pilze in den Kulturen zu ziehen. Die Kulturüberstände werden außerdem für Enzymaktivitätsassays herangezogen. Von Bedeutung sind hierbei Aktivitäten von Enzymen, die sowohl am Abbau von Lignin (Laccasen und Peroxidasen) als auch Kohlenhydraten (Cellulasen und Xylanasen) beteiligt sind, um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit welche Bestandteile des Gärrestes in welchem Ausmaß abgebaut werden.

Ferner wird als Teilziel dieser Arbeit nach einem chemisch messbaren Parameter gesucht, der mit der Biogasausbeute korreliert. Sollte solch ein Parameter gefunden werden, ließe sich die Biogasausbeute vorhersagen, sodass auf langwierige GB21-Messungen zukünftig verzichtet werden könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien.

| Chemikalie   | Qualität / % | Hersteller    |
|--|--------------|---------------|
| 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA)   | ≥ 98         | Sigma Aldrich |
| 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)              | 98           | Alfa Aesar    |
| Arabinoxylan aus Weizen, medium viscosity                              | ~ 95         | Megazyme      |
| Mikrokristalline Cellulose   |              | Merck         |
| Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> )                              | 99,9         | Supelco       |
| Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i> (nominelle Aktivität: 5,1 U/mg) |              | Sigma Aldrich |
| Ergosterol   | ≥ 95         | Sigma Aldrich |
| Folin-Ciocalteu-Reagenz  |              | Merck         |
| Natriumacetat  | 99           | Merck         |
| Natriumascorbat  | ≥ 99         | Carl Roth     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                       | ≥ 99 %       | Carl Roth     |
| Natriumtartrat Dihydrat  | ≥ 98         | Sigma Aldrich |
| Xylanase aus <i>Trichoderma viride</i> (nominelle Aktivität: 2,3 U/mg) |              | Fluka         |

### 2.2 Allgemeine Geräte

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte.

| Gerät               | Typ                 | Hersteller                         |
|---------------------|---------------------|------------------------------------|
| Autoklav            | Varioklav 75S       | H+P Labortechnik (Oberschleißheim) |
| Autoklav            | Syntec 5075 ELV     | Tuttner (Bebel)                    |
| Analysenwaage       | SI-23 4             | Denver Instruments (Denver)        |
| Brutschrank         | BE 500              | Memmert (Schwabach)                |
| Fotometer           | UV-1650pc           | Shimadzu (Duisburg)                |
| Magnetrührer        | MR 3001             | Heidolph (Kelheim)                 |
| pH-Meter            | Qph 70              | Merck                              |
| pH-Meter            | FiveEasy F20        | Metler Toledo (Schwerzenbach)      |
| Kolbenhubpipetten   | Transferpette®      | Brand (Wertheim)                   |
| Rotationsverdampfer | Laborota 4000       | Heidolph Instruments (Schwabach)   |
| Schüttler           | Multitron           | Infors HT (Einsbach)               |
| Sicherheitswerkbank | Clean Air CA/RE 4   | Clean Air (Hilden)                 |
| Thermoschüttler     | Thermomixer comfort | Eppendorf (Hamburg)                |
| Ultraschallbad      | RK 100 H            | Bandelin electronic (Berlin)       |
| Ultraturax          | TP-18/10            | IKA Labortechnik (Staufen)         |
| Vortex-Mixer        | RS-VA 10            | Phoenix Instruments (Garbsen)      |
| Waage               | SI-234              | Denver Instrument (Göttingen)      |
| Wasseraufbereiter   | GenPure UV-TOC/UF   | TKA (Niederelbert)                 |
| Zentrifuge          | Rotanta 460R        | Hettich (Tuttlingen)               |
| Zentrifuge          | Rotanta 380R        | Hettich (Tuttlingen)               |
| Zentrifuge          | Mikro Star 17R      | VWR                                |

## 2.3 Kultivierung

### 2.3.1 Basidiomycetenstämme

Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Basidiomycetenstämme wurden bei der „Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ, Braunschweig) bzw. dem „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ (CBS, Utrecht, Niederlande) käuflich erworben. Der einzige Stamm, der im Verlaufe dieser Arbeit selbstständig isoliert wurde, war der Basidiomycet *Coprinopsis cinerea* (Wollstieliger Tintling). Dieser wurde aus einer Weizenstrohgärrest-Kompostmiete eines hessischen Biogasanlagenbetreibers durch Verdünnungsausstriche isoliert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Basidiomycetenstämme sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Abkürzung des jeweiligen Stammes erfolgte mit drei Buchstaben, die sich aus der Bezeichnung der Gattung und der Spezies zusammensetzen und der institutsinternen Stammnummer (z.B. „POS65“ für *Pleurotus ostreatus* mit der Stammnummer 65).

Tabelle 7: Liste aller Basidiomycetenstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

| institutsinterne Stammnummer | Basidiomycet  | Abkürzung | Bezugsstelle   |
|------------------------------|---|-----------|--|
| 18                           | <i>Ganoderma applanatum</i> 250.61                  | GAP       | DSMZ   |
| 22                           | <i>Hericium erinaceus</i> 260.74                    | HER       | CBS  |
| 25                           | <i>Lentinula edodes</i> , A 20-5                    | LED       | Pilzkultursammlung, Friedrich Schiller-Universität Jena (Weimar)                             |
| 30                           | <i>Lentinula edodes</i> 530.90                      | LED       | CBS  |
| 42                           | <i>Marasmius scorodonius</i> 137.83                 | MSC       | CBS  |
| 60                           | <i>Pleurotus eryngii</i> 613.91                     | PER       | CBS  |
| 61                           | <i>Pleurotus pulmonarius</i> 5331                   | PPU       | DSMZ   |
| 64                           | <i>Pleurotus lampas</i> 323.49                      | PLA       | CBS  |
| 65                           | <i>Pleurotus ostreatus</i> 1020                     | POS       | DSMZ   |
| 66                           | <i>Phellinus pini</i> ( <i>Trametes pini</i> ) 5238 | PPI       | DSMZ   |
| 68                           | <i>Phlebia radiata</i> 5111                         | PRA       | DSMZ   |
| 69                           | <i>Pleurotus sapidus</i> 8266                       | PSA       | DSMZ   |
| 80                           | <i>Serpula lacrymans</i> 751.79                     | SLA       | CBS  |
| 84                           | <i>Trametes versicolor</i>                          | TVE       | Eigenisolat  |
| 216                          | <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>      | POS       | Molekulare Holzbiotechnologie und Technische Mykologie, Georg-August-Universität (Göttingen) |
| 224                          | <i>Pleurotus sapidus</i> 195.92                     | PSA       | CBS  |
| 232                          | <i>Flammulina velutipes</i> 1658                    | FVE       | DSMZ   |
| 236                          | <i>Hirneola-auricula judae</i> 11326                | HAJ       | DSMZ   |
| 246                          | <i>Grifola frondosa</i> 480.63                      | GFR       | CBS  |
| 247                          | <i>Bjerkandera adusta</i> 230.93                    | BAD       | CBS  |
| 249                          | <i>Fomes fomentarius</i> 4986                       | FFO       | DSMZ   |

| institutsinterne<br>Stamnummer | Basidiomycet                            | Abkürzung | Bezugsstelle  |
|--------------------------------|---|-----------|---|
| 252                            | <i>Pleurotus dryinus</i> 5178           | PDR       | DSMZ  |
| 254                            | <i>Phellinus robustus</i> 100119        | PRO       | CBS   |
| 256                            | <i>Pleurotus flabellatus</i> 8299       | PFL       | DSMZ  |
| 262                            | <i>Schizophyllum commune</i> 1024       | SCO       | DSMZ  |
| 264                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 1547 | PCH       | DSMZ  |
| 271                            | <i>Meripilus giganteus</i> 8254         | MGI       | DSMZ  |
| 275                            | <i>Irpex lacteus</i> 9595               | ILA       | DSMZ  |
| 284                            | <i>Pleurotus sajor-caju</i> 5339        | PSAJ      | DSMZ  |
| 286                            | <i>Polyporus squamosus</i>              | PSQ       | Eigenisolat   |
| 295                            | <i>Agaricus bisporus</i> 3054           | ABI       | DSMZ  |
| 301                            | <i>Pleurotus dryinus</i>                | PDR       | Eigenisolat   |
| 302                            | <i>Pleurotus ostreatus</i>              | POS       | Eigenisolat   |
| 311                            | <i>Hymenochaete rubiginosa</i> 5027     | HRU       | DSMZ  |
| 312                            | <i>Asterostroma cervicolor</i> 102559   | ACE       | CBS   |
| 316                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 6909 | PCH       | DSMZ  |
| 317                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 1556 | PCH       | DSMZ  |
| 324                            | <i>Coprinopsis cinerea</i>              | CCI       | Eigenisolat von Fruchtkörpern<br>aus einer Kompostmiete |

### 2.3.2 Stammhaltung

Alle verwendeten Basidiomycetenstämme wurden als Kryostocks in Glycerolkulturen (15 % (v/v) Glycerol) im Tiefkühlschrank bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  konserviert. Ausgehend von dieser Kultur wurden Schräg-Agarröhrchen mit SNL-Agar angeimpft, die im Kühlschrank bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Aus den SNL-Schräg-Agarröhrchen wurde mit sterilem Werkzeug ein Stück Myzel herausgeschnitten und auf SNL-Agar in Petrischalen überimpft. Nachdem etwa die Hälfte dieser Agarfläche mit Myzel bewachsen war, wurde (je nach Experiment) eine bestimmte Fläche des bewachsenen Agars herausgeschnitten und zur Animpfung der jeweiligen Kultur verwendet.

Die Agarplatte wurde 3 Monate im Kühlfach bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und ggf. zum Ansetzen einer weiteren Kultur verwendet.

### 2.3.3 Nährmedien

#### 2.3.3.1 SNL-Medium & SNL-Agar

Die Herstellung des SNL-Mediums (*standard nutrient liquid* bzw. Standardnährlösung) entspricht größtenteils der Vorschrift aus (Sprecher, 1959), jedoch unter Zusatz von Hefeextrakt und in Abwesenheit von Aneurin (Vitamin B<sub>1</sub>).

Tabelle 8: Zusammensetzung des SNL-Mediums.

| <b>Komponente</b>                | <b>Konzentration</b> |
|----------------------------------|----------------------|
| D-(+)-Glucose × H <sub>2</sub> O | 30,0 g/L             |
| L-Asparagin × H <sub>2</sub> O   | 4,5 g/L              |
| Hefeextrakt                      | 3,0 g/L              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 g/L              |
| MgSO <sub>4</sub>                | 0,5 g/L              |
| Spurenelementlösung (s. u.)      | 1,0 mL/L             |

Tabelle 9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das SNL-Medium.

| <b>Komponente</b>                      | <b>Konzentration / g·L<sup>-1</sup></b> |
|--|---|
| FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O | 0,08                                    |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0,09                                    |
| MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O   | 0,03                                    |
| CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O | 0,005                                   |
| EDTA (Dinatriumsalz)                   | 0,4                                     |

Nach der Herstellung des SNL-Mediums wurde dieses mittels NaOH auf pH 6,0 eingestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Für die Herstellung des SNL-Agars wurden dem SNL-Medium 15 g/L Agar-Agar zugegeben, anschließend der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und autoklaviert.

### 2.3.4 Ansetzen und Ernte von Vorkulturen

Gemäß 2.3.2 wurde ein Stück von 1 cm<sup>2</sup> bewachsenem SNL-Agar des entsprechenden Pilzstammes herausgeschnitten, welches anschließend im 500-mL-Erlenmeyerkolben in 250 mL SNL-Medium mittels Ultraturrax<sup>®</sup> homogenisiert wurde. Diese Kulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes 6-12 Tage im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde die Kultur aus jedem einzelnen Kolben in sterile 250-mL-, „Nalgene<sup>®</sup> Style 3141“-Zentrifugenbecher überführt und bei 9500 RCF bis zur vollständigen Pelletierung der Biomasse (ca. 15-30 min) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des SNL-Medium-Überstandes wurde das Pellet in sterilem, stillem Wasser resuspendiert und erneut eine Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Der erhaltene Überstand wurde dekantiert und das sedimentierte Pellet durch Verrühren mit sterilem Werkzeug homogenisiert.

### **2.3.5 Ansetzen submerser Hauptkulturen**

Es wurde eine definierte Menge des entsprechenden Gärrestes in 500-mL-Erlenmeyerkolben eingewogen. Durch Zugabe von Wasser wurde eine Gärrest-Suspension hergestellt. Zur Einhaltung von langfristig möglichst gleichen Bedingungen wurde dafür stilles Wasser aus einem Supermarkt verwendet. Sofern nicht anders vermerkt, wurde in jedem Kultivierungsversuch dieser Arbeit eine Endkonzentration von 8 % Gärresttrockenmasse eingestellt. Die Wahl einer Maximalkonzentration von 8 % Trockenmasse ist darauf zurückzuführen, dass dies diejenige Konzentration ist, bei der Gärrest-Suspensionen technisch noch pumpbar sind. „1 % Trockenmasse“ wurde hierbei als 1 g des getrockneten (wasserfreien) Gärrestes in 100 mL Wasser definiert. Die Gärrest-Suspensionen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Zur Animpfung von Hauptkulturen wurde das jeweilige gewaschene homogenisierte Pilzpellet aus der SNL-Vorkultur (s. Abschnitt 2.3.4) verwendet.

Die Kolben, die die Gärrest-Suspensionen enthielten, wurden unter der Sicherheitswerkbank auf eine Waage gestellt, sodass beim Animpfen die Inokulummasse gravimetrisch bestimmt werden konnte.

Arbeitsschritte, die im einzelnen Experiment von der hier allgemein beschriebenen submersen Kulturführung abwichen, wurden im Hauptteil (Abschnitt 3) im jeweiligen Experiment genannt und die genaue Kultivierungsprozedur schematisch veranschaulicht.

### **2.3.6 Ansetzen emerser Hauptkulturen**

#### Kultivierung in Erlenmeyerkolben

Es wurde eine definierte Menge des entsprechenden Gärrestes in 500-mL-Erlenmeyerkolben eingewogen. Je nach Experiment wurde der Gärrest entweder autoklaviert oder thermisch nicht vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Animpfung des Gärrestes mit dem Pellet aus der SNL-Vorkultur (gemäß Abschnitt 2.3.4) oder mittels myzelbewachsenem homogenisiertem SNL-Agar. Die Kolben wurden mit gaspermeablen Cellulosestopfen verschlossen und die Kulturen bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) inkubiert. Die Dauer der Inkubation ist im Hauptteil (Abschnitt 3) im jeweiligen Experiment genannt.

Arbeitsschritte, die im einzelnen Experiment von der hier aufgeführten emersen Kulturführung abwichen, wurden im Hauptteil (Abschnitt 3) im jeweiligen Experiment beschrieben.

### Kultivierung in luftbegasten Festbettreaktoren

Diese Art der Kultivierung wurde in dieser Arbeit absichtlich unter nichtsterilen Bedingungen durchgeführt (die Gründe dafür wurden in den Abschnitten 3.11 und 3.12 dargelegt). Es wurden definierte Mengen eines nicht-autoklavierten Gärrestes (die Einwaagen sind den entsprechenden Versuchen in Abschnitt 3 zu entnehmen) und mit einer definierten Inokulummasse beimpft. Schematisch ist dieses Kultivierungsverfahren in Abschnitt 3.12 in Abbildung 83 gezeigt. Die jeweilige Kultur wurde 21 Tage bei Raumtemperatur unter Begasung mit steriler Luft inkubiert, wobei zu Probenahmезwecken die Reaktoren in nicht-steriler Umgebung geöffnet wurden.

Erste Ansätze einer solchen Kultivierung sind wegen zu starker Belüftung, die zum Austrocknen des Gärrestes führte und folglich kein Wachstum der Basidiomyceten möglich war, gescheitert. Erst bei weniger intensiver Belüftung konnte in einem Vorversuch Myzelwachstum und die Bildung von Fruchtkörpern auf thermisch unvorbehandeltem Gärrest im Festbettreaktor beobachtet werden. Die eingestellte Luftbegasung war so gering, dass mit gängigen Durchflussmessgeräten sich kein Wert für diese Flussrate bestimmen ließ. Die Flussrate wurde in allen Kultivierungen so eingestellt, dass beim Hineinhalten des Schlauches ins Wasser eine Luftblase pro Sekunde aufstieg. Um selbst bei schwacher Belüftung ein Austrocknen der Kulturen zu vermeiden, wurden diese bei jeder Probenahme mit Leitungswasser besprüht.

#### **2.3.7 Probenahme**

Aus den Submerskulturen wurden 2-3 Mal wöchentlich mittels steriler Pipettenspitzen Proben von ca. 2 mL Kultur genommen. Durch Zentrifugation (10 min, 13 300 RCF) wurde der Kulturüberstand erhalten, welcher anschließend in ein anderes 2-mL-Gefäß durch Abpipettieren überführt wurde. Je nachdem, ob feste Rückstände sedimentierten, wurde ggf. ein weiteres Mal zentrifugiert und anschließend der klare Überstand für Enzymassays herangezogen. Die Lagerung der Proben erfolgte im Gefrierschrank bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

In den emersen Kultivierungen in luftbegasten Festbettreaktoren wurde mittels sterilem Löffel-spatel eine definierte Menge des Gärrestes (je nach Art des Gärrestes unterscheiden sich die Trockenmassen) an verschiedenen Positionen entnommen, um aus der inhomogenen Kultur eine möglichst repräsentative Probe zu erhalten. Diese wurde in einem bestimmten Volumen VE-Wasser suspendiert. Dafür wurden ca. 4 g Feuchtmasse des jeweiligen Gärrestes in so viel Wasser

gelöst, dass die erhaltene Suspension eine Gärresttrockenmasse von 6 % aufwies. Nach Zentrifugation (10 min, 13 300 RCF) wurde der Kulturüberstand erhalten, der für die Enzymassays und pH-Wert-Messungen herangezogen wurde. Die Lagerung der Proben erfolgte im Gefrierschrank bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Ausplattieren

Mit sterilen Pipettenspitzen wurden je drei Mal je  $166\text{ }\mu\text{L}$  (ca.  $500\text{ }\mu\text{L}$  Gesamtvolumen) der jeweiligen submersen Kultur entnommen und auf SNL-Agar mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Die dreimalige Entnahme kleinerer Volumina anstelle der einmaligen Entnahme von  $500\text{ }\mu\text{L}$  wurde als vorteilhaft erachtet, da bei der inhomogenen Gärrest-Suspension auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, durch die Probenahme lebende Zellen zu entnehmen.

Zur Vermeidung von zu viel Flüssigkeit auf der Agarplatte wurde ca. 15-20 min bei Raumtemperatur das Verdunsten bzw. Einziehen des Wassers in den Agar abgewartet, anschließend die Platte mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und 3-4 Tage bei  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde die Myzeldichte als Vitalitätsparameter herangezogen und die bewachsene Platte fotografiert.

## 2.5 Enzymassays

### 2.5.1 ABTS-Assay

Der ABTS-Assay wurde zur photometrischen Bestimmung der Laccaseaktivität nach (Collins *et al.*, 1998) durchgeführt. Zugleich wurde im Verlauf des Assays durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im mikromolaren Bereich die Peroxidaseaktivität mitbestimmt. Im Falle der Koexistenz von Laccasen und Peroxidasen in einer Probe wurde (bei bereits vorhandenem ABTS) direkt nach der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Zeit-Extinktions-Diagramm ein abrupter Anstieg der Steigung beobachtet.

Die zugrunde liegende Reaktionsgleichung ist die laccasekatalysierte Oxidation von ABTS zum charakteristisch grünblau gefärbten Radikalkation, welches kinetisch stabil ist und photometrisch detektiert werden kann:



Die Berechnung der Laccase- und Peroxidaseaktivität erfolgte über die Messung der Bildungskinetik des ABTS-Radikalkations, dessen molarer Extinktionskoeffizient bei  $\lambda = 420$  nm in der Literatur mit  $36\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  in Wasser angegeben ist (Kenzom *et al.*, 2014).

Es wurde im Mikrotiterplattenformat (96-well-Platte) nach folgendem Protokoll gearbeitet:

- 15  $\mu\text{L}$  Probe (ggf. im Vorfeld verdünnt) oder 15  $\mu\text{L}$  Wasser als Blindprobe
- 270  $\mu\text{L}$  ABTS/Puffer-Mischung (frisch)
- 15  $\mu\text{L}$  0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 min nach Messbeginn)

Die Steigung der Gerade ist ein Maß für die Laccaseaktivität. 1 U wurde als Laccasemenge definiert, die pro min 1  $\mu\text{mol}$  ABTS oxidiert. Bezüglich der katalytischen Aktivität von Peroxidasen wurde 1 U als Peroxidasemenge definiert (abzüglich der gemessenen Laccasemenge), die pro min 1  $\mu\text{mol}$  ABTS nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert.

### 2.5.2 Cellulase-Assay

Bei „Cellulase“ handelt es sich nicht um ein einziges Enzym, sondern mehrere Enzyme, die unterschiedliche hydrolytische Reaktionen katalysieren, die zum Abbau von Cellulose zu Glucose führen. Dies sind Exo- und Endoglucanasen und  $\beta$ -Glucosidasen (Kuhad *et al.*, 2011).

Exoglucanasen spalten per Definition aus Cellulose oder Cello-Oligosacchariden vom nichtreduzierenden Ende her ein Cellobiose-Molekül ab (Sharrock, 1988). Endoglucanasen spalten interne  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen, wobei Glucose, Cellobiose, Cellotriose (Ladisch *et al.*, 1981) oder größere Oligosaccharide entstehen (Khairudin & Mazlan, 2013).  $\beta$ -Glucosidasen spalten Cellobiose zu Glucose (Ladisch *et al.*, 1981).

Bei dem nachfolgend beschriebenen Cellulase-Assay wurde lediglich die „Cellulase-Gesamtaktivität“ gemessen, die als freigesetzte Glucosemenge aus Cellulose definiert wurde. Die Bestimmung der Cellulaseaktivität wurde in modifizierter Form, basierend auf einer Literaturvorschrift für den Mikrotiterplattenmaßstab (Xiao *et al.*, 2004), durchgeführt.

### Inkubation zur Freisetzung von Glucose aus Cellulose

Es wurden 50  $\mu\text{L}$  Kulturüberstand mit einer Spatelspitze mikrokristalliner Cellulose und 450  $\mu\text{L}$  Natriumacetat-Puffer (0,1 mol/L, pH 5,0) versetzt und 3 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und 600 rpm (Thermomixer, Eppendorf) inkubiert.

Analog wurde als Positivkontrolle eine kommerzielle „Cellulase aus *Aspergillus niger*“ verwendet. Von dieser wurden 2 mg eingewogen, 500  $\mu\text{L}$  Natriumacetatpuffer und eine Spatelspitze mikrokristalliner Cellulose zugegeben und diese unter gleichen Bedingungen inkubiert. Als Referenz zur Positivkontrolle wurde derselbe Ansatz mit Enzym, jedoch ohne Cellulose als Substrat vorbereitet.

### Derivatisierung und Quantifizierung reduzierender Zucker mittels DNSA-Reagenz

Der 500- $\mu\text{L}$ -Ansatz wurde zur Entfernung der Cellulose 10 min bei 13 000 RCF zentrifugiert und 250  $\mu\text{L}$  dieses abpipettierten Überstandes wurden mit 500  $\mu\text{L}$  DNSA-Reagenz (30 g/L K-Na-Tartrat, 16 g/L NaOH, 10 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure) versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 99  $^{\circ}\text{C}$  für 15 min (Thermomixer, Eppendorf). Es wurde in Dreifachbestimmung die Extinktion bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  in 96-well-Platten mit einem Füllvolumen von 200  $\mu\text{L}$  gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Standards von Glucose im Konzentrationsbereich von 100-1000 mg/L mit Füllvolumina von 200  $\mu\text{L}$ .

1 U wurde als Cellulasemenge definiert, die pro Minute 1  $\mu\text{mol}$  Glucose freisetzte.

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 9 gezeigt.

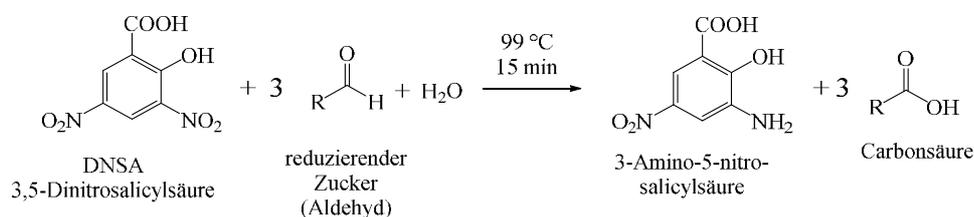


Abbildung 9: Reaktionsschema der Derivatisierung reduzierender Zucker mit dem DNSA-Reagenz. Als Produkt entsteht 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, die bei 540 nm fotometrisch bestimmt wird.

### 2.5.3 Xylanase-Assay

Der Xylanase-Assay zur Bestimmung der Freisetzung von Xylose aus Hemicellulose erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip wie der in 2.5.2 beschriebene Cellulase-Assay.

#### Inkubation zur Freisetzung von Xylose aus Hemicellulose

Es wurden 50  $\mu\text{L}$  Kulturüberstand mit 100  $\mu\text{L}$  einer Weizen-Arabinosyloxylan-Lösung (1 % (w/v)) und 350  $\mu\text{L}$  Natriumacetat-Puffer (0,1 mol/L, pH 5,0) versetzt und 3 h bei 37 °C und 600 rpm (Thermomixer, Eppendorf) inkubiert.

Zur Vorbereitung der Positivkontrolle wurde eine kommerzielle „Xylanase aus *Trichoderma viride*“ verwendet. Diese wurde zunächst gereinigt, indem 40 mg des Enzyms (nominelle spezifische Aktivität: 2,3 U/mg) in 2 mL Wasser gelöst und über Centricon<sup>®</sup>-Gefäße (Merck) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa überführt wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (13 000 RCF, 8 h), innerhalb derer 3 Mal mit je 2 mL Wasser nachgefüllt wurde.

Als Positivkontrolle wurden 50  $\mu\text{L}$  dieser gereinigten Enzymlösung verwendet, die gemäß der o.g. Durchführung mit 100  $\mu\text{L}$  Arabinosyloxylan-Lösung und 350  $\mu\text{L}$  Pufferlösung versetzt wurden.

Als Referenz zur Positivkontrolle wurden 50  $\mu\text{L}$  des gereinigten Überstands verwendet und mit 450  $\mu\text{L}$  Pufferlösung versetzt.

#### Derivatisierung und Quantifizierung reduzierender Zucker mittels DNSA-Reagenz

Der 500- $\mu\text{L}$ -Ansatz wurde zur Entfernung ungelöster Rückstände 10 min bei 13 000 RCF zentrifugiert und 250  $\mu\text{L}$  dieses abpipettierten Überstandes wurden mit 500  $\mu\text{L}$  DNSA-Reagenz (30 g/L K-Na-Tartrat, 16 g/L NaOH, 10 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure) versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei 99 °C für 15 min (Thermomixer, Eppendorf). Es wurde in Dreifachbestimmung die Extinktion bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  in 96-well-Platten mit einem Füllvolumen von 200  $\mu\text{L}$  gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Standards von Xylose im Konzentrationsbereich von 100-1000 mg/L mit Füllvolumina von 200  $\mu\text{L}$ .

1 U wurde als Xylanasemenge definiert, die pro Minute 1  $\mu\text{mol}$  Xylose freisetzte.

## 2.6 Folin-Ciocalteu-Assay

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgt typischerweise fotometrisch mit der Methode nach Folin-Ciocalteu (Campos *et al.*, 2013). In anderen Literaturquellen wird dieser Assay nicht als Gesamtphenolbestimmungsmethode, sondern als Bestimmungsmethode zur Gesamtheit der antioxidativen Kapazität einer Probe erachtet (Berker *et al.*, 2013; Everette *et al.*, 2010).

Hierbei handelt es sich um einen unspezifischen Assay, bei dem phenolische OH-Gruppen mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem blau gefärbten Chromophor reagieren (Schofield *et al.*, 2001).

Das Folin-Ciocalteu-Reagenz selbst ist eine wässrige Lösung aus  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (ggf. auch  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ),  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HCl}$  und  $\text{LiSO}_4$ . Das Lithiumsalz wird dabei zur Vermeidung von Trübungen eingesetzt (Attard, 2013). Während der Reaktion kommt es zu einer Oxidation der phenolischen OH-Gruppen zu den entsprechenden Chinonen, während die Phosphowolframat-Spezies (bzw. Phosphomolybdat-Spezies) reduziert werden (Schofield *et al.*, 2001). Der exakte Reaktionsablauf, der zur Bildung des blauen Chromophors führt, ist allerdings noch nicht vollständig verstanden (Blainski *et al.*, 2013; Sanchez-Rangel *et al.*, 2013).

Typischerweise erfolgt eine indirekte Kalibration mit Gallussäure oder Kaffeesäure, ebenfalls Verbindungen mit phenolischen OH-Gruppen, als Referenz. In dieser Arbeit wurde mit Gallussäure im Konzentrationsbereich von 2-30 mg/L kalibriert. Das Pipettierschema erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift im Mikrotiterplattenmaßstab (Attard, 2013) in 96-well-Platten. Der Ansatz betrug jeweils:

- 40  $\mu\text{L}$  Probe (ggf. im Vorfeld verdünnt)
- 80  $\mu\text{L}$  des 1:4 verdünnten Folin-Ciocalteu-Reagenzes
- 80  $\mu\text{L}$  einer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, 18 % (w/v)

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei  $\lambda = 740 \text{ nm}$  fotometrisch bestimmt. Die Konzentrationsangabe des Gesamtphenolgehalts in den Proben erfolgte über die Kalibrationsgerade in „mg/L Gallussäureequivalenten“.

## 2.7 Ergosterolbestimmung

Ergosterol ist ein Bestandteil der Pilzzellmembran. Als solches kann der Ergosterolgehalt zur Bestimmung für die Pilzbiomasse verwendet werden (Ng *et al.*, 2008). Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn die Probenmatrix komplex ist und die Pilzbiomasse mechanisch nicht auf einfache

Weise vom Rest der Probe separiert werden kann (Davis & Lamar, 1992; Raimbault, 1998; Steudler & Bley, 2015).

Die Bestimmung von Ergosterol erfolgte in Anlehnung an Literaturvorschriften mittels alkalischer Verseifung der Probe, Extraktion und anschließender Messung mittels HPLC (Krings & Berger, 2014; Wittig *et al.*, 2013).

Zur Bestimmung des Ergosterols wurde die gesamte 50-mL-Weizenstrohgärrest-Kultur<sup>2</sup> (wie im Experiment in 3.4) bzw. 1 g eines getrockneten Pilz/Gärrestkultur-Aliquots (wie im Experiment in 3.6) in einen 100-mL-Rundkolben mit aufgesetztem Dimrothkühler überführt, mit 10 mL KOH (50 % (w/v)), 4 mL Natriumascorbatlösung (17,5 g/L Natriumascorbat in 1 M NaOH gelöst), 30 µg Cholecalciferol (300 µL einer Lösung von 100 mg/L Cholecalciferol in Methanol) als interner Standard und 50 mL Ethanol (96 %, vergällt) versetzt und bei 80-90 °C und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die verseifte Probe in 250-mL-Zentrifugenbecher<sup>3</sup> (Nalgene<sup>®</sup> Style 3141) überführt und drei Mal mit jeweils 100 mL einer azeotropen *n*-Pentan/Diethylether-Mischung (1:1,12 (v/v)) extrahiert. Zur schnelleren Phasentrennung wurde 2 min bei 1000 RCF zentrifugiert. Die organische Phase (obere Phase) wurde mittels eines selbstgebauten Vakuumsystems über einen Teflonschlauch abgesaugt.

Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ausgeheiztem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (120 °C, 24 h) getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur Trockne entfernt und der Rückstand in 3 mL Methanol gelöst und das Lösen im Ultraschallbad beschleunigt. Die so aufgearbeitete Probe wies noch braune ungelöste Rückstände auf, sodass eine Zentrifugation (10 min, 5000 RCF) durchgeführt wurde. Der klare Überstand wurde mittels HPLC-DAD gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe externer Kalibrationsstandards über die Peakflächen bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der Stoffe (Cholecalciferol: 265 nm, Ergosterol: 283 nm).

Alle HPLC-Messungen wurden an einer „Shimadzu Nexera X2“-Anlage mit der Säule Nucleodur Pyramid (250 mm × 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) bei 40 °C Säulenofentemperatur durchgeführt. Es wurde der in Tabelle 10 verwendeten Gradient mit einer Flussrate von 1,0 mL/min verwendet.

---

<sup>2</sup> Dies entspricht 19,0 g Feuchtmasse bzw. 4 g Trockenmasse des Weizenstrohgärrestes.

<sup>3</sup> Die Extraktion wurde in diesem Fall nicht mit Hilfe eines Schütteltrichters durchgeführt, da die festen Bestandteile des Gärrestes den Auslaufhahn verstopft hätten.

Tabelle 10: Verwendeter Gradient (HPLC-System) zur Ergosterol-Analytik. Dem Wasser als Eluenten wurde 0,1 % Ameisensäure (FA engl. *formic acid*) zugesetzt.

| t / min | Acetonitril / % | Wasser (+ FA) / % | Methanol / % |
|---------|-----------------|-------------------|--------------|
| 0       | 70              | 30                | 0            |
| 2       | 100             | 0                 | 0            |
| 8       | 100             | 0                 | 0            |
| 18      | 95              | 0                 | 5            |
| 24      | 95              | 0                 | 5            |
| 28      | 70              | 30                | 0            |

Alle in dieser Arbeit angegebenen Ergosterolgehalte wurden unter Einberechnung der Wiederfindungsrate als Korrekturfaktor angegeben. Anschließend wurde dieser Wert auf die Einwaage der entsprechenden Gärrestkultur bezogen, sodass der Massenanteil als „ $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g der trockneten Weizenstrohgärrest-Kultur“ angegeben wurde.

## 2.8 Ligninbestimmung

Die Ligninbestimmung erfolgte mittels des Klason-Verfahrens, welches auf einer zweistufigen sauren Hydrolyse der Probe mit anschließender gravimetrischer Bestimmung des ungelösten Lignin-Rückstandes basiert (Hatfield & Fukushima, 2005; Nicholson *et al.*, 2014).

Es wurden zwecks Dreifachbestimmung pro Kultur je drei Aliquote von 1 g des getrockneten Materials (120 °C, 24 h) eingewogen und die exakte Einwaage notiert. Die Proben wurden im 100-mL-Rundkolben mit je 10 mL 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden diese Ansätze in 500-mL-Erlenmeyerkolben überführt und durch Zugabe von 230 mL dest. Wasser die Schwefelsäure auf 3 % verdünnt. Diese Ansätze wurden autoklaviert (20 min, 121 °C). Jede Probe wurde durch einen gewogenen (und zuvor bei 400 °C für mind. 6 h ausgeheizten) Glasfiliertiegel filtriert und nach der Trocknung bei 120 °C bis zur Gewichtskonstanz ausgewogen.

Bei den Angaben zu den Ligningehalten wurde 1 % als 1 g des getrockneten Lignins in 100 g getrockneter Kulturprobe definiert.

## 2.9 Messung der Biogasausbeute

Nach Ende der jeweiligen Kultivierung wurden die Proben bis zur Messung der Biogasausbeute bei –20 °C gelagert. Die Biogasmessung erfolgte im Rahmen des Kooperationsprojekts extern an der TUHH (Technische Universität Hamburg-Harburg) in s.g. GB21-Versuchen (Bestimmung der

Gasbildungsrate) gemäß VDI 4630 (VDI 4630, 2006). Es handelt sich hierbei um eine volumetrische Messung der anaerob entstehenden Gase mit Hilfe eines skalierten Gasrohrs (Eudiometer). Zur Erzeugung anaerober Bedingungen wurde das System mit Stickstoff gespült. Jede Probe (Pilz/Gärrest-Kultur) wurde nach dem Auftauen zwecks Dreifachbestimmung erst homogenisiert und das Homogenat aliquotiert. Jeder Aliquot wurde mittels 200 mL eines Impfschlammes angeimpft, der von einem Klärwerk (Köhlbrandhöft, Hamburg) bezogen wurde. Die Vergärung erfolgte nach einem Batch-Verfahren, wie in Abbildung 10 gezeigt, für ca. 26-32 Tage.

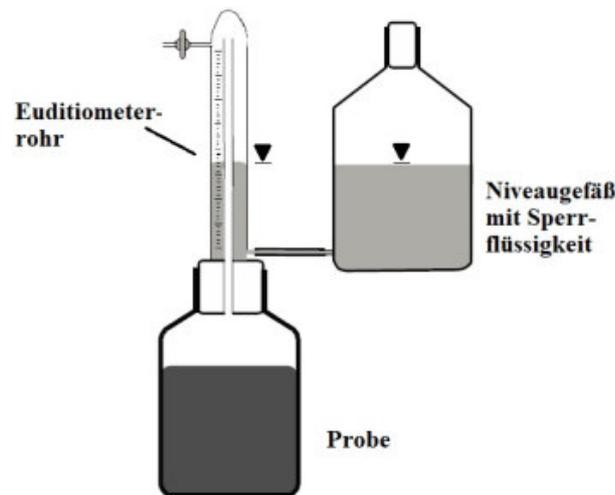


Abbildung 10: Aufbau der GB21-Apparatur, abgeändert nach (VDI 4630, 2006). Alle in dieser Arbeit durchgeführten Biogasausbeutemessungen erfolgten nach diesem Batch-Verfahren in Eudiometerstationen in Dreifachbestimmung. Die gesamte Apparatur befand sich in einem auf  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  beheizten Klimaraum. Zum Ablesen der Biogasausbeute wurde täglich ein Messwert nach vorherigem Angleichen der Flüssigkeitspegel im Eudiometerrohr und im Niveaugefäß (s. Dreieckspfeile) abgelesen. Jede Probe wurde ein Mal täglich zwecks Homogenisierung manuell geschwenkt.

Die gebildete Volumen des Biogases wird als Funktion der Zeit in Form einer s.g. Biogaskurve dargestellt. Jeder Messpunkt einer Biogaskurve entspricht dabei dem Mittelwert der drei Aliquote der dazugehörigen Probe. Als Fehlerbalken wird für jeden einzelnen Datenpunkt der Biogaskurve die Standardabweichung der Dreifachbestimmung angegeben.

Exemplarisch ist in Abbildung 11 der Verlauf typischer Biogaskurven gezeigt.

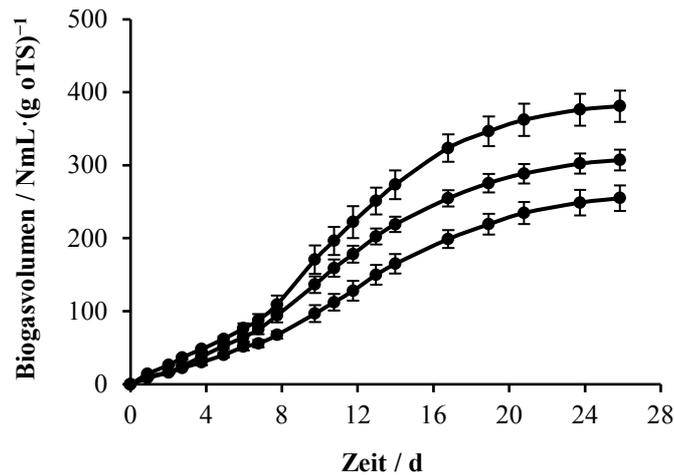


Abbildung 11: Beispiel für den Verlauf dreier typischer Biogaskurven in einem Zeit-Biogaskvolumen-Diagramm. Jeder Datenpunkt einer Biogaskurve entspricht dem Mittelwert der jeweiligen Dreifachbestimmung von Aliquoten einer Probe zum angegebenen Messtag, wobei die Fehlerbalken die dazugehörigen Standardabweichungen repräsentieren.

Die typische Biogaskurve weist einen S-förmigen Verlauf auf. Des Weiteren hat sie stets eine positive Steigung, da es sich um kumulierte Volumina des entstehenden Biogases handelt. Dagegen deuten negative Steigungen auf ein Gasleck im System. Nachdem die jeweilige Kultur vollständig durch die Mikroorganismen des Impfschlamm vergoren wurde und kein weiteres Biogas mehr gebildet wird, erreicht die Biogaskurve ein Plateau. Die zu diesem Plateau gehörende Ordinate wurde in dieser Arbeit als die „Biogausbeute“ der jeweiligen Probe bezeichnet.

Bei der Auswertung der Biogasergebnisse galt es zu berücksichtigen, dass der Impfschlamm (unabhängig von der zu vergärenden Probe) ein Eigengärpotential aufweist. Dies wurde in einem separaten Gefäß bestimmt, das lediglich den Impfschlamm selbst enthielt. Der Zahlenwert dieser Biogausbeute wurde stets von der gesamten Biogausbeute einer Probe subtrahiert.

Bei jeder Biogasmessung, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, erfolgte parallel eine Animpfung einer Cellulose-Referenz mit demselben Impfschlamm. Anhand der Biogausbeute dieser Referenz konnte bei allen Proben, die mit derselben Impfschlamm-Charge inokuliert wurden, die Qualität des Impfschlamm retrospektiv beurteilt werden.

Nicht in jedem der in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungsversuche war es möglich, alle Kulturproben, die zu einem gemeinsamen Experiment gehören, mit derselben Kläranlagen-Impfschlamm-Charge zu vermessen, da die Anzahl der GB21-Messstationen (Abbildung 9) beschränkt war. In einzelnen Experimenten wurde deshalb der gesamte Probensatz in zwei Teile geteilt, die entsprechend mit unterschiedlichen Impfschlamm-Chargen vermessen wurden. Allerdings weisen verschiedene Chargen des Impfschlamm unterschiedliche Aktivitäten auf, sodass selbst bei der

Vermessung gleicher (chemisch langfristig stabiler) Proben das Plateau der Biogasausbeute nach unterschiedlichen Messzeiten erreicht wird. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Probenreihen, die mit unterschiedlichen Impfschlamm-Chargen vermessen wurden, zu gewährleisten, wurden die Biogasausbeuten der Cellulose-Referenzen beider Chargen verglichen und auf diese Weise normiert.

Die bereits erwähnte Wahl einer Biogas-Messdauer von 26-32 Tagen ist darin begründet, dass nach dieser Zeit das Plateau der Biogasbildung von Gärresten typischerweise erreicht wird. Eine genaue Definition des s.g. „Abbruchkriteriums“ findet sich in VDI 4630 (VDI 4630, 2006), wonach eine Biogasmessung dann abzubrechen ist, wenn an drei aufeinanderfolgenden Tagen die tägliche Zunahme des Biogases  $< 0,5\%$  der bis zu diesem Zeitpunkt erreichten Gesamtbiogasmenge beträgt.

## **2.10 Übersicht der methodischen Vorgehensweise in dieser Arbeit von der Kultivierung bis zur Biogasmessung**

Die allgemeine Vorgehensweise, nach der in allen Experimenten dieser Arbeit, in denen eine Biogasmessung durchgeführt wurde, vorgegangen wurde, ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Diese umfasst in Kürze die wesentlichen Arbeitsschritte, die in den Abschnitten 2.3 und 2.9 beschrieben wurden.

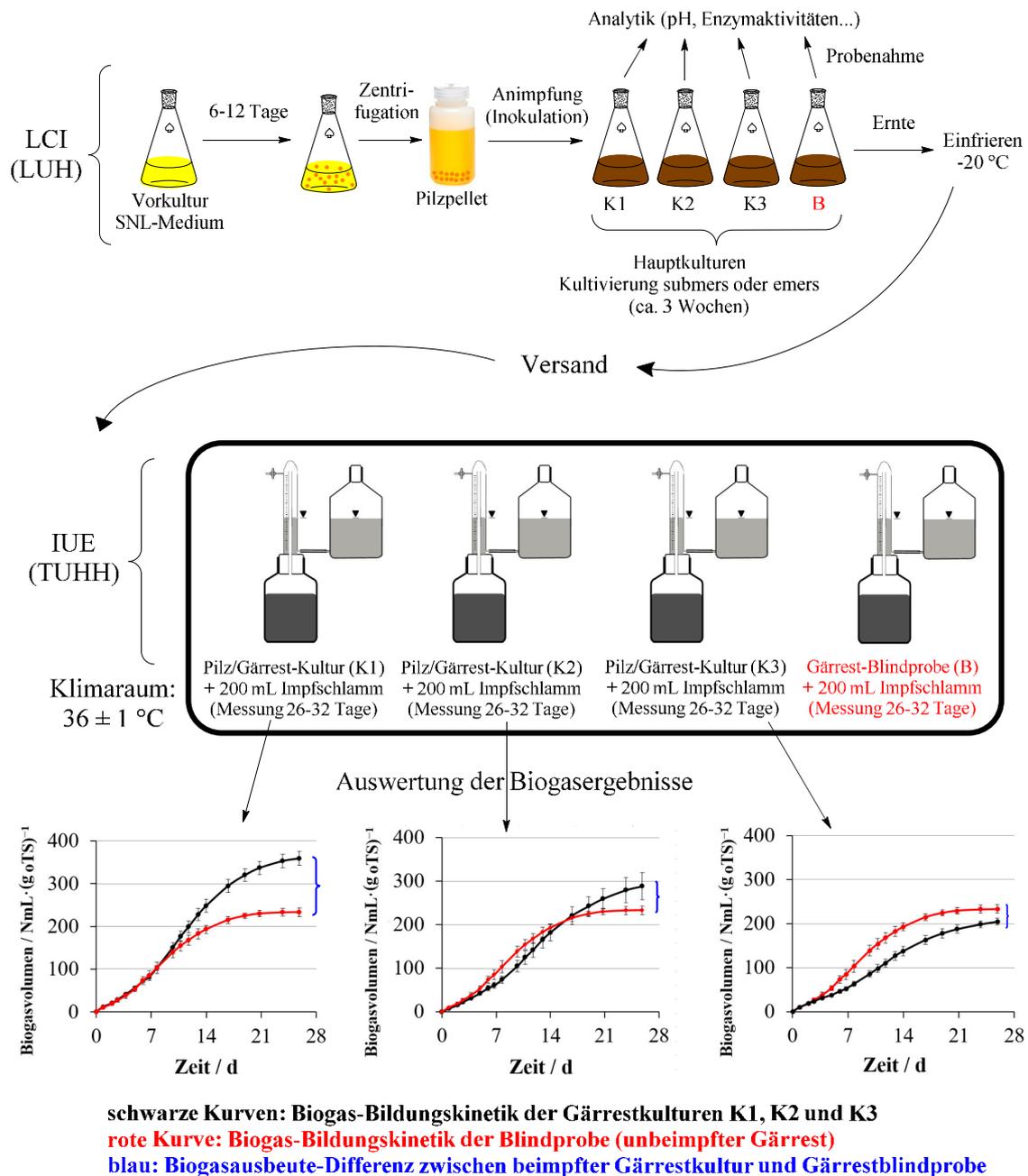


Abbildung 12: Schematische Vorgehensweise aller Experimente dieser Arbeit, in denen nach einer Kultivierung ausgewählter Weißfäulepilze eine Biogasmessung durchgeführt wurde. LCI (LUH) = Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover. IUE (TUHH) = Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der Technischen Universität Hamburg-Harburg.

Zunächst erfolgte eine Herstellung von Vorkulturen eines oder mehrerer ausgewählter Weißfäulepilze in SNL-Medium für 6-12 Tage<sup>4</sup>. Nach dieser Zeit wurde die Kultur geerntet, zentrifugiert und das so gewonnene Pilzpellet mit sterilem Wasser gewaschen. Dieses Pellet wurde zur

<sup>4</sup> Dieser nicht eindeutig spezifizierte Zeitbereich rührte daher, dass verschiedene Basidiomyceten unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen. Bei langsamer wachsenden Basidiomyceten war mehr Zeit nötig, um eine ausreichende Pelletmasse zur Animpfung der jeweiligen Hauptkulturen zu generieren.

Animpfung von emersen oder submersen Hauptkulturen (K1, K2, K3...) verwendet. Eine nicht beimpfte Gärrest-Blindprobe (B) wurde bei allen Kultivierungsversuchen dieser Arbeit ebenfalls mitgeführt. Während bei den emersen Kulturen eine Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte, wurden die submersen Kulturen im Schüttler bei 150 rpm und 24 °C inkubiert. Die Inkubationszeiten der Hauptkulturen sind im Hauptteil (Abschnitt 3) im jeweiligen Versuch genannt und betragen typischerweise 3-4 Wochen.

Während der Kultivierung wurden Proben zur Messung des pH-Werts und Enzymaktivitäten und anderen chemisch messbaren Parametern gezogen. Nach der Zentrifugation dieser Proben wurde der erhaltene Kulturüberstand für Enzymassays (Laccasen, Peroxidasen, Cellulasen, Xylanasen) verwendet.

Direkt nach der Ernte wurde die jeweilige Hauptkultur eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Anschließend erfolgte der Versand. Die aufgetauten Kulturproben (sowohl die beimpften Kulturen als auch die Blindprobe) wurden zwecks Dreifachbestimmung in jeweils drei Chargen aufgeteilt. Jede davon wurde je eine Gärflasche überführt und mit 200 mL Impfschlamm (der von einer Kläranlage bezogen wurde) inokuliert, gasdicht verschlossen und die Biogausausbeute im Verlauf von 26-32 Tagen gemessen. Die gesamte Apparatur befand sich in einem auf  $36 \pm 1$  °C temperierten Klimaraum. Das Ablesen der jeweiligen Biogaswerte erfolgte in Intervallen von 1-3 Tagen. Als entscheidende Kenngröße wurde die (in Abbildung 12 blau markierte) Biogausausbeute-Differenz zwischen der beimpften Kultur und der Blindprobe herangezogen. Durch diesen Wert wurde bemessen, inwieweit der Ligninabbau durch den jeweiligen Weißfäulepilz und die dazugehörigen Kultivierungsbedingungen erfolgreich waren. Je höher dieser Wert ausfiel, desto eher wurde der dazugehörige Weißfäulepilz für den Ligninabbau im Gärrest als vielversprechend erachtet.

### 3 Experimenteller Teil, Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Verwendete Gärreste

Die Gärreste, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest), sind im Folgenden gezeigt.



Abbildung 13: Weizenstrohgärrest im unbehandelten feuchten Zustand (links) und getrockneten Zustand (rechts).



Abbildung 14: Reisstrohgärrest im unbehandelten feuchten Zustand (links) und getrockneten Zustand (rechts).



Abbildung 15: Grünschnittgärrest im unbehandelten feuchten Zustand (links) und getrockneten Zustand (rechts).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wurden hauptsächlich mit Weizenstrohgärrest durchgeführt (Experimente 3.2 bis 3.13). Durch die zusätzliche Verwendung von Reisstroh- und Grünschnittgärrest (Experimente 3.13 und 3.14) wurde untersucht, inwieweit die Biogasausbeute dieser alternativen Substrate durch Weißfäulepilze gesteigert werden kann.

Der Weizenstroh- und der Reisstrohgärrest wurde aus einer Versuchsanlage zur Strohvergärung bezogen, während der Grünschnittgärrest aus dem „Biogas- und Kompostwerk Bützberg“ der Stadtreinigung Hamburg bezogen wurde.

Insbesondere im Falle des Weizenstroh- und des Grünschnittgärrest waren grobe strohartige hölzerne Strukturen zu erkennen. Beim Reisstrohgärrest war dieser hölzerne Anteil feiner. Die Trockenmassen dieser Substrate betragen 21 % für Weizenstrohgärrest, 28 % für Reisstrohgärrest und 43 % für Grünschnittgärrest.

Die nativen pH-Werte der Gärreste lagen stets im alkalischen Bereich (durchschnittlich 7,5-9,0). Dass Gärreste gegenüber dem entsprechenden unvergorenen Analogon (z.B. Reisstrohgärrest im Vergleich zu Reisstroh) einen höheren pH-Wert aufweisen, wird in der Literatur bestätigt (Gomez *et al.*, 2007; Pognani *et al.*, 2009).

### **3.2 Vorarbeiten zur Auswahl geeigneter Basidiomyceten für das Screening**

Die Vorarbeiten haben sich darauf konzentriert, eine Vorauswahl geeigneter Weißfäulepilze zu treffen, die auf dem Weizenstrohgärrest kultiviert werden sollen. Dazu wurden sowohl emerse Kulturen (gemäß Abschnitt 2.3.6) als auch submerse Kulturen (gemäß Abschnitt 2.3.5) angesetzt.

Als Kriterien für die Vorauswahl diente in emersen Kultivierungen die Wachstumsfähigkeit, die anhand der Myzel- bzw. Fruchtkörperbildung optisch beurteilt wurde. In submerser Kultivierung wurde vornehmlich das Kriterium der Aktivitäten ligninolytischer Enzyme (Laccasen und Peroxidasen), die mit Hilfe des ABTS-Assays bestimmt wurden, für die Vorauswahl der geeignetsten Weißfäulepilze als bedeutsam gewichtet.

Die dazugehörigen Experimente sind nachfolgend beschrieben.

#### **3.2.1 Emerse Kultivierungen zur Vorauswahl von Basidiomyceten für das Screening**

In diesem Versuch wurden Proben von autoklaviertem Weizenstrohgärrest mit diversen Basidiomyceten gemäß 2.3.6 beimpft und während dieser Zeit das Wachstumsverhalten der Pilze optisch

beurteilt. Ziel dieses Versuchs war es, Basidiomyceten, die in emerser Kultivierung ein ausgeprägtes Wachstum zeigen, zu identifizieren.

Die Animpfung erfolgte gemäß des in 2.3.6 beschriebenen Verfahrens. Dazu wurde  $\frac{1}{4}$  einer myzelbewachsenen SNL-Agarplatte (Durchmesser: 8,5 cm) ausgeschnitten und mit 20 mL sterilem Wasser mittels Ultraturrax® homogenisiert. Dieses Homogenat wurde auf 70 g des autoklavierten Weizenstrohgärrestes (Feuchtmasse) in sterile 500-mL-Erlenmeyerkolben überführt und diese mit (gasdurchlässigen) Cellulosestopfen verschlossen. Diese Kultur wurde anschließend bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) bis zu 24 Tagen inkubiert.

### 3.2.1.1 Ergebnisse

In regelmäßigen Zeitabständen wurden die Kulturen optisch begutachtet und das Wachstumsverhalten diverser Basidiomyceten subjektiv anhand einer definierten Skala von „-“ (kein Wachstum) bis „+ + +“ (sehr ausgeprägtes Wachstum) beurteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengetragen.

Tabelle 11: Übersicht der in diesem emersen Kultivierungsversuch verwendeten Basidiomyceten und deren Wachstumsbewertung auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest. Ein „+“ kennzeichnet gutes Wachstum, eine Klammer eingeschränktes Wachstum und ein „-“ kein Wachstum. Als obere Begrenzung der Skala wurden drei Pluszeichen definiert. Erfolgte am jeweiligen Tag keine optische Wachstumsbeurteilung, wurde die jeweilige Tabellenzelle leer gelassen.

| institutsinterne<br>Stamnummer | Basidiomycet                                   | Abkürzung | Tag | Wachstum | Tag | Wachstum | Tag | Wachstum |
|--------------------------------|--|-----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| 18                             | <i>Ganoderma applanatum</i>                    | GAP       | 12  | -        | 15  | -        | 24  | -        |
| 22                             | <i>Hericium erinaceus</i>                      | HER       | 12  | -        | 15  | -        | 24  | -        |
| 25                             | <i>Lentinula edodes</i>                        | LED       | 9   | -        | 17  | -        | 23  | -        |
| 42                             | <i>Marasmius scorodoni</i>                     | MSC       | 12  | -        | 15  | -        | 24  | -        |
| 60                             | <i>Pleurotus eryngii</i>                       | PER       | 12  | ++       | 15  | ++ (+)   | 24  | +++      |
| 61                             | <i>Pleurotus pulmonarius</i>                   | PPU       | 3   | (+)      | 9   | +        | 15  | +        |
| 64                             | <i>Pleurotus lampas</i>                        | PLA       | 3   | -        | 11  | -        | 17  | -        |
| 65                             | <i>Pleurotus ostreatus</i>                     | POS       | 12  | ++       | 15  | ++ (+)   | 24  | +++      |
| 66                             | <i>Phellinus pini</i>                          | PPI       | 12  | -        | 15  | -        | 24  | -        |
| 68                             | <i>Phlebia radiata</i>                         | PRA       | 12  | -        | 15  | -        | 24  | -        |
| 69                             | <i>Pleurotus sapidus</i>                       | PSA       | 11  | +++      | 14  | +++      | 23  | +++      |
| 80                             | <i>Serpula lacrymans</i>                       | SLA       | 9   | -        | 17  | -        | 23  | -        |
| 84                             | <i>Trametes versicolor</i>                     | TVE       | 6   | -        | 14  | -        | 18  | -        |
| 216                            | <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | POS       | 6   | (+)      | 16  | (+)      |     |          |
| 224                            | <i>Pleurotus sapidus</i>                       | PSA       | 3   | (+)      | 11  | (+)      | 17  | (+)      |
| 232                            | <i>Flammulina velutipes</i>                    | FVE       | 9   | (+)      | 17  | (+)      | 23  | (+)      |
| 236                            | <i>Hirneola-auricula judae</i>                 | HAI       | 8   | (+)      | 16  | (+)      | 22  | (+)      |
| 246                            | <i>Grifola frondosa</i>                        | GFR       | 9   | -        | 17  | -        | 23  | -        |
| 247                            | <i>Bjerkandera adusta</i>                      | BAD       | 8   | -        | 16  | (+)      | 22  | (+)      |
| 249                            | <i>Fomes fomentarius</i>                       | FFO       | 6   | -        | 16  | -        |     |          |

| institutsinterne<br>Stamnummer | Basidiomycet                       | Abkürzung | Tag | Wachstum | Tag | Wachstum | Tag | Wachstum |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| 252                            | <i>Pleurotus dryinus</i>           | PDR       | 3   | –        | 9   | (+)      |     |          |
| 254                            | <i>Phellinus robustus</i>          | PRO       | 9   | –        | 17  | –        | 23  | –        |
| 256                            | <i>Pleurotus flabellatus</i>       | PFL       | 9   | +        | 18  | ++       | 36  | +++      |
| 262                            | <i>Schizophyllum commune</i>       | SCO       | 6   | +        | 14  | +(+)     | 18  | +(+)     |
| 264                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | PCH       | 6   | –        | 14  | –        | 18  | –        |
| 271                            | <i>Meripilus giganteus</i>         | MGI       | 6   | –        | 16  | –        |     |          |
| 275                            | <i>Irpex lacteus</i>               | ILA       | 6   | –        | 16  | –        |     |          |
| 284                            | <i>Pleurotus sajor-caju</i>        | PSAJ      | 3   | +        | 11  | +        | 17  | ++       |
| 286                            | <i>Polyporus squamosus</i>         | PSQ       | 9   | –        | 17  | –        | 23  | –        |
| 295                            | <i>Agaricus bisporus</i>           | ABI       | 3   | –        | 11  | –        | 17  | –        |
| 301                            | <i>Pleurotus dryinus</i>           | PDR       | 3   | –        | 9   | –        |     |          |
| 302                            | <i>Pleurotus ostreatus</i>         | POS       | 3   | –        | 11  | –        | 17  | –        |
| 311                            | <i>Hymenochaete rubiginosa</i>     | HRU       | 9   | –        | 17  | –        | 23  | –        |
| 312                            | <i>Asterostroma cervicolor</i>     | ACE       | 9   | –        | 17  | –        | 23  | –        |
| 316                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | PCH       | 6   | –        | 16  | –        |     |          |
| 317                            | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | PCH       | 6   | –        | 16  | –        |     |          |

Beispielhaft sind im Folgenden Bilder ausgewählter Emerskulturen der Weißfäulepilze *Pleurotus eryngii* 60, *Pleurotus ostreatus* 65, *Pleurotus sapidus* 69, *Schizophyllum commune* 262 und *Phanerochaete chrysosporium* 316 gezeigt.



Abbildung 16: Emerse Kulturen von *Pleurotus eryngii* 60 zu Tag 11 (links) und Tag 22 (rechts) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest.



Abbildung 17: Emerse Kulturen von *Pleurotus ostreatus* 65 zu Tag 11 (links) und Tag 22 (rechts) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest.

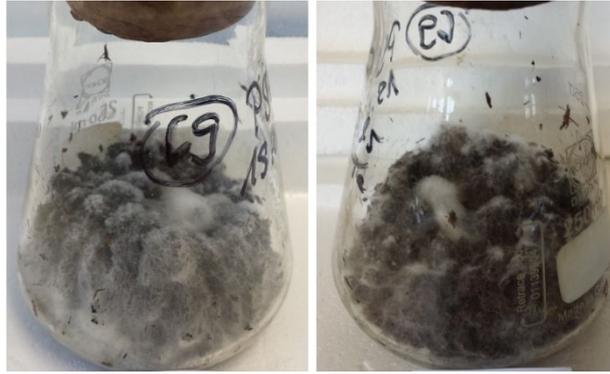


Abbildung 18: Emerse Kulturen von *Pleurotus sapidus* 69 zu Tag 11 (links) und Tag 22 (rechts) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest.



Abbildung 19: Emerse Kulturen von *Schizophyllum commune* 262 zu Tag 6 (links) und Tag 16 (rechts) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest.

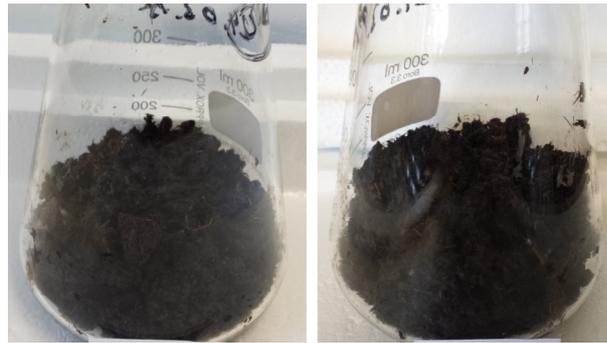


Abbildung 20: Emerse Kulturen von *Phanerochaete chrysosporium* 316 zu Tag 6 (links) und Tag 16 (rechts) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest.



Abbildung 21: Autoklavierte Weizenstrohgärrest-Blindproben zu Tag 6 (links) und Tag 16 (rechts).

### 3.2.1.2 Diskussion

Die meisten der verwendeten Basidiomyceten zeigten kein Wachstum auf dem autoklavierten Weizenstrohgärrest. Wachstum in Form von ausgeprägter Myzelbildung wurde insbesondere bei den Basidiomyceten der Gattung *Pleurotus* beobachtet. Dies war anhand einer zeitlich ansteigenden Erhöhung der Myzeldichte zu beobachten, welche im Fall von *Pleurotus eryngii* 60 auf den obigen Bildern am deutlichsten zu sehen ist (Abbildung 16). Vergleichsweise dazu zeigte *Schizophyllum commune* 262 moderates Wachstum (Abbildung 19).

Des Weiteren wurden zwischen verschiedenen Spezies der *Pleurotus*-Gattung Wachstumsunterschiede festgestellt. So hat z.B. *Pleurotus ostreatus* 65 auf dem Substrat mehr Myzel gebildet als *Pleurotus ostreatus* 216. Ein ähnlicher Unterschied hinsichtlich der Wachstumsgüte wurde bei *Pleurotus sapidus* 69 beobachtet, der ein ausgeprägteres Wachstum als *Pleurotus sapidus* 224 zeigte.

Dass Stämme der Gattung *Pleurotus* auf Gärresten wachsen können, wurde in der Literatur am Beispiel von Maissilagegärrest gezeigt (Santi *et al.*, 2015). Experimentell wurden in dieser Literaturquelle auf Petrischalen autoklavierte Substrate (Maissilagegärrest, unvergorenes Weizenstroh und Gemische beider Substrate) mit Pilzmyzel von jeweils vier verschiedenen Basidiomyceten

(*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus columinus* und *Agrocybe aegerita*) mittig beimpft und die radiale Wachstumsgeschwindigkeit gemessen. Dabei wuchsen die *Pleurotus*-Stämme durchschnittlich schneller als *Agrocybe aegerita*.

Somit findet sich bzgl. der oben gezeigten Ergebnisse eine Bestätigung in den Literaturdaten in dem Sinne, dass Weißfäulepilze der Gattung *Pleurotus* für den emersen Bewuchs bestimmter Gärresten vielversprechend sind.

Kein Wachstum zeigten dagegen beispielsweise *Phanerochaete chrysosporium* 316 und *Trametes versicolor* 84. Dabei werden in der Literatur gerade *Phanerochaete chrysosporium* (Rodriguez-Couto, 2017; Singh & Chen, 2008) und *Trametes versicolor* (Bartholomew *et al.*, 2001) als Modellorganismen hinsichtlich des Ligninabbaus erachtet, sodass zu erwarten wäre, dass diese Stämme auf dem Gärrest Anzeichen von Wachstum zeigen würden.

Festzuhalten bleibt, dass sich Stämme der Gattung *Pleurotus* im Gegensatz zu den anderen getesteten Stämmen wegen ihrer Wachstumsfähigkeit auf Weizenstrohgärrest in emerser Kultivierung als besonders geeignet erwiesen haben, sodass sie in den nachfolgenden Kultivierungen vorwiegend verwendet werden.

### 3.2.2 Submerse Kultivierungen zur Vorauswahl von Basidiomyceten für das Screening

Die Submerskulturen wurden gemäß Abschnitt 2.3.5 angesetzt. Nach dem Autoklavieren der Gärrest-Suspensionen wurden diese mit Pilzpellet aus den Vorkulturen gemäß Abschnitt 2.3.4 angeimpft. Es wurde stets das Pellet der gesamten Vorkultur verwendet, um die Hauptkulturen anzupflanzen. Hierbei wurde mit drei verschiedenen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen von 1,25 %, 2,5 % und 12,5 % Feuchtmasse gearbeitet. In gleicher Reihenfolge entspricht dies 0,26 %, 0,53 % und 2,63 % Trockenmasse. Die Wahl dieser Gärrestkonzentrationen erfolgte, um die Expression ligninolytischer Enzyme der verwendeten Basidiomyceten in einer breiten Konzentrationsspanne des Gärrestes zu untersuchen. Die Auflistung der verwendeten Basidiomyceten für diesen Versuch findet sich in Tabelle 12.

Tabelle 12: Übersicht der in diesem submersen Kultivierungsversuch verwendeten Basidiomyceten.

| institutsinterne<br>Stammnummer | Basidiomycet               | Abkürzung |
|---------------------------------|----------------------------|-----------|
| 60                              | <i>Pleurotus eryngii</i>   | PER       |
| 65                              | <i>Pleurotus ostreatus</i> | POS       |
| 69                              | <i>Pleurotus sapidus</i>   | PSA       |
| 84                              | <i>Trametes versicolor</i> | TVE       |

| institutsinterne<br>Stammnummer | Basidiomycet                                   | Abkürzung |
|---------------------------------|--|-----------|
| 216                             | <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | POS       |
| 236                             | <i>Hirneola auricula-judae</i>                 | HAI       |
| 247                             | <i>Bjerkandera adusta</i>                      | BAD       |
| 295                             | <i>Agaricus bisporus</i>                       | ABI       |

Das Kultivierungsschema dieses Versuchs ist in Abbildung 22 gezeigt.

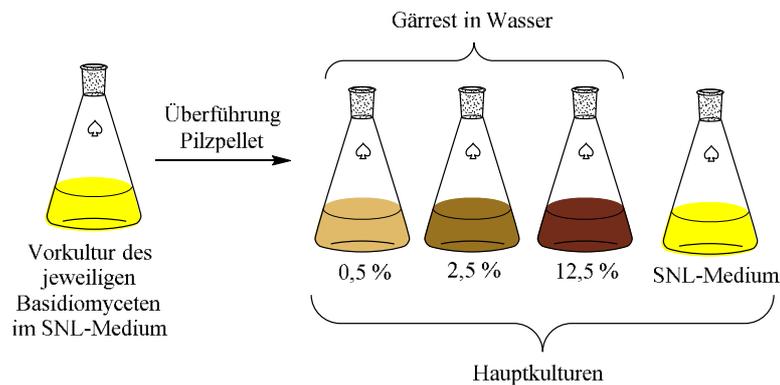


Abbildung 22: Kultivierungsschema. Nach Zentrifugation wurde das Pilzpellet des jeweiligen Basidiomyceten aus der Vorkultur (SNL-Medium) in die Hauptkulturen mit 0,5 %, 2,5 % und 12,5 % Weizenstrohgärrest-Feuchtmasse angeimpft. Als Wachstumskontrolle wurde das Pellet in frisches SNL-Medium (ohne Zusatz von Gärrest) überimpft.

Exemplarisch sind in Abbildung 23 die submersen Hauptkulturen von POS216 gezeigt.



Abbildung 23: Submerskulturen von *Pleurotus ostreatus* 216 mit (v. l. n. r.) 0,5 %, 2,5 % und 12,5 % Weizenstrohgärrestfeuchtmasse.

### 3.2.2.1 Ergebnisse

Während der Kultivierung wurden Probenahmen aus den submersen Kulturen gemäß 2.3.7 durchgeführt. In den zentrifugierten Kulturüberständen der Hauptkulturen (Abbildung 22) wurden ligninolytische Enzymaktivitäten (Laccasen und Peroxidasen) mit Hilfe des ABTS-Assays gemessen. Während die vollständigen Daten im Anhang 6.3 zu finden sind, wurden in diesem

Abschnitt die wesentlichen Daten zusammengefasst<sup>5</sup>. Die Datenreihe für 0,5 % Weizenstrohgärrest wurde im Folgenden nicht aufgeführt. Im Falle nicht messbarer Enzymaktivitäten wurden die entsprechenden Datenreihen in der jeweiligen Abbildung nicht berücksichtigt.

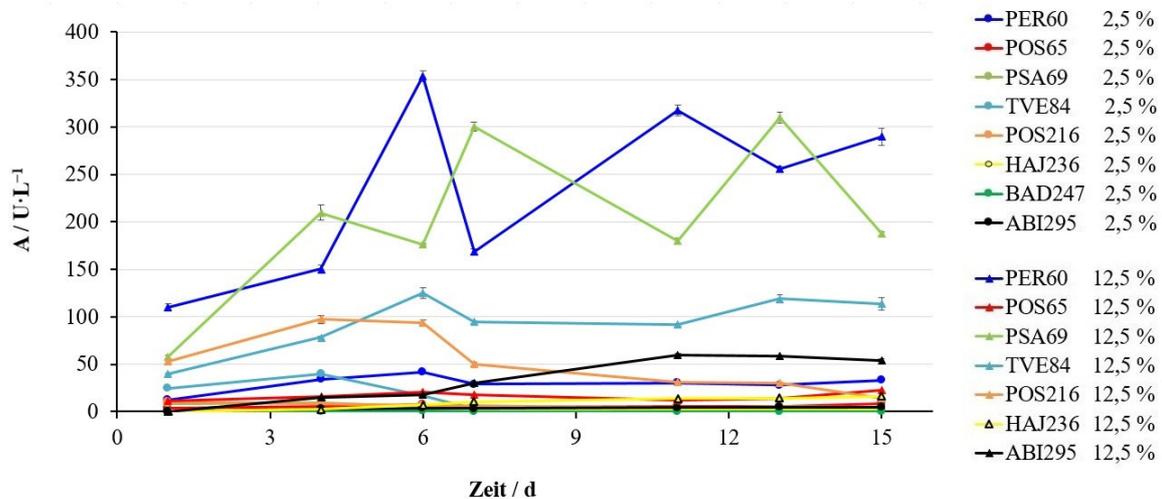


Abbildung 24: Laccaseaktivitäten der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 22) in 2,5 % und 12,5 % Gärrestfeuchtmasse (0,53 % bzw. 2,63 % Trockenmasse).

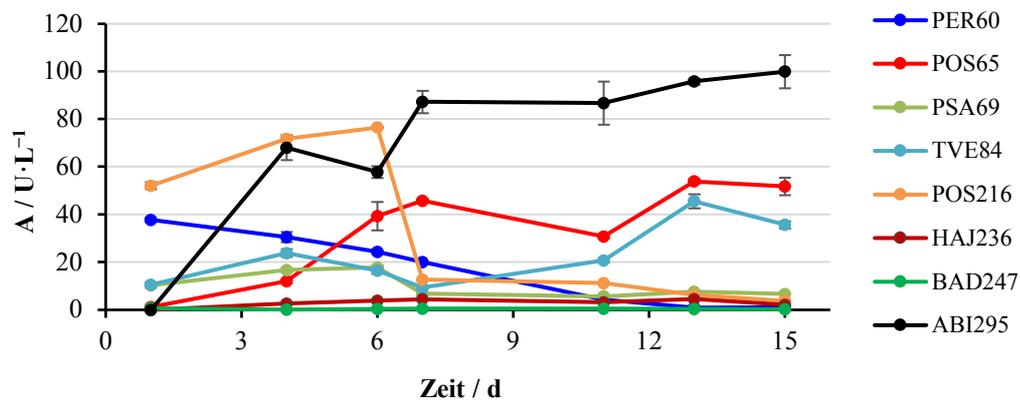


Abbildung 25: Laccaseaktivitäten der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 22) in SNL-Medium.

<sup>5</sup> Diese beinhalten die Laccase- und Peroxidaseaktivitäten der verwendeten Basidiomyceten (s. Tabelle 12) mit 2,5 % und 12,5 % Weizenstrohgärrest-Feuchtmasse sowie die zugehörige Wachstumskontrolle in SNL-Medium.

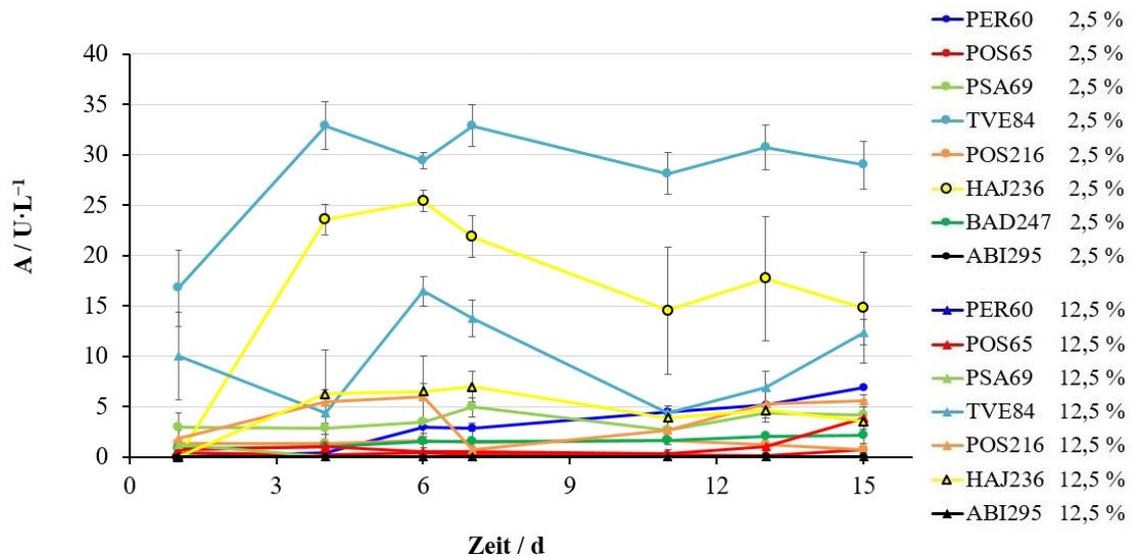


Abbildung 26: Peroxidaseaktivitäten der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 22) in 2,5 % und 12,5 % Gärrestfeuchtmasse (0,53 % bzw. 2,63 % Trockenmasse).

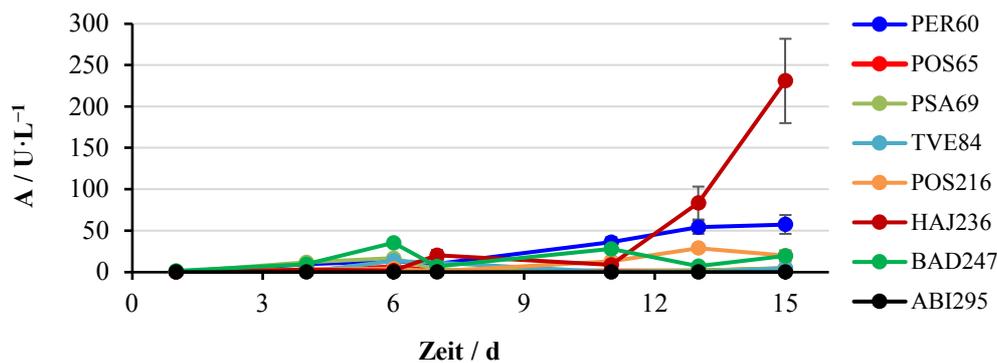


Abbildung 27: Peroxidaseaktivitäten der submersen Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 22) in SNL-Medium.

Tendenziell zeigt sich, dass mit steigender Gärrestkonzentration die Laccaseaktivitäten ebenfalls steigen. So wurden im Falle von 0,5 % Weizenstrohgärrest Laccaseaktivitäten im Bereich von 0-7 U/L (Abbildung 102 im Anhang) und Peroxidaseaktivitäten von 0-8 U/L (Abbildung 106 im Anhang) festgestellt.

Bei 2,5 % Gärrest wurden Laccaseaktivitäten in Höhe von 40 U/L (TVE84) und 41 U/L (PER60) gemessen und Peroxidaseaktivitäten von 33 U/L (PER60) und 25 U/L (HAJ236).

Die submersen Kulturen mit Gärrestkonzentrationen von 12,5 % zeigten höhere Laccaseaktivitäten (verglichen zu den Kulturen mit niedrigerem Gärrestanteil) von 350 U/L (PER60) bzw. 300 U/L (PSA69) und Peroxidaseaktivitäten bis zu 16 U/L (TVE84).

Im SNL-Medium, das in der Hauptkultur als Wachstumskontrolle verwendet wurde, wurden die maximal erreichten Laccaseaktivitäten von 100 U/L (ABI295) und die maximal erreichten Peroxidaseaktivitäten von 231 U/L (HAJ236) und 57 U/L (PER60) festgestellt.

### 3.2.2.2 Diskussion

#### Laccasen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zusammensetzung des Mediums und das Vorhandensein von Nährstoffen und Induktoren die Produktion und Sekretion von Laccasen beeinflussen können (Bertrand *et al.*, 2013; Piscitelli *et al.*, 2011).

Mit Ausnahme der variierenden Gärrestkonzentrationen wurde das Medium der Hauptkulturen in seiner sonstigen Zusammensetzung nicht geändert. Daher können die unterschiedlich hohen Laccaseaktivitäten lediglich durch die unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen verursacht worden sein. Diese beinhalten z.B. das Lignin selbst oder gelöste Gärrest-Bestandteile, die die Expression und Sekretion von Laccasen hervorrufen. In den später durchgeführten Versuchen in Abschnitt 3.3.1 zeigt sich, dass der Gärrest hohe Konzentrationen phenolischer Substanzen enthält. Folglich steigen mit zunehmendem Gärrestgehalt die Konzentrationen dieser phenolischen Substanzen, welche als Induktoren für die Sekretion von Laccasen fungieren können. So wird in der Literatur berichtet, dass die Supplementierung diverser phenolischer Substanzen<sup>6</sup> von jeweils 0,25 mM Endkonzentration in Submerskulturen von *Pleurotus pulmonarius* zu einer Steigerung der Laccaseaktivität geführt hat (Marques de Souza *et al.*, 2004): Während in der Blindprobe (keine Supplementierung) spezifische Aktivitäten<sup>7</sup> von ca. 10 U/mg gemessen wurden, wies die mit Vanillin (phenolische Substanz) supplementierte Kultur 20-fach höhere Laccaseaktivitäten auf (210 U/mg).

Ähnliches zeigte sich in einer anderen Literaturquelle in Kulturen von *Pleurotus eryngii*, bei denen die Supplementierung von aromatischen lignin-verwandten Derivaten im Vergleich zu einer Blindprobe zu einer gesteigerten Laccaseaktivität geführt hat (Muñoz *et al.*, 1997). Dabei wurden in der mit Alkalilignin versetzten Kultur 6-fach höhere Aktivitäten als in der Blindprobe erzielt (300 U/L vs. 50 U/L).

---

<sup>6</sup> Z.B. Ferulasäure, Vanillin, *p*-Cumarsäure, Gallussäure, Coffein und weitere Substanzen

<sup>7</sup> Bezogen auf Myzel-Trockenmasse

In der hier durchgeführten Kultivierung mit unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen ist erkennbar, dass im Falle des Stammes PER60 die Laccaseaktivität bei 12,5 % Gärrest um den Faktor 10 höher ist als bei 2,5 % Gärrest, was mit den Ergebnissen aus der Literatur (Marques de Souza *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 1997) vereinbar ist.

Bezüglich der Pilzstämme wurden (bei 2,5 % und 12,5 % Gärrest) die höchsten Laccaseaktivitäten bei TVE84, PER60 und PSA69 gemessen. Die letzteren beiden Stämme gehören zur Gattung *Pleurotus*. Bereits in der emersen Kulturführung (Abschnitt 3.2.1) zeigten von allen getesteten Basidiomyceten die *Pleurotus*-Stämme, verglichen mit anderen Basidiomyceten, ein ausgeprägteres Wachstum auf dem Gärrest (Tabelle 11).

### Peroxidasen

Bezüglich der Peroxidaseaktivitäten wurden in den verschiedenen Kulturen stammspezifische Unterschiede festgestellt. Die maximalen Peroxidaseaktivitäten wurden in den Submerskulturen von HAJ236 mit der mittleren Weizenstrohgärrest-Konzentration von 2,5 % und in SNL-Medium (Wachstumskontrollkulturen) festgestellt. Aus dieser Beobachtung ist es schwierig, einen klaren Rückschluss zu ziehen. Möglicherweise werden bei der höchsten untersuchten Konzentration von 12,5 % Weizenstrohgärrest die Peroxidasen inhibiert. Dies würde erklären, warum bei der mittleren Konzentration von 2,5 % Weizenstrohgärrest die höchsten Peroxidaseaktivitäten gemessen wurden. Dennoch deuten die Ergebnisse auf eine Enzyminduktion durch den Weizenstrohgärrest, da bei 2,5 % Gärrest höhere Peroxidaseaktivitäten als bei 0,5 % beobachtet wurden.

Die gleiche Beobachtung wurde im Falle von TVE84 und PER60 gemacht, denn die höchste Peroxidaseaktivität wurde ebenfalls bei der mittleren Weizenstrohgärrest-Konzentration von 2,5 % festgestellt. Lediglich im SNL-Medium war in den Kulturen von PER60 die absolute Peroxidaseaktivität höher als in der Kultur mit 2,5 % Weizenstrohgärrest.

Dass die Produktion bzw. Sekretion von Peroxidasen in Gegenwart von aminosäurereichen Medien begünstigt werden kann, wurde in der Literatur am Beispiel von *Pleurotus eryngii* nachgewiesen. Dabei bildete dieser Stamm in Gegenwart von Pepton (Hydrolysat von Proteinen) weitaus höhere Peroxidaseaktivitäten als in Abwesenheit dieser aminosäurereichen Quelle (Martinez *et al.*, 1996).

Ebenso ist das in der hier vorliegenden Arbeit verwendete SNL-Medium reich an Aminosäuren (Zusammensetzung: Tabelle 8), was die Peroxidaseaktivitäten von *Pleurotus eryngii* 60 (PER60) in diesem Medium erklärt.

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment festgestellt, dass TVE84 und Pilze der Gattung *Pleurotus* durchschnittlich die höchsten Laccase- und Peroxidaseaktivitäten in submersen Gärrestkulturen aufwiesen. Da die *Pleurotus*-Spezies auch in der emersen Kultivierung das ausgeprägteste Wachstum gezeigt haben, wurden in den nachfolgenden Kultivierungsversuchen vorwiegend Stämme dieser Gattung verwendet.

### **3.3 Screening nach geeigneten Basidiomyceten für einen effizienten Ligninabbau in Weizenstrohgärrest in emerser und submerser Kulturführung**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, durch ein Screening geeignete Basidiomyceten (eine Vorauswahl dieser Pilze erfolgte in Abschnitt 3.2) für einen maximalen Ligninabbau – und damit verbunden eine maximale Biogasausbeute – zu identifizieren. Dazu wurden sowohl submerse als auch emerse Kultivierungen durchgeführt. Übersichtshalber sei hier auf das allgemeine Arbeitsschema in Abbildung 12 verwiesen, das die Vorgehensweise von der Kultivierung bis zur Biogasausbeutemessung umfasst.

Basierend auf den Ergebnissen aus 3.2.1.1 wurden von vier ausgewählten Basidiomyceten, die als Emerskulturen auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest Wachstum gezeigt haben, gemäß 2.3.6 Hauptkulturen angesetzt und nach 17 Tagen geerntet. Anschließend wurden von diesen Kulturen mit Hilfe von GB21-Experimenten die Biogasausbeuten bestimmt (s. Abschnitt 2.9).

Analog wurden submerse Kulturen von Basidiomyceten, die die höchsten Laccase- und Peroxidaseaktivitäten gezeigt haben (s. Abschnitt 3.2.2.1), gemäß 2.3.5 in 8 % Gärresttrockenmasse mit je 250 mL Kulturvolumen angesetzt und für 17 Tage kultiviert. Die Wahl von 8 % Trockenmasse ist darin begründet, dass dies die maximale Gärrestkonzentration ist, bei der die Suspension noch eine technische Pumpbarkeit aufweist.

Da unterschiedliche Basidiomyceten im selben Nährmedium unterschiedlich schnell anwachsen und sich die Pilzbiomasse, die in der Vorkultur des jeweiligen Stammes anwächst, nicht vorherzusagen ließ, wurde stets die gesamte aus der Vorkultur erhaltene Biomasse zur Animpfung der Hauptkulturen verwendet. Die Inokulummassen wurden jeweils gravimetrisch bestimmt und für

die Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt. Die vollständige Auflistung der Inokulummassen findet sich im Anhang in Tabelle 17.

Die in diesem Experiment verwendeten Basidiomyceten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Liste der Basidiomyceten, die in diesem Screening-Experiment in emerser und submerser Kulturführung verwendet wurden. Ein „×“ bedeutet, dass der jeweilige Basidiomycet in der angegebenen Kulturführung nicht verwendet wurde.

| <b>institutsinterne<br/>Stamnummer</b> | <b>Basidiomycet</b>                            | <b>Abkürzung</b> | <b>Emers<br/>verwendet</b> | <b>Submers<br/>verwendet</b> |
|--|--|------------------|----------------------------|------------------------------|
| 60                                     | <i>Pleurotus eryngii</i>                       | PER              | ja                         | ja                           |
| 61                                     | <i>Pleurotus pulmonarius</i>                   | PPU              | ×                          | ja                           |
| 64                                     | <i>Pleurotus lampas</i>                        | PLA              | ×                          | ja                           |
| 65                                     | <i>Pleurotus ostreatus</i>                     | POS              | ja                         | ja                           |
| 69                                     | <i>Pleurotus sapidus</i>                       | PSA              | ja                         | ja                           |
| 84                                     | <i>Trametes versicolor</i>                     | TVE              | ×                          | ja                           |
| 216                                    | <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | POS              | ×                          | ja                           |
| 224                                    | <i>Pleurotus sapidus</i>                       | PSA              | ja                         | ja                           |
| 252                                    | <i>Pleurotus dryinus</i>                       | PDR              | ×                          | ja                           |
| 256                                    | <i>Pleurotus flabellatus</i>                   | PFL              | ×                          | ja                           |
| 262                                    | <i>Schizophyllum commune</i>                   | SCO              | ja                         | ×                            |
| 274                                    | <i>Hirneola auricula-judae</i>                 | HAJ              | ×                          | ja                           |
| 276                                    | <i>Funalia trogii</i>                          | FTR              | ×                          | ja                           |
| 284                                    | <i>Pleurotus sajor-caju</i>                    | PSAJ             | ×                          | ja                           |
| 295                                    | <i>Agaricus bisporus</i>                       | ABI              | ×                          | ja                           |
| 301                                    | <i>Pleurotus dryinus</i>                       | PDR              | ×                          | ja                           |
| 302                                    | <i>Pleurotus ostreatus</i>                     | POS              | ×                          | ja                           |

Der Basidiomycet PSA224 wurde submers jeweils zwei Mal kultiviert (die erneute spätere Kultivierung wurde als „PSA224\*“ gekennzeichnet).

Das Schema der submersen Kultivierung in diesem Versuch ist in Abbildung 28 gezeigt. Aus der SNL-Vorkultur jedes Basidiomyceten wurden zwei Hauptkulturen (A und B) angeimpft. Dadurch konnten Enzymkinetiken und pH-Zeit-Profile in Doppelbestimmung gemessen werden. Zur Bestimmung der Biogasausbeute wurde dagegen lediglich diejenige der beiden Kulturen (A oder B) verwendet, die die höhere Aktivität ligninolytischer Enzyme aufwies.

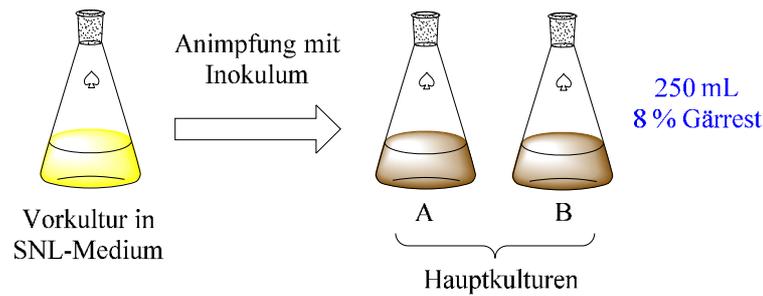


Abbildung 28: Kultivierungsschema zum Screening von geeigneten Basidiomyceten zum Abbau von Lignin in autoklaviertem Weizenstrohgärrest in submerser Kulturführung. Nach Zentrifugation wurde das Pilzpellet des jeweiligen Basidiomyceten aus der Vorkultur (SNL-Medium) gleichmäßig in die Hauptkulturen mit 8 % Gärrestfeuchtmasse in Doppelbestimmung (Kolben A und B) überimpft und 17 Tage bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Die verwendeten Basidiomyceten sind in Tabelle 13 und die dazugehörigen Inokulummassen in Tabelle 17 (Anhang) aufgelistet.

Das Schema der emersen Kultivierung entspricht der in 2.3.6 beschriebenen Vorgehensweise zur „Kultivierung in Erlenmeyerkolben“. Der Weizenstrohgärrest wurde in dieser Versuchsreihe ebenfalls autoklaviert.

### 3.3.1 Ergebnisse

Von den submersen Kulturen wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben gemäß 2.3.7 entnommen. In den Kulturüberständen (zentrifugierte Kulturliquote) wurden sowohl der pH-Wert und der Gesamtphenolgehalt als auch Aktivitäten von Enzymen, die am Abbau von Lignocellulose beteiligt sind (z.B. Laccase, Peroxidasen, Cellulasen) gemessen. Da diese Messgrößen im Zusammenhang mit der Biogasausbeute stehen können, wurde im weiteren Verlauf der Ergebnisbeschreibung ein mathematischer Zusammenhang zwischen diesen Parametern gesucht. Bei den emersen Kulturen wurden bis auf die Biogasmessungen keine weiteren Analysen durchgeführt. Im Folgenden ist detailliert die Darstellung der einzelnen Ergebnisse aufgeführt. Diese umfassen pH-Werte, Aktivitäten von Oxidoreduktasen und Cellulasen sowie die Gesamtphenolgehalte und die Biogasergebnisse.

#### pH-Werte

Es wurden für die Kulturüberstände der Submerskulturen pH-Zeit-Kurven aufgenommen. Diese sind exemplarisch in Abbildung 29 für ausgewählte Basidiomyceten dargestellt.

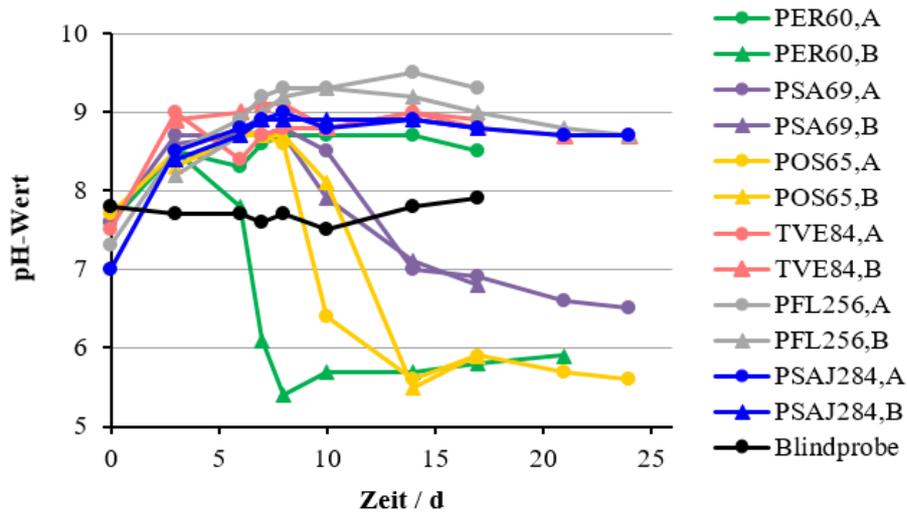


Abbildung 29: pH-Zeit-Profile der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 28) ausgewählter Basidiomyceten. Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Gärrest-Suspension verwendet.

### Aktivitäten von Oxidoreduktasen

Die Enzymaktivitäten von Oxidoreduktasen (hier: Laccasen und Peroxidasen) wurden in den Kulturüberständen gemäß der in 2.5.1 beschriebenen Methode gemessen.

Die Laccaseaktivitäten in U/L sind in Abbildung 30 für ausgewählte Basidiomyceten in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit dargestellt. Die verwendeten Pilzstämmen, die geringe oder kaum messbare Laccaseaktivitäten aufwiesen, wurden hierbei nicht weiter berücksichtigt.

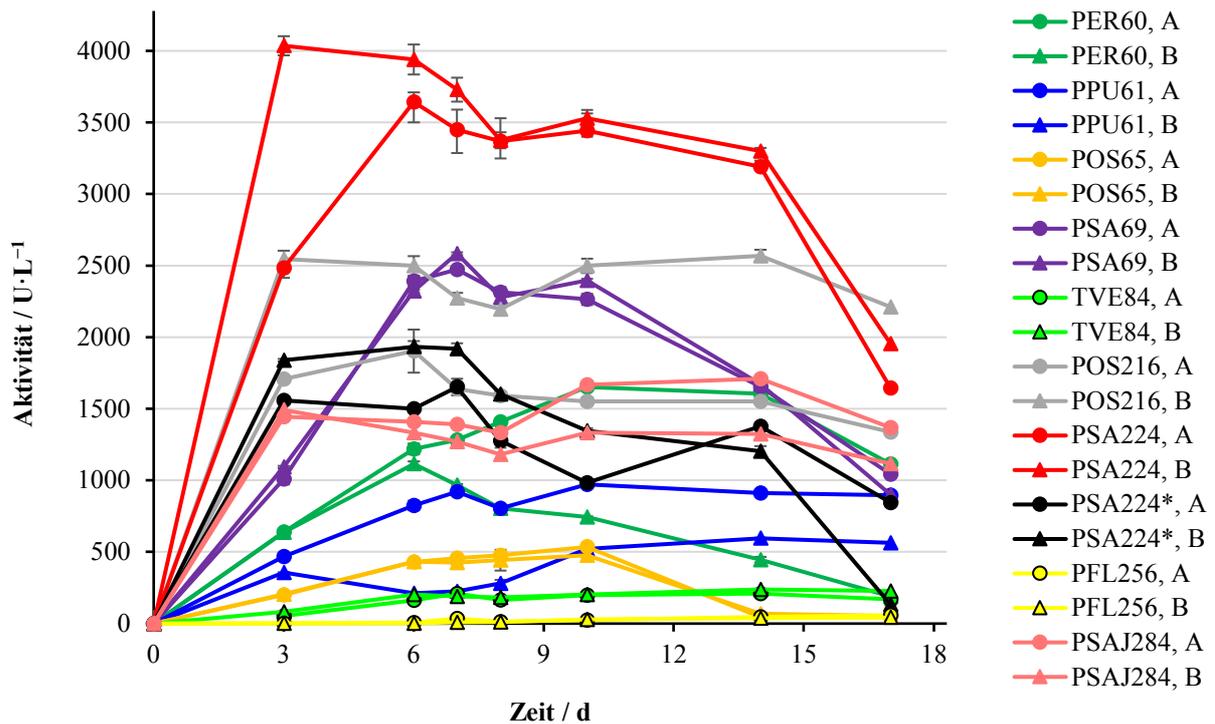


Abbildung 30: Laccaseaktivitäten der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 28) ausgewählter Basidiomyceten. Die Blindprobe (unbeimpfte Gärrest-Suspension) zeigte an keinem Tag messbare Aktivitäten. Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert).

Um die Basidiomyceten hinsichtlich einer repräsentativen Laccaseaktivität vergleichen zu können, wurde eine neue Kenngröße, die „kumulierte normierte Laccaseaktivität“ in U/g, definiert. Diese wurde erhalten, indem alle gemessenen Aktivitäten in U/L derselben Kultur summiert und mit 0,25 L Kulturvolumen multipliziert wurden. Anschließend wurde dieser Wert durch die jeweilige Inokulummasse (s. Tabelle 17 im Anhang) des entsprechenden Stammes dividiert. Die sich daraus ergebenden kumulierten normierten Laccaseaktivitäten in U/g sind in Abbildung 31 für alle untersuchten Basidiomyceten (s. Tabelle 12) aufgeführt.

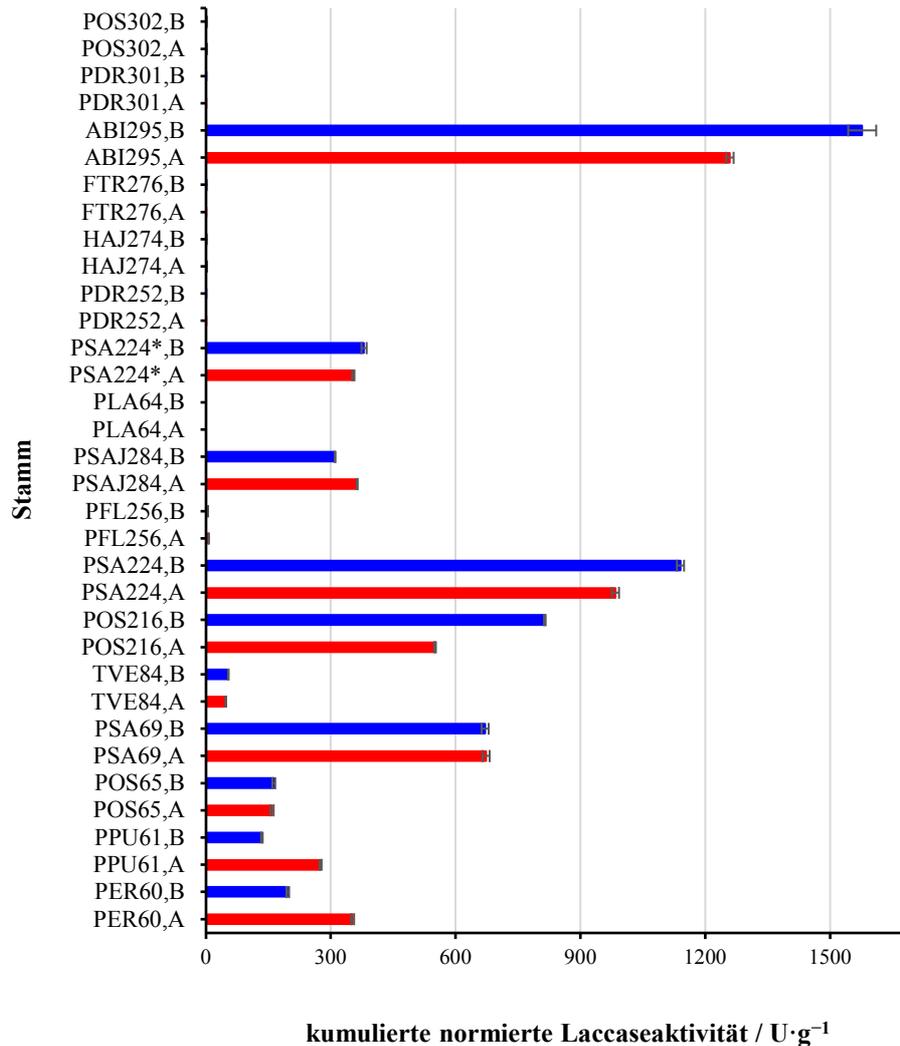


Abbildung 31: Kumulierte normierte Laccaseaktivitäten der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 28) aller verwendeten Basidiomyceten. Die kumulierte normierte Aktivität wurde berechnet, indem die Aktivitäten in U/L summiert und mit 0,25 L Kulturvolumen multipliziert wurden und durch die jeweilige Pilz-Inokulummasse dividiert wurden.

In keinem der Überstände der submersen Kulturen wurden nennenswerte Aktivitäten von Peroxidasen festgestellt.

### Cellulaseaktivitäten

Die Cellulaseaktivitäten wurden nach der in 2.5.2 beschriebenen Methode für die Kulturüberstände der Submerskulturen aller verwendeten Basidiomyceten gemessen. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft das Ergebnis des Cellulase-Assays für ausgewählte Basidiomyceten.



Abbildung 32: Cellulase-Assay nach Derivatisierung von Kulturüberständen ausgewählter Basidiomyceten (*Trametes versicolor* 84 und diverse *Pleurotus*-Spezies) mit dem DNSA-Reagenz (Kultivierungsschema: s. Abbildung 28). Reihen C1 und C9-C12: Positiv-Kontrollen mit kommerziellem Cellulase-Enzym unterschiedlicher Aktivitäten. Reihen C2-C8: Negativ-Kontrollen (Gärrest-Blindproben). Reihen A und B: Kulturüberstände diverser *Pleurotus*-Spezies sowie von *Trametes versicolor* 84 zu den Kultivierungstagen 7 und 14.

### Gesamtphenolgehalte

Die Gesamtphenolgehalte wurden gemäß der in 2.6 beschriebenen Methode mittels des Folin-Ciocalteu-Reagenzes bestimmt. Exemplarisch wurden im Folgenden die Verläufe des Gesamtphenolgehalts in mg/L GAE (Gallussäureequivalente) in den Kulturüberständen ausgewählter Basidiomyceten gezeigt.

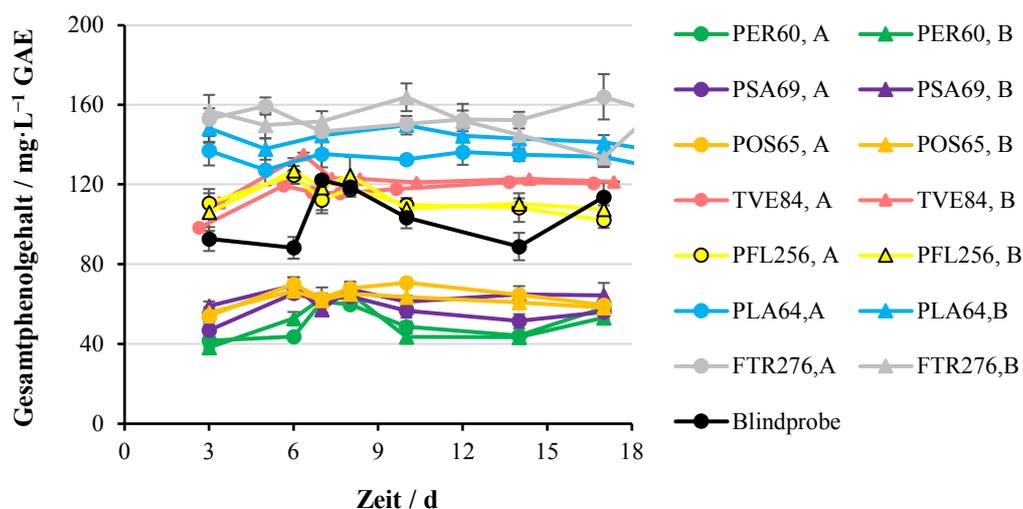


Abbildung 33: Konzentrationsprofil des Gesamtphenolgehalts in Gallussäureequivalenten (GAE) verschiedener Basidiomyceten in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Kultivierungsschema: Abbildung 28). Als Blindprobe wurde der Kulturüberstand einer nicht beimpften Gärrest-Suspension verwendet.

### Biogasausbeuten

Die Biogasergebnisse wurden gemäß des in Abschnitt 2.9 beschriebenen Verfahrens (GB21-Messungen zur Bestimmung der Gasbildungsrate) durchgeführt. Diese sind für die Emers- und Submerskulturen in gleicher Reihenfolge in Abbildung 34 und Abbildung 35 gezeigt.

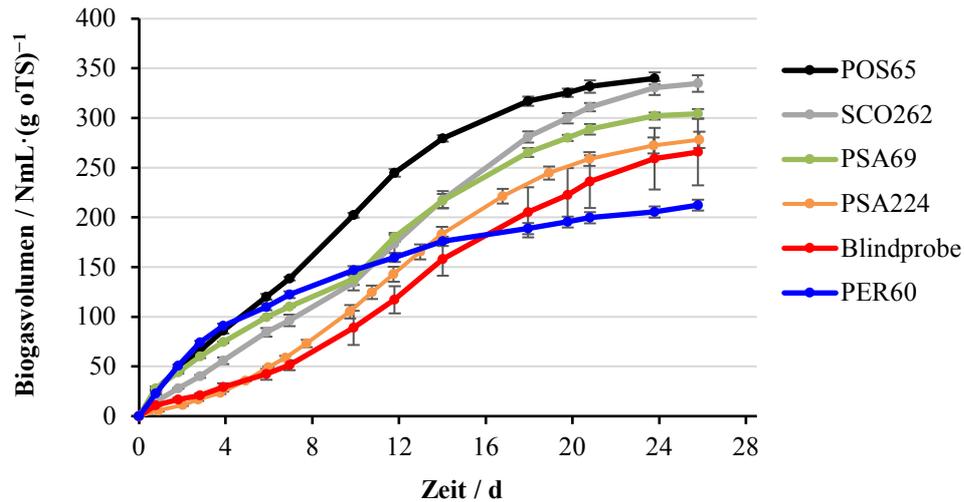


Abbildung 34: Biogasergebnisse des Screenings verschiedener Basidiomyceten in emerser Kulturführung auf Weizenstrohgärrest. Die Biogasausbeute ist als Funktion der Laufzeit der GB21-Versuche aufgetragen. Die Dauer der Kultivierung betrug jeweils 17 Tage. Die Datenreihen wurden in der Legende nach der Höhe der Biogas-Endwerte sortiert. Als Blindprobe wurde ein nicht beimpfter Weizenstrohgärrest verwendet.

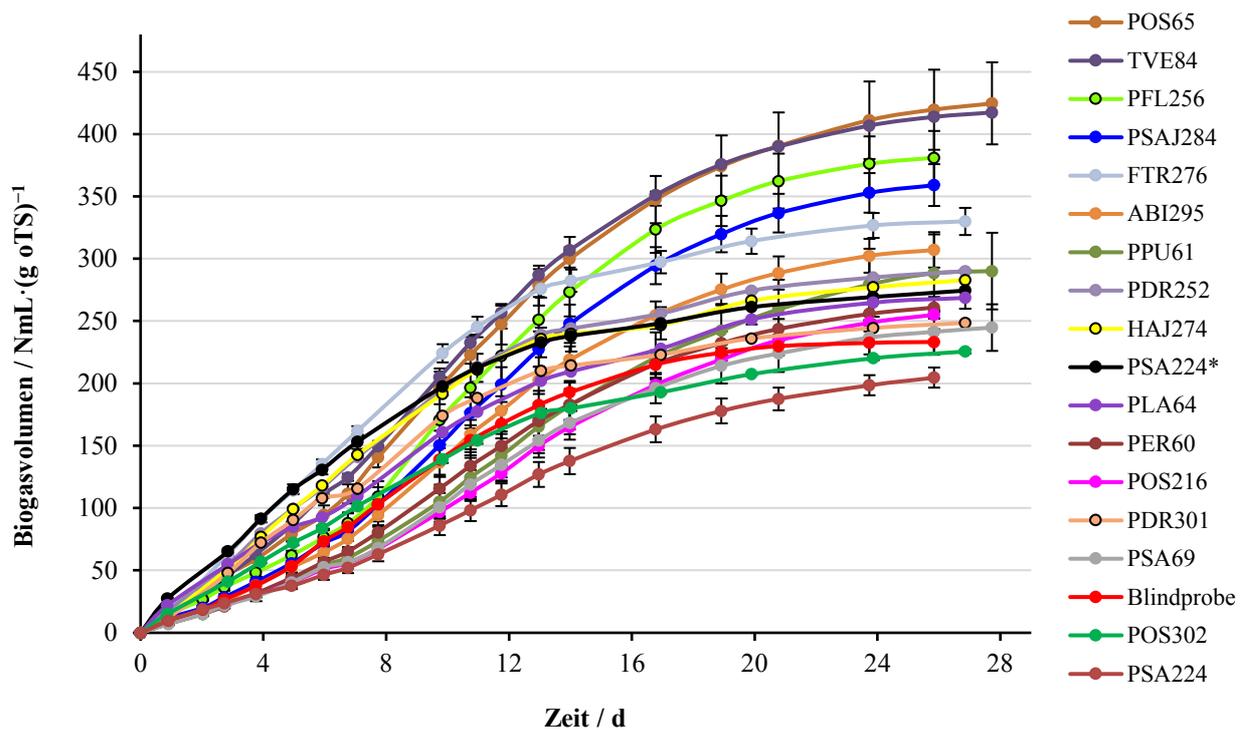


Abbildung 35: Biogasergebnisse des Screenings verschiedener Basidiomyceten in submerser Kulturführung in Weizenstrohgärrest-Kulturen. Die Biogasausbeute ist als Funktion der Laufzeit der GB21-Versuche aufgetragen. Die Dauer der Kultivierung betrug jeweils 17 Tage. Die Datenreihen wurden in der Legende nach der Höhe der Biogas-Endwerte sortiert. Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert). Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet.

### Untersuchung möglicher Zusammenhänge der gemessenen Parameter untereinander

In diesem Abschnitt wurde überprüft, ob die gemessenen Größen (Laccaseaktivität, Gesamtphenolgehalt, Biogasausbeute und Inokulummasse) möglicherweise in einem Zusammenhang stehen, der sich mathematisch beschreiben lässt.

Bisher wurden in den vorherigen Diagrammen Enzymaktivitäten und Gesamtphenolgehalte meist in Form von Zeitprofilkurven gezeigt. Im Folgenden wurde ein simplifizierender Ansatz gemacht, um zeitunabhängige repräsentative Werte für diese Parameter zu erhalten, um anschließend zu überprüfen, ob einer Korrelation dieser Werte mit der Biogasausbeute besteht. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Für Laccasen wurde – wie in Abbildung 31 dargestellt – die kumulierte normierte Aktivität berechnet, wobei die Normierung auf die Inokulummasse der jeweiligen Kultur erfolgte.
- Bezüglich des Gesamtphenolgehalts erschien die Berechnung einer analogen Kenngröße wie z.B. eines „kumulierten normierten Gesamtphenolgehalts“ (aus den in Abschnitt 3.3.2 diskutierten Gründen) nicht sinnvoll. Daher wurde lediglich der Mittelwert über alle gemessenen Gesamtphenolgehalte pro Stamm gebildet und diese als charakteristische Kenngröße („durchschnittlicher Gesamtphenolgehalt“) herangezogen.

Zunächst wurden die Biogasausbeuten als Funktion der kumulierten normierten Laccaseaktivitäten untersucht (Abbildung 36). Die Höhe der Aktivität und die Dauer der Einwirkung der Laccasen auf das Lignin des Gärrestes spiegeln im einfachsten Fall den Ligninabbaugrad wider. Daher war es naheliegend, diesen Parameter mit der Biogasausbeute zu korrelieren.

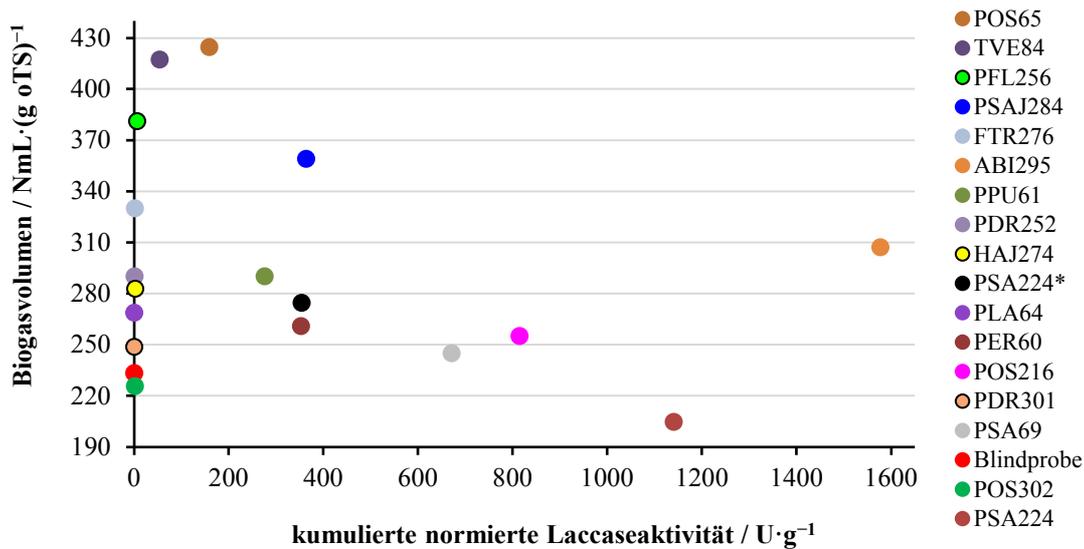


Abbildung 36: Auftragung der kumulierten normierten Laccaseaktivität gegen die Biogasausbeute (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 28) verschiedener Basidiomyceten in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen. Die Datenreihen wurden in der Legende nach der Höhe der Biogas-Endwerte sortiert. Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert). Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Gärrest-Suspension bzw. der Kulturüberstand dieser Suspension verwendet.

Des Weiteren ist bei der Einwirkung von Laccasen auf Lignin zu erwarten, dass phenolische Abbauprodukte entstehen, deren Konzentration möglicherweise proportional zur Biogasausbeute ist. Die Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Gesamtphenolgehalt und der Biogasausbeute ist in Abbildung 37 gezeigt.

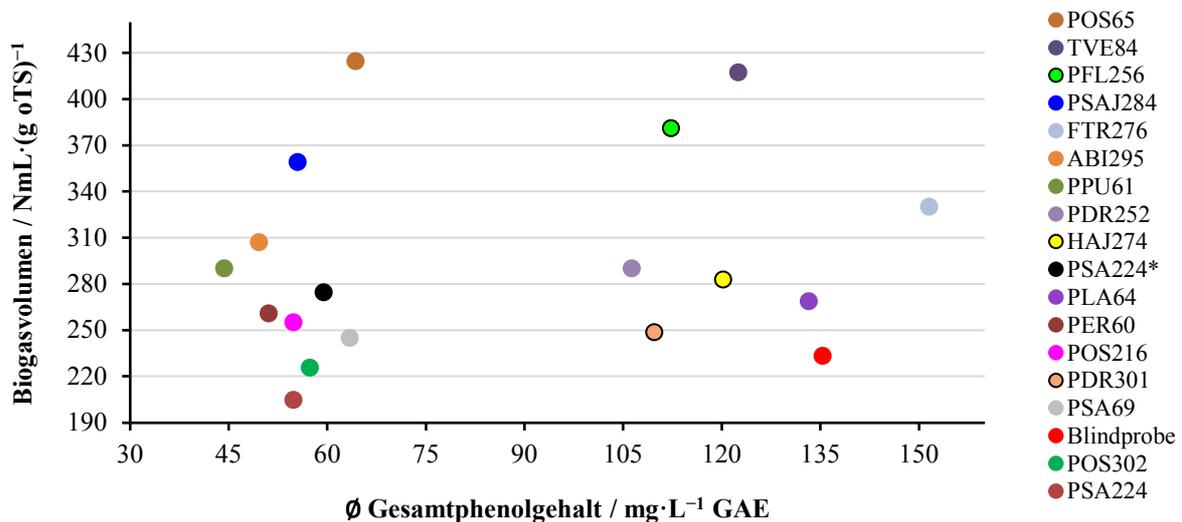


Abbildung 37: Auftragung des durchschnittlichen Gesamtphenolgehalts in Gallussäureequivalenten (GAE) gegen die Biogasausbeute verschiedener Basidiomyceten in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 28). Die Datenreihen wurden in der Legende nach der Höhe der Biogas-Endwerte sortiert. Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert). Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Gärrest-Suspension bzw. der Kulturüberstand dieser Suspension verwendet.

Bereits während der Durchführung der Assays war es auffällig, dass Kulturen mit niedrigen Laccaseaktivitäten tendenziell hohe Gesamtphenolgehalte aufwiesen, während bei hohen Laccaseaktivitäten niedrige Gesamtphenolgehalte festgestellt wurden. Die Auftragung der kumulierten normierten Laccaseaktivität gegen den durchschnittlichen Gesamtphenolgehalt erfolgte in Abbildung 38. Diese Abbildung soll visualisieren, ob diese Parameter miteinander korrelieren.

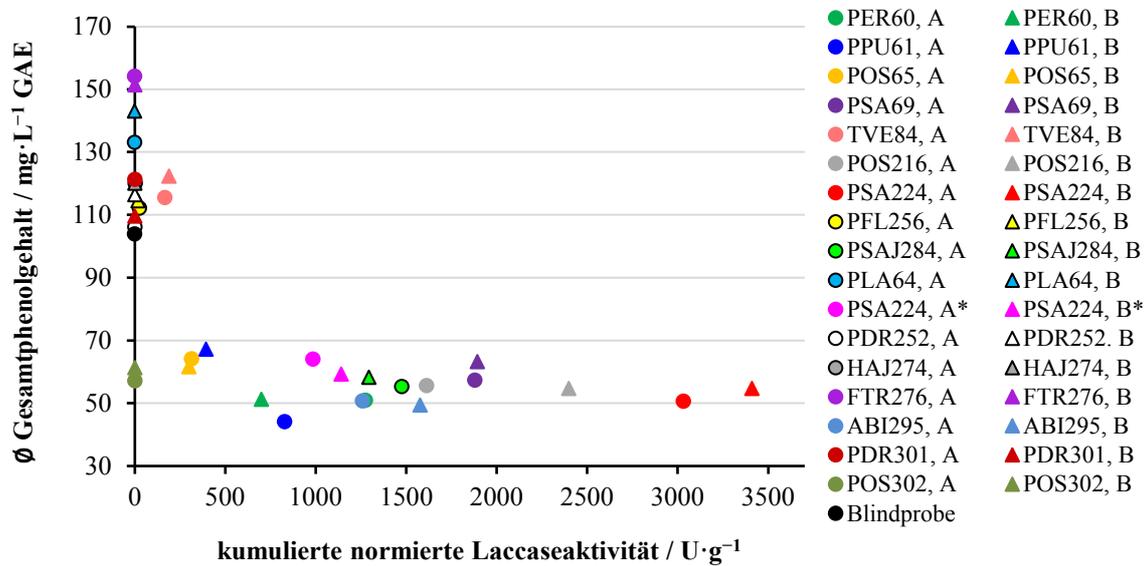


Abbildung 38: Auftragung von kumulierten normierten Laccaseaktivitäten gegen die durchschnittlichen Gesamtphenolgehalte in Gallussäureequivalenten (GAE) der submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen verschiedener Basidiomyceten (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 28). Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert). Als Blindprobe wurde der Kulturüberstand einer nicht beimpften Gärrest-Suspension verwendet.

Neben den bereits aufgeführten chemischen Kenngrößen (Laccaseaktivität und Gesamtphenolgehalt), die gegen die Biogasausbeute aufgetragen wurden, soll im Folgenden anhand der Inokulummasse der jeweiligen Submerskultur überprüft werden, ob diese im Zusammenhang mit der Biogasausbeute steht. Die Animpfung von Kulturen stellt einen Input von Biomasse dar. Daher ist es naheliegend, dass die Inokulummassen (diese wurden im Anhang in Tabelle 17 aufgelistet) mit der Biogasausbeute korrelieren könnten. Abbildung 39 zeigt die Auftragung der beiden Parameter gegeneinander.

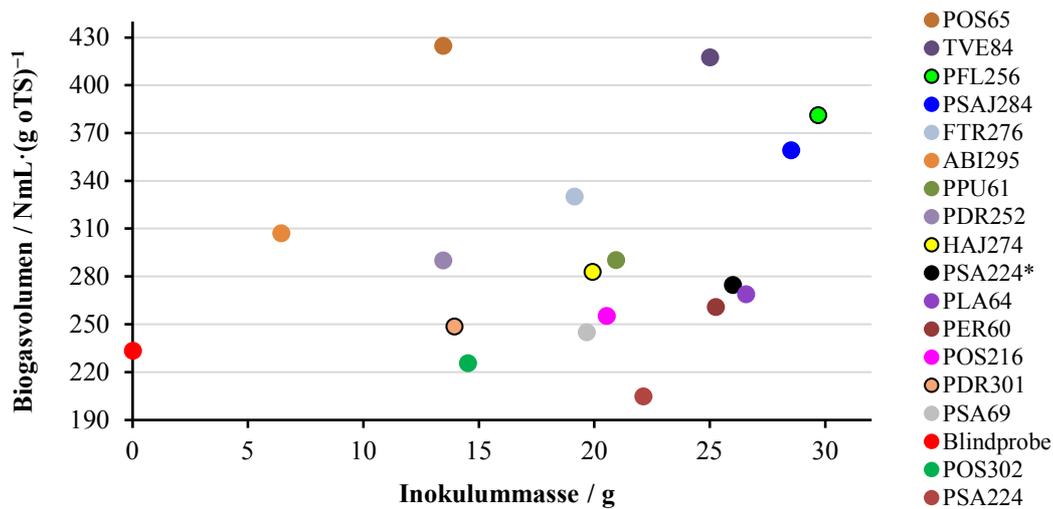


Abbildung 39: Auftragung der Inokulummasse gegen die Biogasausbeute (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 28) von submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen verschiedener Basidiomyceten. Die Datenreihen wurden in der Legende nach der Höhe der Biogas-Endwerte sortiert. Der Basidiomycet PSA224 wurde zwei Mal kultiviert (die zweite Kultivierung wurde mit einem Stern \* markiert). Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Gärrest-Suspension verwendet.

### 3.3.2 Diskussion

#### pH-Werte

Der zeitliche Verlauf der pH-Werte der Submerskulturen zeigte bei der doppelten Kultivierung desselben Stammes in zwei verschiedenen Gefäßen A und B (s. Kultivierungsschema in Abbildung 28) in den meisten Fällen ähnliche, wenn nicht sogar deckungsgleiche Kurvenverläufe. Abweichungen zwischen A und B lagen meist im Bereich von ca. 0,2 pH-Einheiten. Auffällig ist, dass lediglich bei PER60 die pH-Differenz zwischen den doppelten Kultivierungsansätzen (A und B) mit fast drei pH-Einheiten sehr hoch ist (Abbildung 29). Für dieses Ergebnis konnte keine einfache Erklärung gefunden werden, da das Inokulum aus derselben Vorkultur stammte. Dieses wurde vor dem Animpfen homogenisiert und für jeden Stamm wurde in die Kolben A und B dieselbe Inokulummasse überführt. Daher wäre bei allen hier getesteten Basidiomyceten lediglich eine geringe pH-Differenz bei dieser doppelten Kultivierung zu erwarten.

Bei der Betrachtung der pH-Zeit-Profile von TVE84 und PSAJ284 fällt auf, dass der pH-Wert auf einen Bereich zwischen 8 und 9 anstieg. Im Falle von PFL256 wurden nach 14 Tagen pH-Werte zwischen 8,7 und 9,6 beobachtet, während bei POS65 und PSA69 nach derselben Zeit ein saures Milieu im Bereich von 5,5-6,9 erreicht wurde.

Grundsätzlich ist für eine Maximierung der Biogasausbeute ein maximaler Ligninabbau nötig, welcher auf enzymatischem Wege wiederum nur im sauren Milieu erfolgen kann, da die

pH-Optima ligninolytischer Enzyme im sauren Bereich liegen. So haben Laccasen aus Basidiomyceten pH-Optima von 3,5-6,0 (El-Batal *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2005; Marques de Souza & Peralta, 2003; More *et al.*, 2011; Zucca *et al.*, 2011). Manganperoxidasen aus Basidiomyceten weisen – wie auch Laccasen – pH-Optima im sauren Bereich von ebenfalls 3,5-6,0 (Kong *et al.*, 2016; Perie *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2005; Ürek & Pazarlioğlu, 2004) auf. Je nach Stamm hat die entsprechende Peroxidase ab einem pH-Wert von 7,0-8,0 (gemäß der hier zitierten Literaturquellen) weniger als 10 % Restaktivität. In Anbetracht dieser Umstände ist zu erwarten, dass ein rein ligninabbau-basierter Biogasausbeutezuwachs nur möglich ist, wenn der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung zeitlich überwiegend im sauren Bereich liegt. Dies war – wie in Abbildung 29 zu sehen – nur bei wenigen Stämmen (PER60, POS65 und PSA69) der Fall.

#### Aktivitäten von Oxidoreduktasen

Die Laccaseaktivitäten zu Tag 0 sind in allen Hauptkulturen ebenfalls null (Abbildung 30). Nach wenigen Tagen im Verlauf der Kultivierung produzierten die meisten Pilze Laccasen, wobei die Höhe dieser Laccaseaktivitäten von Stamm zu Stamm unterschiedlich ausfiel. Die höchsten beobachteten Aktivitäten in dieser Kultivierung waren die von PSA224 mit bis zu 4000 U/L. Moderat hohe Aktivitäten wurden in den Kulturüberständen von PSAJ284 und PPU61 mit 1500 U/L bzw. 1000 U/L beobachtet. Dagegen wurden relativ niedrige Laccaseaktivitäten im Falle von TVE84 mit 250 U/L festgestellt, während im Falle von PFL256 die Aktivitäten kaum messbar waren.

Bezüglich der Untersuchung der Reproduzierbarkeit (Kultivierung jedes Stammes in Kolben A und B, s. Abbildung 28) zeigten sich in den meisten Fällen ähnliche Verläufe: So deuten sich z.B. bei POS65 und PSA69 nahezu identische Kurvenverläufe der Laccaseaktivitäten für die jeweilige Doppelbestimmung an, während z.B. bei PPU61 und PER60 zwischen A und B insbesondere am 17. Kultivierungstag größere Unterschiede von jeweils ca. 400 U/L bzw. 1000 U/L festgestellt wurden.

Im Falle von PSA224 wurde außerdem eine andere Art der Reproduzierbarkeit untersucht. Dieser Stamm wurde zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten (im Abstand von ca. zehn Wochen) kultiviert und zur Unterscheidung als „PSA224“ und „PSA224\*“ gekennzeichnet. Bei PSA224 zeigten sich wesentlich größere Laccaseaktivitäten als bei PSA224\*, der zehn Wochen nach

PSA224 kultiviert wurde. Dagegen wurden innerhalb der A/B-Kulturen sowohl bei PSA224 als auch bei PSA224\* reproduzierbare Laccaseaktivitäten festgestellt.

Hinsichtlich der kumulierten normierten Laccaseaktivitäten<sup>8</sup> (Abbildung 31) wurden im Falle von ABI295 die größten Aktivitäten gemessen. Dennoch offenbart das Gesamtprofil, dass (mit Ausnahme von ABI295) die Stämme der Gattung *Pleurotus* die insgesamt größten Laccaseaktivitäten gezeigt haben.

Es wurden folgende Unterschiede hinsichtlich der Laccaseaktivitäten zwischen den jeweiligen Stämmen, die zur gleichen Spezies gehören, festgestellt: Während z.B. im Falle von *Pleurotus ostreatus* die Stämme POS65 und POS216 kumulierte Laccaseaktivitäten von ca. 200 U/g bzw. ca. 800 U/g gezeigt haben, wurden in den Kulturüberständen von POS302 keine Aktivitäten festgestellt. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei *Pleurotus sapidus* gemacht, da die kumulierten normierten Laccaseaktivitäten von PSA224 mit ca. 1000 U/g deutlich über denen von PSA69 mit ca. 700 U/g lagen. Die spätere Kultivierung des Stammes PSA224, der nach zehn Wochen erneut kultiviert wurde (PSA224\*) zeigte ca. 3-fach geringere Aktivitäten (370 U/g).

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Literaturwerten zu ermöglichen, muss sichergestellt sein, dass die Aktivität jeweils auf die Masse des eingesetzten Substrats bezogen wird. Am Beispiel von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) mit Laccaseaktivitäten bis zu 500 U/L am 10. Kultivierungstag (Abbildung 30) entspricht dies bei Multiplikation mit dem Kulturvolumen von 0,25 L einer Aktivität von 125 U. Alle Kulturen enthielten 20 g Trockenmasse des Weizenstrohgärrestes. Dies führt zu einer substratbezogenen Laccaseaktivität von 6,25 U/gTS. Dieser Wert kann nun mit den Literaturdaten verglichen werden.

In der Literatur wurden in submerser Kulturführung mit einem Gärrest mit dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* Laccaseaktivitäten von 124 IU/gTS (IU engl. *international units*) erzielt (Musatti *et al.*, 2017). Damit ist die in der Literatur angegebene Laccaseaktivität um einen Faktor von fast 20 höher. Allerdings handelt es sich hierbei um einen autoklavierten Gärrest, der aus Rindergülle (27 %), Käsemolke (15 %), Geflügelmist (23 %), Oliventrester (2 %) und Maissilage

---

<sup>8</sup> Die Definition und die Gründe für die Berechnung der kumulierten normierten Laccaseaktivität wurden auf S. 52 erklärt.

(33 %) bestand. Zudem wurde der pH-Wert der Kultur vor dem Animpfen mit Basidiomyceten auf 6,0 eingestellt, wohingegen in der hier vorliegenden Arbeit mit dem nativen pH-Wert des Weizenstrohgärrestes gearbeitet wurde. Insofern ist dieser Vergleich zwischen den hier erzielten Ergebnissen und den Literaturwerten nur bedingt möglich.

In keiner der Kulturen dieses Experiments wurden Aktivitäten von Peroxidasen festgestellt. Eine mögliche Begründung dafür wurde bereits in einem zuvor durchgeführten Experiment (Abschnitt 3.2.2.2) genannt, in dem Peroxidaseaktivitäten in submersen Kulturen mit 0,11 %, 0,53 % und 2,63 % Weizenstrohgärrest-Trockenmasse (0,5 %, 2,5 % und 12,5 % Feuchtmasse) gemessen wurden. Dabei wurden die die höchsten Peroxidaseaktivitäten im Fall der mittleren Gärrestkonzentration von 0,53 % Trockenmasse beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurde in diesem Experiment mit einer deutlich höheren Konzentration von 8 % Trockenmasse<sup>9</sup> des Weizenstrohgärrestes gearbeitet. Angesichts der fehlenden Peroxidaseaktivitäten deutet es sich an, dass die verwendeten Basidiomyceten lediglich in einem bestimmten Bereich der Weizenstrohgärrest-Konzentration Peroxidasen sekretieren. Da die Sekretion von Peroxidasen lediglich im Bereich von 0,53 % und 2,63 %, nicht jedoch bei 8 % Trockenmasse des Weizenstrohgärrestes beobachtet wurde, deutet es sich an, dass Bestandteile des Gärrestes auf Peroxidasen inhibierend oder auf den Pilz selbst sogar toxisch wirken.

### Cellulaseaktivitäten

Aus Abbildung 32 geht bereits optisch hervor, dass keine Cellulaseaktivitäten vorhanden waren, da in keinem der Kulturüberstände nach Derivatisierung mit dem DNSA-Reagenz die Rotfärbung auftrat. Die Positivkontrolle mit kommerzieller „Cellulase aus *Aspergillus niger*“ zeigte dagegen eine positive Reaktion an, was zugleich die hier angewendete Durchführung des Assays validiert.

Im Sinne der Biogasmaximierung sind ausbleibende Cellulaseaktivitäten als positiv zu bewerten, da die erwartete Biogasausbeute umso größer ausfällt, je geringer der Abbau der Cellulose des Gärrestes während der Kultivierung war. Dennoch stellt sich die Frage für diese Ursache. Es wurde untersucht, ob möglicherweise wasserlösliche Bestandteile des Gärrestes eine auf Cellulasen inhibierende Wirkung haben. Dazu wurden gleiche Einwaagen des kommerziellen Cellulase-

---

<sup>9</sup> Die Gründe für die Verwendung von 8 % Trockenmasse des Weizenstrohgärrestes in submersen Kulturen wurden in Abschnitt 2.3.5 erklärt.

Enzyms in dest. Wasser und in einem Kulturüberstand einer autoklavierten Weizenstrohgärrest-Suspension gelöst. Anschließend wurde kristalline Cellulose als Substrat zugegeben und der Assay nach dem in 2.5.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Als Ergebnis wurde kein signifikanter Unterschied der Enzymaktivitäten festgestellt. Unabhängig davon, ob das kommerzielle Enzym in Wasser oder im Überstand der Gärrestbrühe gelöst wurde, wurde dieselbe Enzymaktivität festgestellt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass wasserlösliche Bestandteile des Weizenstrohgärrestes keinen Einfluss auf die Aktivität der hier verwendeten Cellulase haben. Daraus wurde wiederum geschlussfolgert, dass keine Inhibierung von basidiomycetischen Cellulasen durch den in den Kulturen eingesetzten Weizenstrohgärrest stattfand (sofern eine Sekretion dieser Enzyme in die submersen Gärrestkulturen überhaupt erfolgte).

Anderweitige Literatur von gemessenen Cellulaseaktivitäten in Kulturen, in denen Basidiomyceten auf Gärresten kultiviert wurden, gibt es nach aktuellem Kenntnisstand nicht. Dass Weißfäulepilze in Gegenwart von lignocellulosehaltigem Material grundsätzlich Cellulasen bilden können, findet sich in zahlreichen Literaturstellen (Elisashvili *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2008; Membrillo *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011), wobei hier allerdings keine vergorenen Substrate verwendet wurden.

Als eine mögliche Ursache für das Fehlen von Cellulaseaktivitäten in den Gärrest-Suspensionen kann die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass es sich beim Weizenstrohgärrest um ein bereits fermentiertes Produkt handelt, das gegenüber dem nicht-fermentierten Weizenstroh einen geringeren Celluloseanteil enthält, sodass eine geringere Induktion von Cellulasen erfolgt. Ebenfalls ist es denkbar, dass – wie bereits erwähnt – der Gärrest oberhalb einer bestimmten Konzentration auf den Pilz toxisch wirkt, sodass die Produktion von Cellulasen vermutlich erschwert wird.

### Gesamtphenolgehalt

Aus den in Abbildung 33 gezeigten Ergebnissen ist ersichtlich, dass bereits der Gesamtphenolgehalt des Blindproben-Kulturüberstands mit 90-120 mg/L GAE<sup>10</sup> relativ hoch ist. Die Kulturüberstände von PLA64, TVE84, PFL256 und FTR276 wiesen mit 90-160 mg/L GAE vergleichbare

---

<sup>10</sup> GAE = Gallussäureequivalente. Diese Konzentration entspricht (wie in Abschnitt 2.6 beschrieben) einer Quantifizierung phenolischer Substanzen durch eine indirekte Kalibration gegen Gallussäure als Referenz.

Gesamtphenolgehalte auf, während die Kulturüberstände von PER60, POS65 und PSA69 mit 35-70 mg/L deutlich niedrigere Gesamtphenolgehalte aufwiesen. Die Ursachen für diese Unterschiede werden in Abschnitt „Untersuchung möglicher Zusammenhänge der gemessenen Parameter untereinander“ (S. 66) diskutiert.

Des Weiteren ist der schwankende Gesamtphenolgehalt der Blindprobe in Abbildung 33 auffällig. Es wäre zu erwarten gewesen, dass dieser Wert sich über die Zeit nicht ändert, da die Blindprobe einerseits autoklaviert und andererseits nicht angeimpft wurde, sodass keine Aktivität von Mikroorganismen zu erwarten war, die zu einem sich zeitlich ändernden Gesamtphenolgehalt führen könnte. Das Auftreten dieser Schwankung kann z.B. auf Probeninhomogenität zurückgeführt werden, da es sich hierbei stets um Suspensionen von Gärrest in Wasser handelt. Dies legt nahe, dass solche Schwankungen auch bei den beimpften Kulturen auftreten. Dies erschwert zum Teil die Unterscheidung, ob die jeweiligen Gesamtphenolgehalt-Mittelwerte beimpfter Kulturen (die zu verschiedenen Tagen gemessen wurden) tatsächlich auf eine Gesamtphenolgehaltänderung oder lediglich auf Probeninhomogenitäten zurückzuführen sind.

Abschließend lässt sich an dieser Stelle anmerken, dass der Folin-Ciocalteu-Assay in den hier vermessenen Weizenstrohgärrest-Suspensionen lediglich zur Messung großer Unterschiede (ca. größer als 50 mg/L) von Gesamtphenolgehalten verschiedener Pilz/Gärrest-Kulturen tauglich ist.

### Biogasausbeuten

Die Gesamtheit der Datenmengen in Abbildung 34 und in Abbildung 35 zeigt plausible Kurvenverläufe. In der emersen Kultivierung wurde bei vier von fünf verwendeten Stämmen (eine Vorauswahl dieser Stämme erfolgte in Abschnitt 3.2.1) eine höhere Biogasausbeute im Vergleich zur Blindprobe gemessen. In submerser Kultivierung wurden bei 15 von 17 getesteten Kulturen – verglichen zur Blindprobe – erhöhte Biogasausbeuten festgestellt. Insgesamt scheint damit an dieser Stelle die Realisierbarkeit des in der Einleitung beschriebenen Arbeitsziels, durch Weißfäulepilze die Biogasausbeute von Weizenstrohgärrest zu steigern, als bestätigt.

Der Vergleich der Biogas-Endwerte in beiden Kultivierungsarten (emers: Abbildung 34, submers: Abbildung 35) zeigt, dass in emerser Kulturführung Werte im Bereich von ca. 200-350 NmL/(goTS) erreicht wurden, während in der submersen Kulturführung ca. 200-424 NmL/(goTS) resultierten. Damit hat sich in diesem Versuch die submerse Kulturführung als aussichtsreicher erwiesen. Es wurde an dieser Stelle postuliert, dass die breite Auffächerung der Biogasergebnisse im genannten Bereich (200-424 NmL/(goTS) in Abbildung 35) auf stamm-spezifische Unterschiede zurückzuführen ist.

Abgesehen von den Endwerten der Biogasausbeuten gibt es vereinzelt auch Unterschiede im Verlauf der Kurven. In der emersen Kultivierung haben die Biogaskurven der Blindprobe und aller kultivierten Stämme (abgesehen von PER60) einen sigmoidalen Verlauf, was für das Profil von Biogaskurven typisch ist (vgl. Abbildung 11). Eine Abweichung von diesem Regelfall zeigt die Emerskultur von PER60 (Abbildung 34): Bis zum 16. Messtag ist zunächst eine erhöhte Biogasproduktionsrate festzustellen. Zwischen dem 16. und dem finalen Messtag ist die Biogasausbeute dieser Kultur im Vergleich zur Blindprobe erniedrigt. Eine Erklärung dafür ist, dass dieser Stamm das Lignin partiell aufgeschlossen hat, was die erhöhte Produktionsrate von Biogas zu Beginn des GB21-Versuchs erklärt. Infolgedessen hat der Pilz einen Teil der freigelegten Kohlenhydrate als Nährstoffquelle genutzt, was insgesamt die – verglichen zur Blindprobe – geringere Biogasausbeute gegen Ende der Messung erklärt. Wegen dieses Kurvenverlaufs ist es wahrscheinlich, dass das Lignin durch PER60 schneller abgebaut wurde als durch die anderen verwendeten Stämme.

Ähnliche Kurvenprofile wurden in der submersen Kultivierung beobachtet, bei der die meisten Kurvenverläufe ebenfalls S-förmig waren (Abbildung 35). Abweichungen davon finden sich bei PSA224 und POS302. Für PSA224 lässt sich hierbei der gleiche Erklärungsansatz wie für PER60 (o. g.) bei der emersen Kultivierung vorbringen.

Ebenso wie Unterschiede hinsichtlich der Laccaseaktivitäten desselben Stammes von *Pleurotus sapidus* 224 festgestellt wurden, der zu zwei verschiedenen Zeitpunkten kultiviert wurde (zeitversetztes Kultivieren dieses Stammes um zehn Wochen) (Abbildung 30), gab es deutliche Unterschiede zwischen den Biogasergebnissen von PSA224 und PSA224\*. Der zum früheren Zeitpunkt kultivierte Stamm PSA224 zeigte in diesem Experiment mit 205 NmL/(goTS) die geringste Biogasausbeute, die um 28 NmL/(goTS) unterhalb der der Blindprobe lag. Derselbe zum späteren Zeitpunkt kultivierte Stamm PSA224\* zeigte dagegen mit 275 NmL/(goTS) eine moderate Biogasausbeute, die um 42 NmL/(goTS) höher als die der Blindprobe ausfiel. Dies beweist, dass Laccaseaktivitätsprofile von Pilzstämmen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten angeimpft wurden, sich voneinander signifikant unterscheiden können. Dagegen zeigt sich eine bessere Reproduzierbarkeit der Biogasausbeute, wenn das Inokulum derselben Vorkultur genutzt wird, um parallel mehrere Hauptkulturen anzuimpfen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen sagen, dass in diesem Experiment die Realisierbarkeit des Arbeitsziels bestätigt wurde: Die Nachbehandlung des Gärrestes hat in submersen Kultivierungen im Falle von 15 von 17 getesteten Stämmen und in emersen Kultivierungen im

Fälle von vier von fünf getesteten Stämmen zu gesteigerten Biogasausbeuten geführt. In beiden Kultivierungsarten hat POS65 den größten Biogaszuwachs erbracht. In submersen Kulturführungen wurden insgesamt höhere Biogasausbeuten erzielt als in emersen.

#### Untersuchung möglicher Zusammenhänge der gemessenen Parameter untereinander

Es wurde untersucht, ob es zwischen der Biogasausbeute und anderen Messgrößen (z.B. Enzymaktivitäten) Zusammenhänge gibt. Sollte solch ein Zusammenhang gefunden werden, ließen sich Biogasausbeuten chemisch vorhersagen. Dies wäre im Sinne des Arbeitsziels eine Zeitsparmaßnahme, da GB21-Versuche mit mindestens 26 Tagen Laufzeit langwierig sind.

Aus Abbildung 36 ist ersichtlich, dass es zwischen der kumulierten normierten Laccaseaktivität und der Biogasausbeute keinen Zusammenhang gibt. Ursächlich dafür ist vermutlich die Tatsache, dass am Ligninabbau nicht nur Laccasen allein beteiligt sind, sondern auch anderen Enzyme wie z.B. Manganperoxidasen und Ligninperoxidasen. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist es nicht möglich, dass Laccasen in Abwesenheit von Peroxidasen Lignin vollständig abbauen können (dies wird im Fazit in Abschnitt 4 detailliert diskutiert).

Die Überlegung, den Gesamtphenolgehalt als Maß für die Ligninabbauleistung heranzuziehen, rührte daher, dass bei fortschreitender Lignin-Depolymerisation die Konzentration kleinerer phenolischer Mono- und Oligomere ansteigen sollte. Daher wurde postuliert, dass die Biogasausbeute mit dem Gesamtphenolgehalt im Zusammenhang steht.

Aus Abbildung 37 geht hervor, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Gesamtphenolgehalt und der Biogasausbeute gibt, da dieses Diagramm lediglich streuende Daten aufzeigt. Ein möglicher Grund dafür wird im Folgenden diskutiert.

Bereits bei der experimentellen Durchführung war auffällig, dass Kulturen mit niedrigen und ausbleibenden Laccaseaktivitäten hohe Gesamtphenolgehalte aufgezeigt haben. Dagegen wurden stets bei Kulturen mit hohen Laccaseaktivitäten niedrige Gesamtphenolgehalte gemessen. Dieser Zusammenhang wurde eher zufällig festgestellt. Aus Abbildung 38 ist ersichtlich, dass bei kumulierten normierten Laccaseaktivitäten unterhalb von ca. 130 U/g der Gesamtphenolgehalt hoch (wie im Fall der Blindprobe, TVE84 und PFL256) und bei Aktivitäten von oberhalb 300 U/g niedrig ausfiel (wie im Fall von PER60, POS65, PSA69 und PSAJ284). Es wäre denkbar, diese Korrelation in grober Näherung durch eine hyperbolische Regression mathematisch zu beschreiben (s. Abbildung 38). Dadurch würde allerdings die Tatsache vernachlässigt werden, dass z.B.

Laccasen aus unterschiedlichen Stämmen unterschiedliche Ligninabbauleistungen bei gleicher Aktivität aufweisen könnten.

Dass es überhaupt einen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern gibt, kann dadurch erklärt werden, dass im Zuge des laccase-basierten partiellen Ligninabbaus Laccasen auch die Abbauprodukte selbst weiterabbauen. Hierbei handelt es sich um aromatische Oligomere, die ebenfalls von Laccasen als Substrate akzeptiert werden. Beide Vorgänge sind schematisch in Abbildung 40 zusammengefasst.

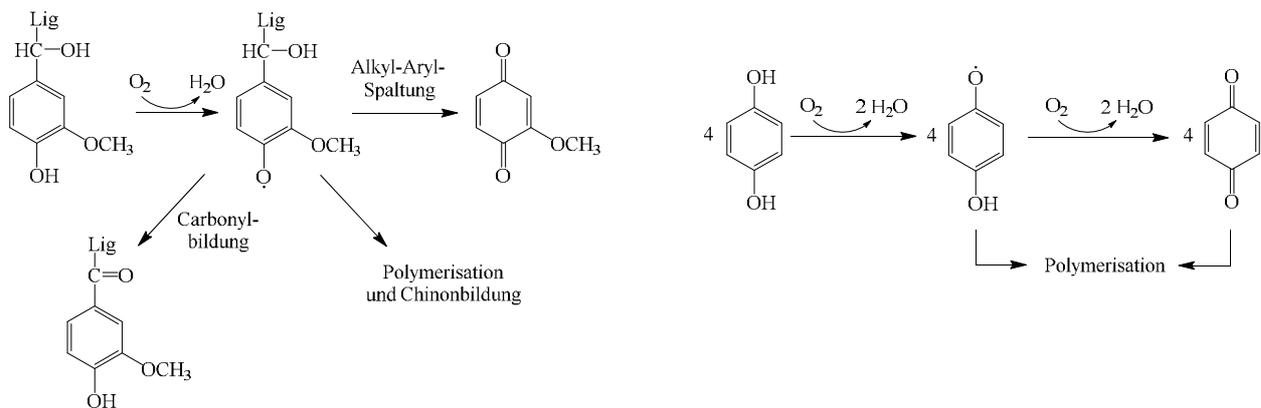


Abbildung 40: Vorgeschlagener Mechanismus für die Oxidation phenolischer Untereinheiten des Lignins (Lig) durch Laccasen (links), abgeändert nach (Desai & Nityanand, 2011). Schema der Oxidation von Hydrochinon (potentielles Abbauprodukt von Lignin) zu *o*-Benzochinon durch Laccasen (rechts), abgeändert nach (Karigar & Rao, 2011).

Bei der Oxidation phenolischer OH-Gruppen durch Laccasen entstehen die entsprechenden Chinone. Chinone sind wiederum mit Hilfe des Folin-Ciocalteu-Reagenzes nicht nachweisbar, da sie keine phenolisch gebundenen OH-Gruppen haben. Insgesamt lässt sich der hier vorliegende Sachverhalt so beschreiben, dass phenolische Substanzen (aus dem Weizenstrohgärrest durch Laccasen) erzeugt und sogleich wieder (ebenfalls durch Laccasen) abgebaut werden. Somit erklärt dies auch das Fehlen eines vermuteten Zusammenhangs zwischen dem Gesamtphenolgehalt und der Biogasausbeute (Abbildung 37).

Hinsichtlich der Untersuchung einer Korrelation zwischen der Inokulummasse und der Biogasausbeute (Abbildung 39) wurde ebenfalls kein mathematischer Zusammenhang festgestellt. Dies legt nahe, dass die Biogasausbeute einer Kultur die Summe des Zusammenspiels vieler Parameter ist und nicht durch die bloße Menge des Inokulums bestimmt wird.

Inwieweit die Biogasausbeute durch die bloße Animpfung des Gärrestes mit Pilzpellet beeinflusst wird, wurde im Verlauf dieser Arbeit in einem späteren Experiment in Abschnitt 3.14 untersucht.

### 3.3.3 Bewertung der Ergebnisse

Insgesamt wurde in diesem Experiment die Realisierbarkeit des Arbeitsziels bestätigt, da die Nachbehandlung des Weizenstrohgärrestes mit Weißfäulepilzen im Falle der meisten Stämme zu einer erhöhten Biogasausbeute geführt hat: So wurden in submersen Kultivierungen bei 15 von 17 Stämmen und in emersen Kultivierungen bei vier von fünf Stämmen höhere Biogasausbeuten als in der entsprechenden Weizenstrohgärrest-Blindprobe erzielt.

Allerdings konnte in dieser Versuchsreihe keine Ursache für diesen Erfolg gefunden werden, da keiner der untersuchten Parameter mit der Biogasausbeute korrelierte. Zudem wurden in den Kulturen der meisten Basidiomyceten Laccaseaktivitäten, jedoch in keiner Peroxidaseaktivitäten festgestellt. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass für den Abbau von Lignin die Beteiligung von Peroxidasen unentbehrlich ist (Lankinen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Der Ligninabbau ist wiederum für eine Biogasausbeute-Steigerung notwendig.

In den zukünftigen Versuchen werden lediglich submerse anstelle von emersen Kultivierungen durchgeführt, da in submerser Kulturführung höhere Biogasausbeuten erzielt wurden. Die Auswahl der Basidiomyceten richtete sich in zukünftigen Experimenten vornehmlich auf diejenigen Stämme, die die höchsten Biogasausbeuten hervorgebracht haben (Abbildung 35). Dies waren überwiegend Stämme der Gattung *Pleurotus* sowie der Stamm *Trametes versicolor* 84.

Zudem werden aus praktischen Gründen für zukünftige Kultivierungen lediglich Stämme verwendet, die in der Vorkultur pro Volumeneinheit des SNL-Mediums eine hinreichend hohe Biomasse gebildet haben. Dies trifft auf nahezu alle verwendeten Basidiomyceten zu (15-30 g Biofeuchtmasse nach ca. 7 Tagen in SNL-Vorkulturen in 250 mL Medium bei 24 °C), bis auf ABI295, bei dem unter diesen Bedingungen lediglich 6 g Biofeuchtmasse erhalten wurden. Die in diesem Experiment verwendeten Inokulummassen wurden im Anhang in Tabelle 17 aufgelistet.

### 3.4 Ermittlung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses und Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Ergosterolgehalt und Biogasausbeute

Im Experiment des vorherigen Abschnitts wurde gezeigt, dass das Nachbehandeln des Weizenstrohgärrestes mit den meisten verwendeten Weißfäulepilzen zu erhöhten Biogasausbeuten führte. Allerdings konnte nicht geklärt werden, worauf dieser Biogasausbeuteanstieg zurückzuführen war. Das Ziel des in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchs war es, einerseits mehrere definierte Inokulummassen zur Ermittlung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses (im Hinblick auf die Biogasausbeutemaximierung) zu testen. Andererseits sollte das Wachstumsverhalten der Basidiomyceten in den Kulturen untersucht werden. Dies dient der Beantwortung der Fragestellung, ob die Zunahme der Biogasausbeute...

- „nur“ auf das Wachstum des Pilzes in submerser Kultur (und infolgedessen auf die Zunahme der Pilzbiomasse) zurückzuführen ist. Dabei wird angenommen, dass methanogene Mikroorganismen (die im Impfschlamm enthalten sind, der zur Biogasmessung verwendet wird) die Pilzbiomasse leichter zu Biogas umsetzen als den Gärrest selbst oder
- neben dem erstgenannten Punkt auch zusätzlich auf unterschiedliche Ligninabbauleistungen der jeweiligen Stämme zurückzuführen ist.

Trifft die erstere Hypothese zu, so müsste der Pilzbiomasseanstieg näherungsweise proportional zum Biogasausbeuteanstieg sein. Wird dagegen z.B. ein überproportionaler Anstieg beobachtet, hätte in diesem Fall die zweite Hypothese eine Teilkorrelation. Bereits das Zutreffen von einer der beiden Hypothesen würde einen Erfolg hinsichtlich der Biogasausbeutemaximierung darstellen.

Eine schnelle und direkte Bestimmung der Pilzbiomasse wie z.B. durch Gravimetrie erweist sich grundsätzlich als schwierig, da der Pilz in Substrate einwächst, sodass in der Regel keine mechanische Trennung erfolgen kann (Davis & Lamar, 1992; Raimbault, 1998; Steudler & Bley, 2015). Es galt daher, einen indirekten Parameter für die Pilzbiomasse zu bestimmen, um diesen anschließend mit der Biogasausbeute zu korrelieren. Als verlässlicher Parameter zur indirekten Pilzbiomassebestimmung wurde in dieser Versuchsreihe Ergosterol herangezogen, das ein Bestandteil der pilzlichen Zellmembran ist (Ruzicka *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 1979). Die Massenanteile von

Ergosterol in höheren Pflanzen sind dagegen vernachlässigbar (Djajakirana *et al.*, 1996; Parsi & Gorecki, 2006; Perkowski *et al.*, 2008), was in diesem Zusammenhang insofern relevant ist, als dass hierbei Weizenstrohgärrest-Kulturen analysiert wurden und deshalb keine nennenswerten Ergosterolmengen aus der Weizenpflanze selbst zu erwarten sind. Ursprünglich wurde die Quantifizierung von Ergosterol zur Bestimmung des Ausmaßes für den Befall von Getreidepflanzen durch pathogene Pilze angewendet (Seitz *et al.*, 1977). In der Literatur lieferte die Auftragung pilzlicher Biofeuchtmassen gegen die Ergosterolgehalte in linearer Regression ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,98$  (Stuedler & Bley, 2015). Daher kann der Ergosterolgehalt als ein verlässlicher Parameter für das Pilzwachstum erachtet werden. In den submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen kann nur der Gärrest selbst dem Pilz als Nahrungsquelle dienen. Das Pilzwachstum, welches gleichbedeutend mit der zeitlichen Zunahme des Ergosterolgehalts ist, kann daher nur das Resultat des Abbaus von Gärrestbestandteilen sein. Wenn, wie bereits erwähnt, die Pilzbiomasse leichter als der Gärrest zu Biogas umgewandelt werden kann, könnte der Ergosterolgehalt einer Kultur näherungsweise mit der Biogasausbeute korrelieren.

Im Experiment dieses Abschnitts wurden drei ausgewählte Basidiomyceten, die in den vorherigen Gärversuchen die höchste, eine mittlere und die niedrigste Biogasausbeute gezeigt haben (Abbildung 35), verwendet. Dies sind in gleicher Reihenfolge POS65 (424 NmL/(goTS)), PSAJ284 (359 NmL/(goTS)) und PSA224 (205 NmL/(goTS)). Diese drei genannten Basidiomyceten wurden deshalb gewählt, weil wenn sich die Biogasausbeuten in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnissen unterscheiden werden, diese Unterschiede zwischen den drei Stämmen umso größer ausfallen würden als beispielsweise bei drei Stämmen ähnlicher Biogasausbeuten.

Für jeden der drei verwendeten Pilze wurden drei verschiedene Inokulummassen für die autoklavierten Hauptkulturen (121 °C, 20 min) mit 8 % Gärresttrockenmasse verwendet. Es wurden je zwei Kulturreihen angesetzt, wobei eine davon direkt nach der Animpfung geerntet wurde (Tag 0) und die andere nach 21 Tagen. Auf diese Weise ließ sich über die Ergosterolwerte beurteilen, inwieweit sich die Pilzbiomasse nach dreiwöchiger Kultivierungszeit geändert hat. Abbildung 41 zeigt das Kultivierungsschema.

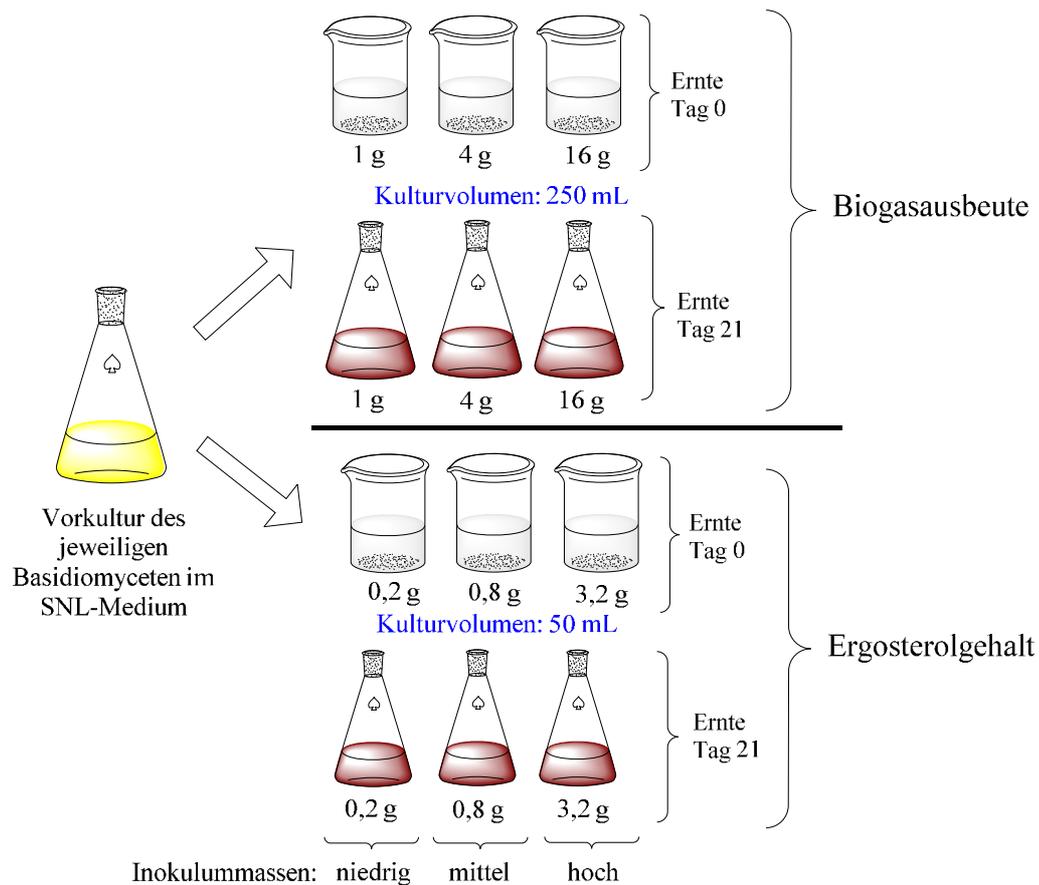


Abbildung 41: Kultivierungsschema der Basidiomyceten POS65, PSA224 und PSAJ284 zur Untersuchung des optimalen Massenverhältnisses von Inokulum zum Gärrest im Hinblick auf eine Maximierung der Biogasausbeute. Die Zahlen in Gramm geben die Inokulum-Biofeuchtmassen des jeweiligen Stammes an und unterscheiden sich jeweils durch den Faktor 4 voneinander (1 : 4 : 16 bzw. 0,2 : 0,8 : 3,2), um eine hinreichend große Spannweite bzgl. des Gärrest/Inokulum-Massenverhältnisses zu untersuchen. Die 250-mL-Kulturen wurden zur Untersuchung der Biogasausbeute herangezogen, während die Parallelkulturen, die zur besseren Handhabbarkeit auf 50 mL herunter dimensioniert wurden, zur Bestimmung des Ergosterolgehalts verwendet wurden. Blindproben (unbeimpfte Gärrest-Suspensionen) wurden in den entsprechend großen Kulturvolumina ebenfalls mitgeführt (hier im Schema nicht gezeigt).

Der jeweilige Basidiomycet (POS65, PSAJ284 und PSA224) wurde zunächst in SNL-Medium 5-7 Tage vorkultiviert und das Pilzpellet anschließend (gemäß der in 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Verfahren) in zwei Hauptkulturreihen von je 250 mL und 50 mL mit autoklaviertem Gärrest in Konzentrationen von 8 % Trockenmasse überimpft. Die dazugehörigen verwendeten Inokulummassen waren in den 50-mL-Kulturen 0,2 g, 0,8 g und 3,2 g und in den 250-mL-Kulturen 1 g, 4 g und 16 g Pilzbiofeuchtmasse.

Für die Bestimmung der Biogasausbeute wurden die 250-mL-Kulturen verwendet. Aufgrund von Kulturinhomogenitäten<sup>11</sup> wäre die Bestimmung des Ergosterolgehalts aus Aliquoten der 250-mL-

<sup>11</sup> Die Inhomogenität der Kulturen konnte bereits anhand der Ergebnisse des Gesamtphenolgehalts in einer autoklavierten Weizenstrohgärrest-Suspension gezeigt werden (s. Abbildung 33).

Kultur (Abbildung 41) nicht repräsentativ für die Probengesamtheit gewesen. Deswegen wurde für die Ergosterolbestimmung eine parallele (in gleicher Weise angesetzte) 50-mL-Gesamtkultur anstelle von Aliquoten bevorzugt. Allerdings liegt der Nachteil in solch einer Vorgehensweise darin, dass der jeweilige Pilz in zwei unterschiedlichen Kolben unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen könnte.

Beide Kulturreihen (250 mL und 50 mL) wurden jeweils doppelt angesetzt, sodass die Ernte zu Tag 0 und zu Tag vorgenommen werden konnte (s. Abbildung 41).

### 3.4.1 Ergebnisse

#### Bestimmung des Ergosterolgehalts

Die Bestimmung des Ergosterolgehalts erfolgte mit Hilfe der Vorschrift aus Abschnitt 2.7. Diese umfasste eine alkalische Verseifung der Gärrestkultur, Extraktion des Ergosterols und anschließend eine Quantifizierung mittels HPLC-DAD.

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse für die drei verwendeten Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Pleurotus sapidus* 224 (PSA224) und *Pleurotus sajor-caju* 284 (PSAJ284).

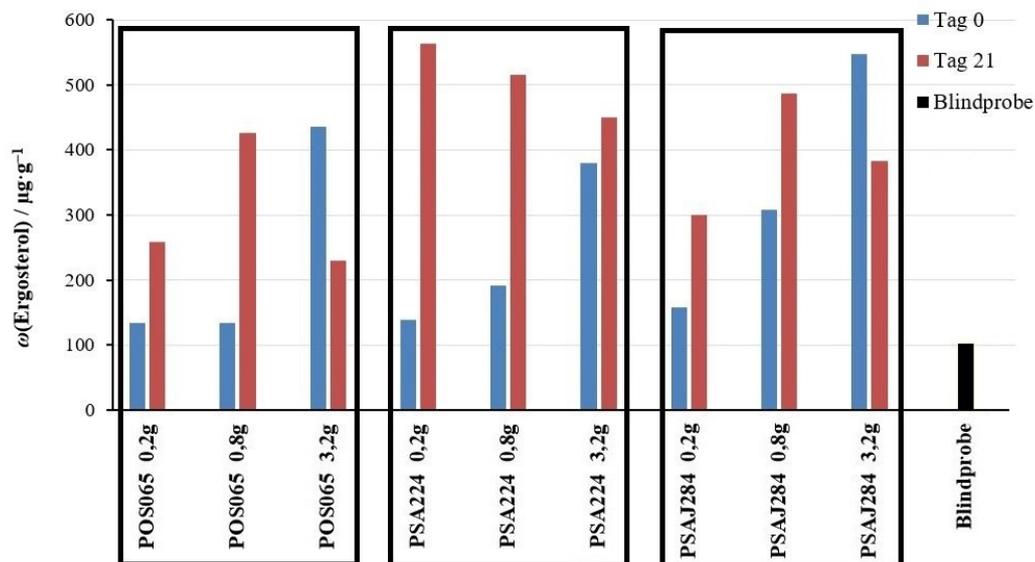


Abbildung 42: Massenanteile von Ergosterol ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g Kulturtrockenmasse) in den 50-mL-Kulturen (Kultivierungsschema gemäß Abbildung 41). Die Zahlen in Gramm auf der x-Achse bezeichnen die Biofeuchtmassen der Inokula. Die drei markierten schwarzen Kästen dienen der Unterscheidung der drei verwendeten Weißfäulepilze POS65, PSA224 und PSAJ284. Die Bestimmung des Ergosterols erfolgte in den Kulturen direkt nach der Animpfung (Tag 0) und nach dreiwöchiger Kultivierungszeit (Tag 21). Da lediglich Einfachbestimmungen durchgeführt wurden, sind keine Fehlerbalken eingezeichnet. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet.

### Ermittlung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses anhand der Biogasdaten

Im Folgenden sind die Biogasergebnisse für die drei verwendeten Basidiomyceten unter Angabe der jeweiligen Inokulummassen aufgeführt.

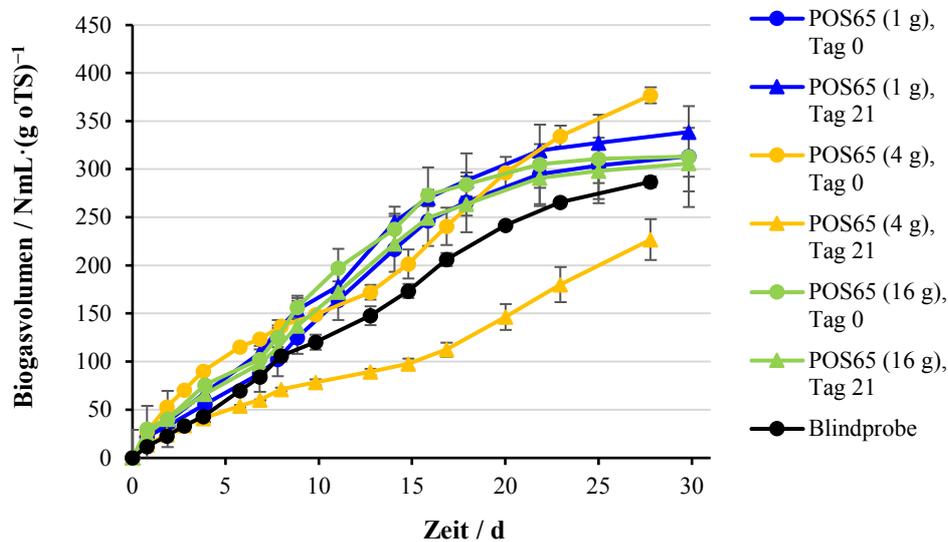


Abbildung 43: Biogasergebnisse der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in Weizenstrohgärrest-Kulturen zur Untersuchung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses im Hinblick auf die Biogasmaximierung (Kultivierungsschema: Abbildung 41). Die Zahlen in Gramm bezeichnen die Inokulummassen und „Tag 0“ bzw. „Tag 21“ den Erntezeitpunkt. Die Blindprobe bezeichnet eine unbeimpfte Gärrest-Suspension.

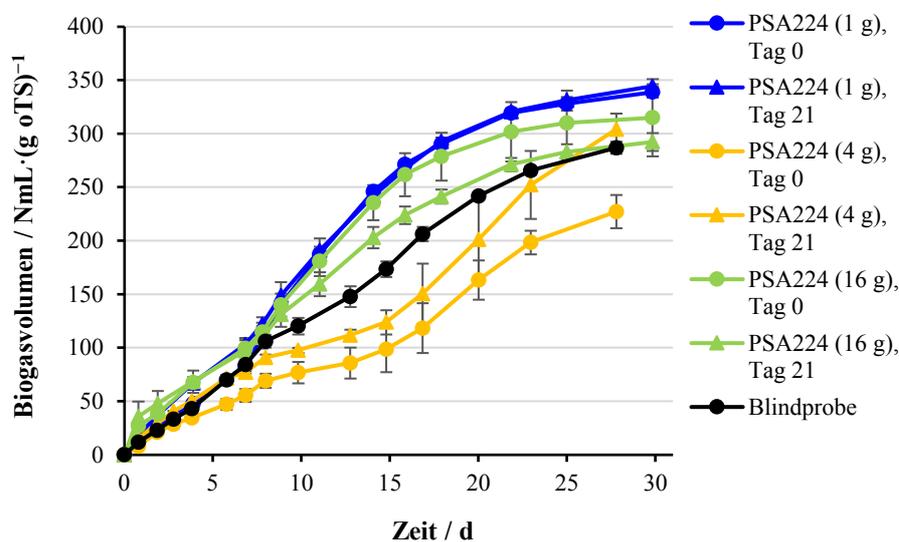


Abbildung 44: Biogasergebnisse der submersen Kultivierung von *Pleurotus sapidus* 224 (PSA224) in Weizenstrohgärrest-Kulturen zur Untersuchung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses im Hinblick auf die Biogasmaximierung (Kultivierungsschema: Abbildung 41). Die Zahlen in Gramm bezeichnen die Inokulummassen und „Tag 0“ bzw. „Tag 21“ den Erntezeitpunkt. Die Blindprobe bezeichnet eine unbeimpfte Gärrest-Suspension.

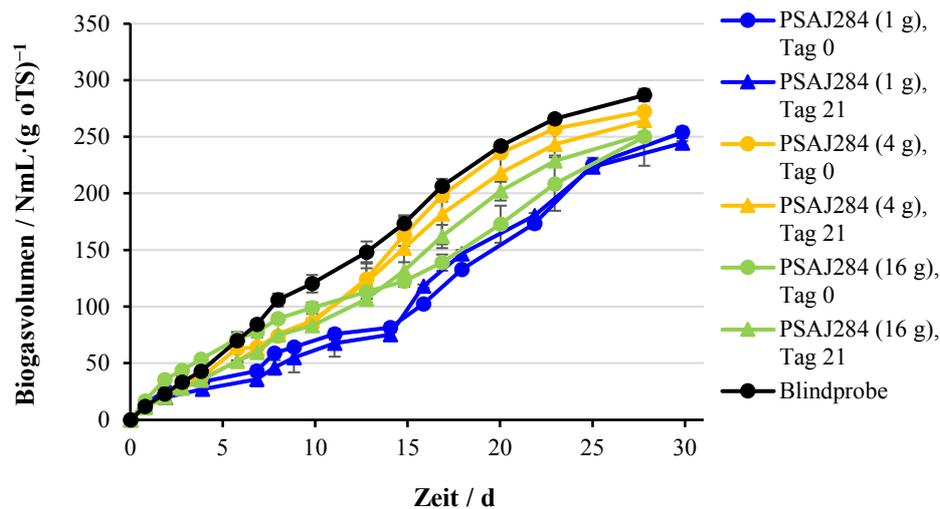


Abbildung 45: Biogasergebnisse der submersen Kultivierung von *Pleurotus sajor-caju* 284 (PSAJ284) in Weizenstrohgärrest-Kulturen zur Untersuchung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses im Hinblick auf die Biogasmaximierung (Kultivierungsschema: Abbildung 41). Die Zahlen in Gramm bezeichnen die Inokulummassen und „Tag 0“ bzw. „Tag 21“ den Erntezeitpunkt. Die Blindprobe bezeichnet eine unbeimpfte Gärrest-Suspension.

### Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den Ergosterolgehalten und den Biogasausbeuten

In den folgenden Diagrammen wurden die Biogas-Endwerte (abgelesen aus den vorherigen drei Abbildungen) gegen die Ergosterolgehalte in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (aus Abbildung 42) für die submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen der drei verwendeten Weißfäulepilze aufgetragen.

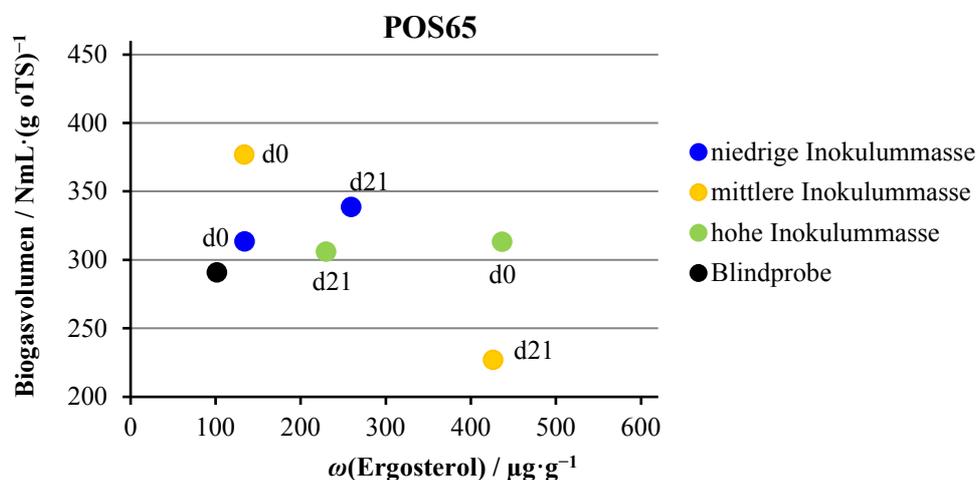


Abbildung 46: Auftragung der Ergosterolgehalte ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g Kultur-trockenmasse) gegen die Biogasausbeute für den Stamm *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen für drei unterschiedliche Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisse (Kultivierungsschema: Abbildung 40). „d0“ und „d21“ bezeichnen die Erntezeitpunkte von null und 21 Tagen. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Gärrest-Suspension verwendet.

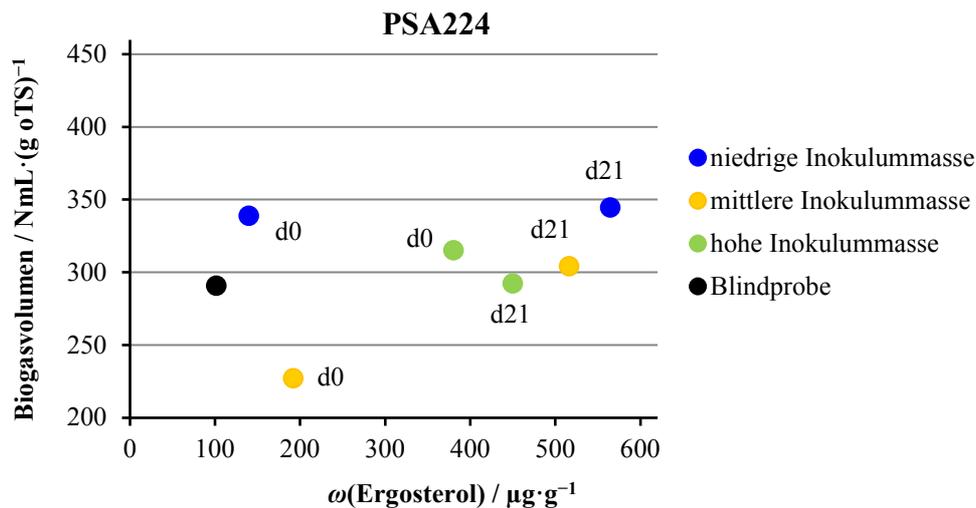


Abbildung 47: Auftragung der Ergosterolgehalte ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g Kultur trockenmasse) gegen die Biogasausbeute für den Stamm *Pleurotus sapidus* 224 (PSA224) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen für drei unterschiedliche Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisse (Kultivierungsschema: Abbildung 40). „d0“ und „d21“ bezeichnen die Erntezeitpunkte von null und 21 Tagen. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Gärrest-Suspension verwendet.

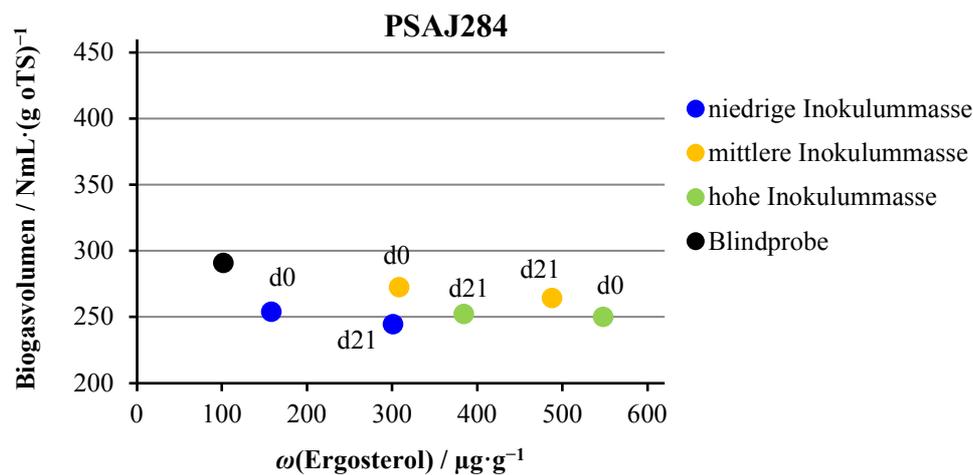


Abbildung 48: Auftragung der Ergosterolgehalte ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g Kultur trockenmasse) gegen die Biogasausbeute für den Stamm *Pleurotus sajor-caju* 284 (PSAJ284) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen für drei unterschiedliche Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisse (Kultivierungsschema: Abbildung 40). „d0“ und „d21“ bezeichnen die Erntezeitpunkte von null und 21 Tagen. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Gärrest-Suspension verwendet.

### 3.4.2 Diskussion

#### Bestimmung des Ergosterolgehalts

Bezüglich der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der drei Stämme hat sich gezeigt, dass in den meisten Fällen erwartungsgemäß der Ergosterolgehalt von Tag 0 zu Tag 21 ansteigt (Abbildung 42), was mit einem Wachstum der Pilze in den Kulturen gleichbedeutend ist. Ausnahmen davon zeigen sich lediglich im Fall von POS65 und PSAJ284 bei den höchsten Inokulummassen. Dieses Ergebnis ist unplausibel, denn der Verlust von Ergosterol wie z.B. in Form von

chemischer oder enzymatischer Zersetzung ist unwahrscheinlich. In der Literatur wird Ergosterol als chemisch stabil erachtet, sodass es auch nach dem Absterben des Pilzes bestehen bleibt (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). Es handelt sich bei Ergosterol um einen Kohlenwasserstoff, der bis auf die OH-Gruppe keine funktionellen Gruppen besitzt und daher keine nennenswerte chemische Reaktivität zeigen sollte. Zwei Möglichkeiten, die zu einem Abbau von Ergosterol führen können, werden im Folgenden kurz diskutiert.

Auf photochemischem Wege ist eine Umwandlung von Ergosterol möglich, wobei bei der Bestrahlung dieser Substanz mit Sonnenlicht Provitamin D<sub>2</sub> entsteht (Holick *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 1988), was chemisch einer electrocyclischen Ringöffnungsreaktion entspricht (Abbildung 49).

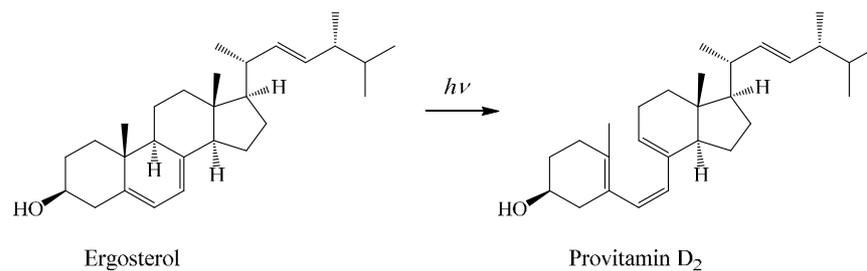


Abbildung 49: Photochemische Umwandlung von Ergosterol zu Provitamin D<sub>2</sub> unter konrotatorischer Ringöffnung.

Ein Ergosterolverlust wie er in Abbildung 42 festgestellt wurde, ist auf photochemischem Wege undenkbar, da die Kulturen einerseits keiner direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren und es sich andererseits bei den Kulturen um braune undurchsichtige Suspensionen handelt, die wegen dieser Eigenfärbung ohnehin den Großteil des Lichts aus der Umgebung absorbieren.

Eine weitere Möglichkeit, die prinzipiell zu einer Verringerung des Ergosterolgehalts führen kann, ist die Transformation durch bestimmte Mikroorganismen wie z.B. Mykobakterien, welche die OH-Gruppe des Ergosterols zum Keton oxidieren und die Seitenkette des D-Rings modifizieren können (Ambrus *et al.*, 1995; Dovbnya *et al.*, 2010). Auch dies scheidet in diesem Fall als Erklärung für die teils unerwarteten Ergebnisse in Abbildung 42 aus, da die Kulturen vor dem Animpfen autoklaviert wurden und somit keine Einflüsse durch fremde Mikroorganismen zu erwarten sind.

Bei den Stämmen PSA224 und PSAJ284 stieg in den „Tag 0“-Proben mit steigenden Inokulummassen der Ergosterolgehalt erwartungsgemäß an. Lediglich bei POS65 wurden beim Vergleich der Inokulummassen von 0,2 g und 0,8 g kein Unterschied festgestellt, d.h. obwohl sich diese Inokulummassen durch den Faktor 4 unterscheiden, sind die dazugehörigen Ergosterolgehalte fast

identisch. Ein Verlust von Ergosterol während der Extraktion ist als Fehlerquelle ebenfalls auszuschließen, da mit einem internen Standard zur Bestimmung der Wiederfindungsrate gearbeitet wurde.

Dass die Blindprobe mit  $101 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  einen – verglichen zu den beimpften Proben – relativ hohen Ergosterolgehalt aufweist, kann z.B. nur darauf zurückzuführen sein, dass der Gärrest in seinem Entstehungsverlauf in Kontakt mit Pilzen gekommen sein muss. Dafür sind z.B. die folgenden Ursachen denkbar:

- Vor dem Durchlaufen der Biogasanlage kann die Weizenpflanze mit typischen Pathogenen von Getreidepflanzen wie z.B. *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Phaeosphaeria nodorum* etc. (Krstanovic *et al.*, 2005; Savary *et al.*, 2012) befallen gewesen sein. Die Präsenz solcher Pathogene würde – im Vergleich mit einer gesunden Pflanze – zu einem erhöhten bzw. überhaupt erst nennenswerten Ergosterolgehalt führen.
- Der verwendete Weizenstrohgärrest stammt von einer Versuchsanlage zur Strohvergärung. Bei der Produktion von Bioethanol wird dem gemahlten Weizenkorn Hefe zugegeben (s. Abschnitt 1.1.2). Nach anaerober Gärung und anschließender Destillation des Bioethanols verbleibt die Hefe in der Schlempe. Die Schlempe wird schließlich mit gehäckseltem Weizenstroh in der Biogasanlage fermentiert, sodass im entstehenden Weizenstrohgärrest hohe Mengen Ergosterol gefunden wurden. Dieser Erklärungsansatz ist wahrscheinlicher als der erstere.

Es bleibt festzuhalten, dass in der Mehrheit der Proben anhand der gestiegenen Ergosterolwerte (von Tag 0 zu Tag 21) die Erwartung bestätigt wurde, dass die Pilze in der Gärrest-Suspension zumindest zu einem gewissen Grad wachstumsfähig sind. Für die Verringerung des Ergosterolgehalts (von Tag 0 zu Tag 21) bei POS65 und PSAJ284 bei Inokulummassen von 3,2 g wurde allerdings keine Erklärung gefunden.

#### Ermittlung des optimalen Gärrest-zu-Inokulum-Verhältnisses anhand der Biogasdaten

Trotz der hohen Spannbreiten der Inokulummassen von 1 g bis 16 g Biofeuchtmasse zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Biogasausbeuten. Signifikante Unterschiede der Biogasergebnisse zwischen Tag 0 und Tag 21 wurden bei der mittleren Inokulummasse von 4 g bei POS65 und PSA224, nicht jedoch bei PSAJ284 beobachtet.

In diesem Versuch konnte für das Ziel, für eine maximale Ligninabbauleistung (und folglich die maximale Biogasausbeute) kein optimales Massenverhältnis von Pilz-Inokulum und Gärrest anhand der Biogasergebnisse ermittelt werden.

#### Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den Ergosterolgehalten und den Biogasausbeuten

Ein Zusammenhang zwischen dem Ergosterolgehalt und der Biogasausbeute wurde bei keinem der Stämme festgestellt. Dafür kann es mehrere Gründe geben, die im Folgenden diskutiert werden.

Während der Kultivierung der Weißfäulepilze in der Weizenstrohgärrest-Brühe sind grundsätzlich zwei komplementäre Szenarien denkbar:

- Der Pilz ist in der Kulturbrühe nicht lebensfähig und stirbt sofort nach der Überimpfung in die Hauptkultur ab. Dadurch kommt es während der Kultivierung zu keiner Änderung des Ergosterolgehalts.
- Der Pilz ist über die gesamte Kultivierungsdauer (hier: 21 Tage) in der Weizenstrohgärrest-Brühe lebensfähig. Er nutzt die Cellulose bzw. Hemicellulose des Gärrestes und baut Biomasse auf, wodurch zugleich der Ergosterolgehalt steigt.

Im ersteren Fall ist zu erwarten, dass die Biogasausbeuten der „Tag 21“-Kultur und der „Tag 0“-Kultur identisch sind.

Im zweiten Fall ist (ebenfalls beim Vergleich der Biogasausbeute der „Tag 21“-Kultur und der „Tag 0“-Kultur) zu erwarten, dass die gemessene Biogasausbeute sich in zwei Hinsichten ändert. Einerseits sollte die gemessene Biogasausbeute sinken, wenn der Pilz verwertbare Nährstoffe des Gärrestes veratmet, da diese bei der Messung der Biogasausbeute nicht mehr zur Verfügung stehen. Andererseits sollte zugleich erwartungsgemäß die Biogasausbeute um denjenigen Wert steigen, der dem wachstumsbedingten Pilzbiomasse-Anstieg von Tag 0 bis hin zu Tag 21 entspricht<sup>12</sup>. Die gemessene Biogasausbeute ist ein Resultat des Zusammenspiels dieser beiden Ereignisse.

---

<sup>12</sup> Hierbei wurde – wie bereits in 3.4 eingangs erwähnt – angenommen, dass die Pilzbiomasse durch die methanogenen Mikroorganismen, die im Impfschlamm (der für die Biogasmessung zur Probe zugegeben wird) enthalten sind, leichter zu Biogas umgesetzt werden kann als der Weizenstrohgärrest selbst.

Demnach ist zu erwarten, dass die Biogasausbeute der „Tag 21“-Kultur gegenüber der „Tag 0“-Kultur nur dann signifikant erhöht ist, wenn der Einfluss des zweiten Aspekts den ersten überkompensiert.

Ein weiterer Aspekt, den es in dieser Diskussion zu berücksichtigen gilt, ist, dass durch den Pilz eine Veratmung der Nährstoffe des Gärrestes erfolgen kann (Katabolismus), ohne dass zugleich der Pilz wächst und somit weiteres Ergosterol aufbaut (Anabolismus). Dies würde zu einer Verringerung der Biogasausbeute führen, ohne dass der Ergosterolgehalt der Kultur weiter ansteigt. Unter der Annahme, dass (zu einem bestimmten Zeitpunkt) in zwei verschiedenen Kulturen die enthaltenen Pilzbiomassen gleich sind, wobei in einer Kultur der Pilz vital und in der anderen abgestorben ist, wäre der Ergosterolgehalt der beiden Kulturen identisch. Während in der Kultur, in der der Pilz abgestorben ist, sich die Biogasausbeute nicht ändern kann, würde die Biogasausbeute im Falle der Kultur mit dem vitalen Pilz stetig sinken.

Das vielfältige Zusammenspiel der hier genannten Gegebenheiten, die sich auf den Ergosterolgehalt in der Kultur bzw. die Biogasausbeute derselben Kultur auswirken können, erklärt, weshalb im Falle der Kulturen der drei Pilze (POS65, PSA224 und PSAJ284) keine klare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern gefunden wurde.

Allerdings wurde festgestellt, dass in den meisten Kulturen zu Tag 21 ein höherer Ergosterolgehalt als zu Tag 0 festgestellt wurde, was für eine Lebensfähigkeit der Pilze in der Weizenstrohgärrest-Brühe spricht.

### **3.4.3 Bewertung der Ergebnisse**

Abschließend wird an dieser Stelle festgehalten, dass bei der Animpfung von Weizenstrohgärrest mit unterschiedlichen Inokulummassen dreier verwendeter Basidiomyceten (*Pleurotus ostreatus* 65, *Pleurotus sapidus* 224 und *Pleurotus sajor-caju* 284) kein optimales Massenverhältnis zwischen Gärrest und Inokulum zum Zweck der Maximierung der Biogasausbeute ermittelt werden konnte. Zudem ließ sich aus den erhaltenen Daten kein eindeutiger Trend erkennen, anhand dessen tendenzielle Rückschlüsse darüber gemacht werden könnten, welches Gärrest/Inokulum-Massenverhältnis für eine erhöhte Biogasausbeute förderlich oder kontraproduktiv ist.

Es wurde außerdem gezeigt, dass zwischen dem Ergosterolgehalt der Kulturen und der Biogasausbeute kein erkennbarer Zusammenhang besteht.

Im Folgenden werden die hier erzielten Biogasergebnisse kurz in einen Zusammenhang mit den in Abschnitt 3.3.1 Ergebnissen eingeordnet.

So zeigt die Gesamtheit der hier erzielten Biogasergebnisse große Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen in der vorherigen submersen Kultivierung (Screening: Abbildung 35). Während die Blindprobe im Screening-Versuch eine Biogasausbeute von  $233 \pm 10$  NmL/(goTS) aufwies, zeigte sie in diesem Versuch einen signifikant höheren Wert von  $287 \pm 6$  NmL/(goTS). Des Weiteren wurden bei keinem der drei Stämme Biogasausbeuten von  $> 400$  NmL/(goTS) erreicht wie im Screening-Versuch. In diesem Experiment hat der Basidiomycet PSA224 stets höhere Biogasausbeuten als PSAJ284 erbracht (beim Screening-Experiment war dies genau umgekehrt (Abbildung 35)). Zudem haben alle beimpften Kulturen von PSAJ284 niedrigere Biogasausbeuten als die Blindprobe (nicht beimpfter Gärrest) gezeigt.

Insgesamt lässt sich dennoch in positiver Weise zusammenfassen, dass die Biogasausbeuten im Falle der Stämme POS65 und PSA224 meist höher als die der Blindprobe waren. Lediglich bei PSAJ284 zeigten alle beimpften Kulturen signifikant kleinere Biogasausbeuten im Vergleich mit der Blindprobe.

### 3.5 Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes

Ziel dieses Versuchs war es, den im Hinblick auf eine maximale Biogasausbeute erforderlichen Erntezeitpunkt zu bestimmen. Dazu wurden in diesem Versuch bei konstanter Inokulummasse mehrere Kulturen angeimpft und der Erntezeitpunkt variiert. Als Modellorganismus wurde dazu der Basidiomycet *Pleurotus ostreatus* 65 verwendet, da dieser beim Screening die höchste Biogasausbeute erbracht hat (Abbildung 35).

Zudem sollte in diesen Kulturen der Ligningehalt bestimmt werden, um zu überprüfen, ob dieser mit der Biogasausbeute korreliert. Eine Korrelation dieser Parameter ist deshalb zu erwarten, da die Biogasausbeute umso höher ausfallen sollte, je mehr Lignin abgebaut wird, weil durch den Ligninabbau im Gärrest zugleich die Zugänglichkeit zu Cellulose und Hemicellulose verbessert wird.

Das Schema der Kultivierung ist in Abbildung 50 dargestellt.

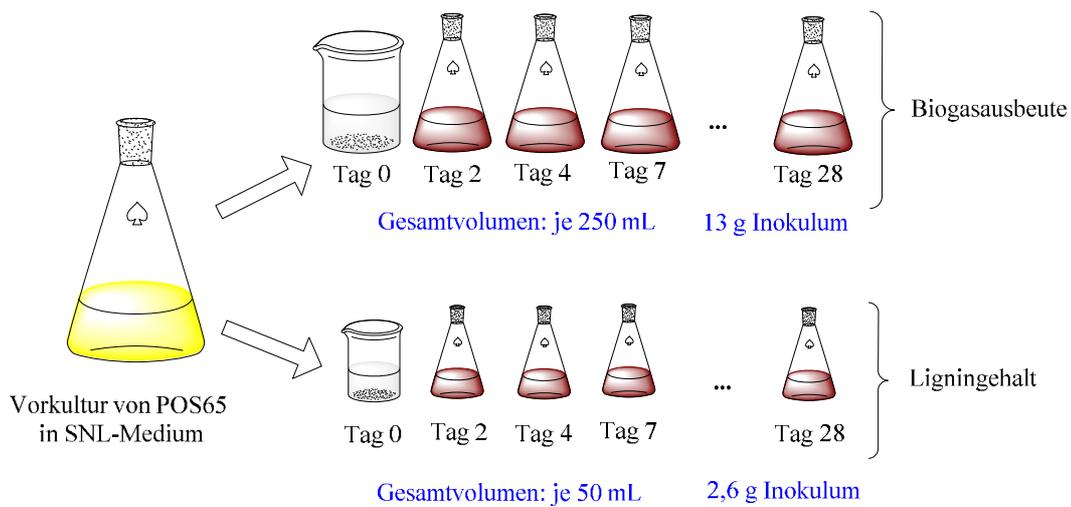


Abbildung 50: Kultivierungsschema zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes. Nach Zentrifugation wurde das Pilzpellet des Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 aus der Vorkultur (SNL-Medium) gleichmäßig in die Hauptkulturen mit 8 % Weizenstrohgärrest überimpft. Die 250-mL-Kulturen wurden zur Untersuchung der Biogasausbeute herangezogen, während die Parallelkulturen, die zur besseren Handhabbarkeit auf 50 mL herunter dimensioniert wurden, zur Bestimmung des Ligningehalts verwendet wurden. Als Blindproben wurden nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspensionen in entsprechend großen Kulturvolumina mitgeführt (hier im Schema nicht dargestellt).

Es wurden zwei parallele Kulturreihen mit Inokulummassen von 13,0 g (für die 250-mL-Kulturen) und 2,6 g Biofeuchtmasse (für die 50-mL-Kulturen) angeimpft. Die Gründe für solch eine Vorgehensweise (dass die Biogasausbeute einer Kultur mit einer Messgröße einer Parallelkultur verglichen wird) wurden bereits in 3.4 in einem vergleichbaren Zusammenhang dargelegt.

Die Wahl auf eine Inokulummasse von 13 g in den 250-mL-Kultur rührte daher, dass mit ebendieser Biofeuchtmasse im Fall des Basidiomyceten POS65 die bisher höchste Biogasausbeute von 424 NmL/(goTS) in submerser Kultivierung erzielt wurde (Abbildung 35).

Durch Ernten der Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten von null bis 28 Tagen in Intervallen von 2 bis 3 Tagen sollte der optimale Erntezeitpunkt anhand der Biogasdaten bestimmt werden. Da außerdem bereits in 3.3.1 ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Abbaugrad des Lignins und dem Zuwachs der Biogasausbeute vermutet wurde, wurde erstmalig in diesem Experiment der Ligningehalt der Kulturen gemessen, um diesen anschließend mathematisch mit der gemessenen Biogasausbeute zu korrelieren.

Zusätzlich wurden die Kulturen hinsichtlich des pH-Zeit-Profiles und verschiedener Enzymaktivitäten untersucht.

### 3.5.1 Ergebnisse

#### pH-Werte

Abbildung 51 zeigt die Auftragung des pH-Werts gegen die Kultivierungsdauer.

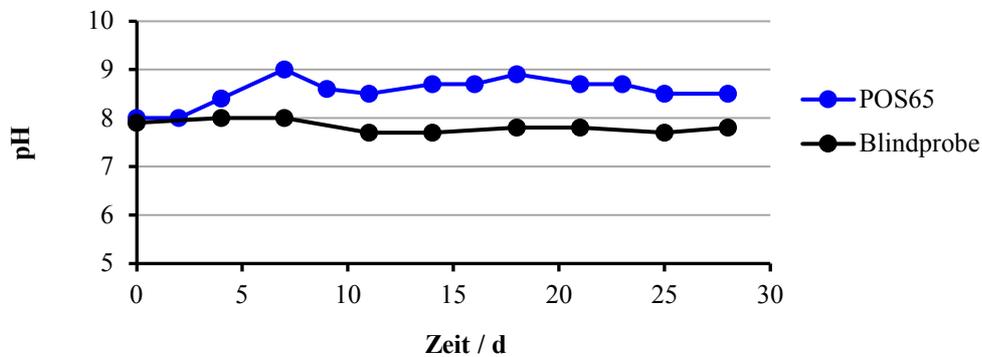


Abbildung 51: pH-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 50). Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet.

#### Enzymaktivitäten

In Abbildung 52 ist das Ergebnis der Laccaseaktivitätsbestimmung gezeigt.

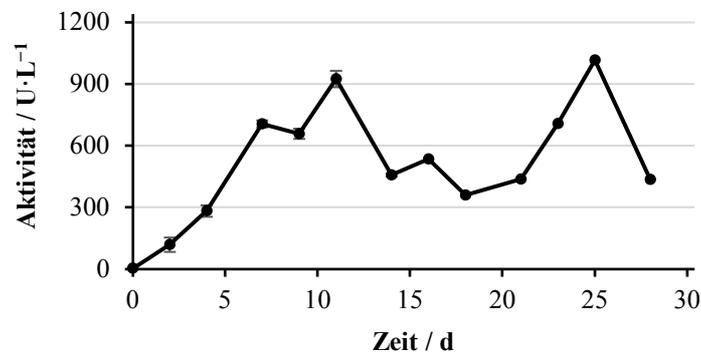


Abbildung 52: Laccaseaktivitäts-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 50) zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes. In der Blindprobe, einer unbeimpften Weizenstrohgärrest-Suspension, wurden keine Laccaseaktivitäten festgestellt.

In keiner der Weizenstrohgärrest-Kulturen von POS65 wurden Peroxidaseaktivitäten festgestellt.

In den Kulturüberständen konnten keine messbaren Cellulaseaktivitäten festgestellt werden. Dagegen fiel die Positivkontrolle, die mit einer kommerziellen „Cellulase aus *Aspergillus niger*“ durchgeführt wurde, positiv aus.

Die Messung der Xylanaseaktivitäten ist in Abbildung 53 dargestellt.

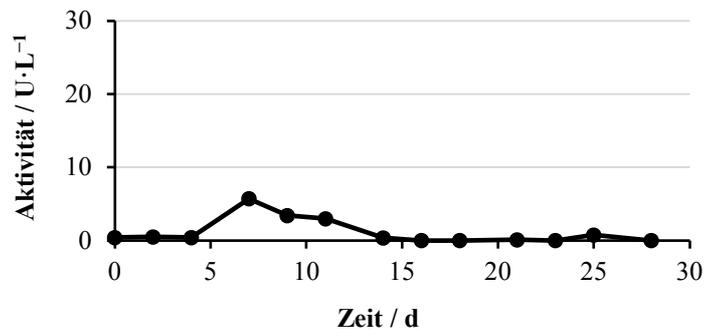


Abbildung 53: Xylanaseaktivitäten der Kulturüberstände von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) zu unterschiedlichen Kultivierungstagen (Kultivierungsschema: Abbildung 50) in submerser Kultivierung in Weizenstrohgärrest.

### Ligninbestimmung

Die Bestimmung des Ligningehalts erfolgte durch saure Hydrolyse und gravimetrischer Bestimmung nach der Vorschrift in 2.8, wobei das Ergebnis in Abbildung 54 dargestellt ist.

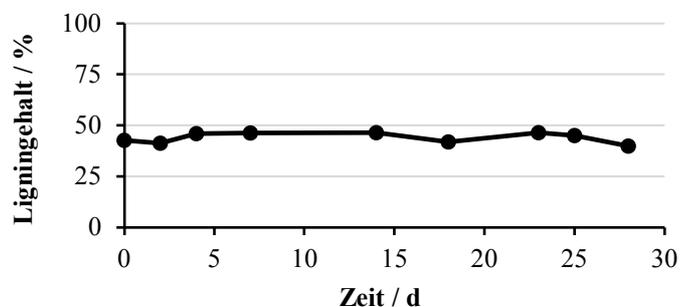


Abbildung 54: Ergebnisse der gravimetrischen Ligninbestimmung der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in Weizenstrohgärrest gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 50. Die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte betragen stets < 1 %. Der Ligningehalt der Blindprobe betrug 42,0 %. Ein Ligningehalt von 1 % wurde hier als 1 g des (getrockneten) ausgewogenen Lignins in 100 g Kulturprobe (getrocknete Pilz/Weizenstrohgärrest-Kultur) definiert.

### Biogasdaten

Die vollständigen Biogasergebnisse zur Erntekinetik sind in Abbildung 55 dargestellt. Die Biogas-Endwerte (aus Abbildung 55) sind zwecks einer besseren Übersicht in Abbildung 56 separat gezeigt. Des Weiteren wurde in dieser Biogasmessung erstmalig die Biogasausbeute des reinen Pilz-Inokulums bestimmt, um abschätzen zu können, wie die Biogasausbeute einer Kultur durch

das Animpfen selbst (d.h. durch Zugabe des Inokulums) beeinflusst wird. Dieses wurde für die Animpfung aller submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen verwendet (13 g Pilzbiofeuchtmasse).

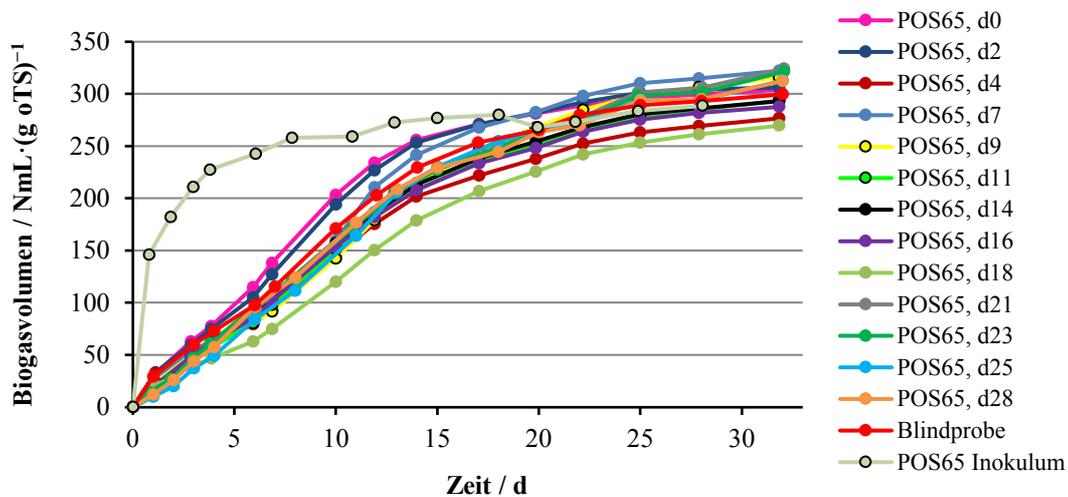


Abbildung 55: Biogasergebnisse zur Bestimmung der optimalen Erntekinetik mit *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 50. Der Übersicht halber wurden keine Standardabweichungen eingezeichnet. „POS65 Inokulum“ bezeichnet das reine Pilzpellet von 13 g Biofeuchtmasse. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag der submersen Weizenstrohgärrest-Kultur, während die x Achse des Diagramms die Messdauer der GB21-Versuche (Bestimmung der Biogasausbeute) darstellt. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Kultur verwendet.

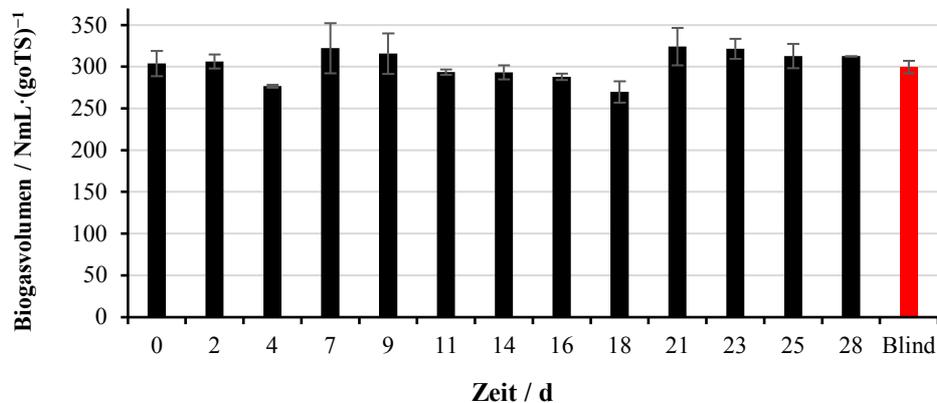


Abbildung 56: Biogasergebnisse der mit *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) beimpften Weizenstrohgärrest-Kulturen als Funktion des Erntzeitpunktes gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 50. Die hier dargestellten Biogas-Endwerte aus Abbildung 55 abgelesen. Durch diese Darstellung soll veranschaulicht werden, ob sich die Biogasausbeuten der einzelnen Kulturen signifikant voneinander unterscheiden. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Kultur verwendet.

In Abbildung 57 wurden die Ligningehalte als Funktion der Endwerte der Biogasausbeuten dargestellt.

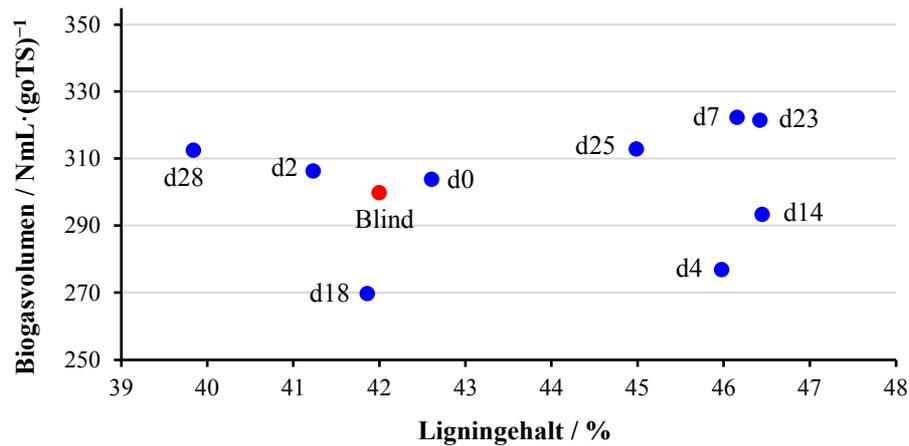


Abbildung 57: Auftragung der Biogas-Endwerte (abgelesen aus Abbildung 55) gegen die prozentualen Ligningehalte der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in Weizenstrohgärrest. Zu jedem Messpunkt ist der dazugehörige Erntezeitpunkt (z.B. „d4“ für den vierten Kultivierungstag) angegeben. „Blind“ bezeichnet den Datenpunkt der Blindprobe (nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension).

### 3.5.2 Diskussion

#### pH-Werte

Der zeitliche Verlauf der pH-Werte der POS65-Kulturen zeigt, dass innerhalb der beimpften Kulturreihe der pH-Wert (verglichen zur Blindprobe) von 8,0 auf durchschnittlich 8,5 angestiegen ist. Dieses Ergebnis unterscheidet sich im Kurvenverlauf zum pH-Zeit-Profil von POS65 aus einer früheren Kultivierung, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde, in der der pH-Wert nach 14 Tagen auf 5,5-5,8 absank (Abbildung 29).

#### Enzymaktivitäten

Die Laccaseaktivitäten sind in diesem Versuch mit bis zu ca. 1000 U/L (Tag 25, Abbildung 52) doppelt so hoch wie bei einer zuvor durchgeführten submersen Kultivierung von POS65 (Abbildung 30) mit einem Maximalwert von etwa 500 U/L.

Wie bereits im Screening-Versuch (Abschnitt 3.3) wurden auch in diesem Versuch im Rahmen des ABTS-Assays (nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) keine Peroxidaseaktivitäten festgestellt. Mögliche Ursachen für das Ausbleiben von Peroxidaseaktivitäten trotz vorhandener Laccaseaktivitäten wurden bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert und beinhalten vorwiegend die Vermutung einer Inhibierung von Peroxidasen durch den Weizenstrohgärrest.

Messbare Cellulaseaktivitäten waren in keinem der Kulturüberstände vorhanden. Denkbare Ursachen für solch einen Befund wurden in ähnlicher Weise in 3.3.2 diskutiert. Dabei wurde vermutet, dass der Weizenstrohgärrest auf den Pilz in zu hohen Konzentrationen toxisch wirkt, sodass die Produktion von Cellulasen erschwert wird.

Die gemessenen Xylanaseaktivitäten in Abbildung 53 sind mit bis zu 5 U/L – verglichen zu Literaturwerten, wobei Basidiomyceten in Gegenwart von lignocellulosehaltigem Material submers kultiviert wurden – als gering einzustufen. An dieser Stelle sei jedoch angemerkt, dass ein direkter Vergleich mit Literaturwerten nicht erfolgen kann, da nach gegenwärtigem Kenntnisstand bisher in der Literatur keine Xylanaseaktivitäten von Basidiomyceten in Submerskulturen mit vergorenen pflanzlichen Substraten gemessen wurden.

So wurden beispielsweise bei der submersen Kultivierung von *Coprinellus disseminatus* in einem Vollmedium mit 2 % Weizenkleie (*w/v*) Xylanaseaktivitäten im Bereich von 8-32 U/mL (d.h. 8 000-32 000 U/L) gemessen (Lal *et al.*, 2015). In einer anderen Literaturquelle wurden vergleichbar hohe Xylanaseaktivitäten beim Kultivieren von *Trametes versicolor* und *Pycnoporus sanguineus* auf Weizenkleie und Maisspindeln im Bereich von 865-6049 U/L gemessen, wobei in diesem Fall allerdings ein emeres Kultivierungsverfahren (SSF engl. *solid-state fermentation*) eingesetzt wurde (Falkoski *et al.*, 2011). Wiederum wurden in einer anderen Studie bei den Basidiomyceten *Panus lecometei* und *Pseudotrametes gibbosa* ähnlich hohe Xylanaseaktivitäten gemessen (Kobakhidze *et al.*, 2016). Beide Pilze wurden in einem Basalmedium vorkultiviert und anschließend wurde das homogenisierte Pellet in ein Hauptkulturmedium mit Avicel® (mikrokristalline Cellulose) und Glycerol überimpft. In Gegenwart von Avicel® stiegen sowohl die Enzymaktivitäten von Cellulasen als auch von Xylanasen. Die Höhen der Xylanaseaktivitäten unterschieden sich je nach Kultivierungstag und erreichten Werte von bis zu 28 U/mL, d.h. 28 000 U/L.

Damit sind diese Ergebnisse aus der Literatur um den Faktor von mindestens 1000 größer als die hier gemessenen Xylanaseaktivitäten von max. 5 U/L in der Weizenstrohgärrest-Brühe. Diese Unterschiede können vor allem durch die unterschiedliche Zusammensetzung des Mediums erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass der Pilz in nährstoffreicheren Medien in erhöhtem Maße Enzyme produzieren kann als in einem Medium mit vergorenem, nährstoffarmem Substrat wie dem Gärrest. Des Weiteren ist der Aspekt der Enzyminduktion zu berücksichtigen. So können Substrate mit hohem Hemicelluloseanteil wie z.B. Weizenkleie (35-39 % Hemicellulose in der Trockenmasse (Adebayo & Martínez-Carrera, 2015)) gezielt zu einer Induktion und Produktion

von Xylanasen genutzt werden (Ghoshal *et al.*, 2015; Motta *et al.*, 2013). Dagegen hat der Weizenstrohgärrest einen geringeren Hemicellulose-Massenanteil von ca. 23 % (Tabelle 3 in Abschnitt 1.1.5), sodass er nicht im gleichen Maße induzierend wirkt wie das unvergorene Weizenstroh.

### Ligninbestimmung

Die Ergebnisse der Ligninbestimmung in den beimpften Kulturen zeigen gegenüber der Blindprobe keine signifikanten Unterschiede. Aus Abbildung 54 geht eindeutig hervor, dass der relative Ligningehalt sich selbst nach dreiwöchiger Kultivierung nicht geändert hat<sup>13</sup>. Dies geht mit den Ergebnissen des pH-Zeit-Profiles und der gemessenen Enzymaktivitäten einher: Wegen des stets alkalisch bleibenden pH-Werts ist ein enzymatischer Abbau des Lignins praktisch unmöglich (die pH-Optima von ligninolytischen Enzymen liegen eher im sauren Milieu, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert), was sich in einem prozentual gleichbleibenden Ligningehalt widerspiegelt.

### Biogasdaten

Die Biogasdaten zeigen für alle Kulturreihen unabhängig vom Erntezeitpunkt nahezu gleiche Werte. Das Minimum wurde am 18. Kultivierungstag in Höhe von  $270 \pm 13$  NmL/(goTS) und das Maximum am 7. Kultivierungstag in Höhe von  $322 \pm 30$  NmL/(goTS) festgestellt. Aus diesen Befunden lassen sich hinsichtlich einer optimalen Erntekinetik keine sinnvollen Rückschlüsse ziehen. Die hier gemessenen Biogasausbeuten zeigen im Vergleich zum höchsten bisher gemessenen Wert von  $424 \pm 33$  NmL/(goTS) aus der Screening-Kultivierung (Abbildung 35) einen großen Unterschied auf, obwohl die Vorgehensweise in beiden Kultivierungen (abgesehen von der Variation der Kultivierungszeit im Versuch 3.5) identisch war.

Insgesamt muss hier festgehalten werden, dass aus den Ergebnissen keine Tendenz erkennbar ist, aus der sich eine vorteilhafte oder nachteilige Inkubationszeit des Gärrestes mit dem Weißfäulepilz POS65 im Hinblick auf eine gesteigerte Biogasausbeute ablesen lässt.

---

<sup>13</sup> Es sei hier hervorgehoben, dass in dieser Analyse relative Ligningehalte gemessen wurden. Sofern ein Ligninabbau stattgefunden hat, lassen sich keine Aussagen darüber machen, wie viel Gramm Lignin innerhalb einer bestimmten Kultivierungszeit abgebaut wurden.

Daher mussten die weiteren Experimente, in denen andere Parameter variiert werden sollten, so geplant werden, dass zusätzlich eine Erntekinetik aufgenommen wird.

In Abbildung 57 zeigte die Auftragung der Biogas-Endwerte (aus Abbildung 56) gegen die Ligningehalte keine ersichtliche Korrelation. Das lässt sich dadurch erklären, dass diese beiden Parameter für sich bereits als Funktion der Zeit keinen erkennbaren Trend aufwiesen. Zudem deutet der stets alkalisch gebliebene pH-Wert (Abbildung 51) darauf hin, dass keine nennenswerten ligninolytischen Aktivitäten zu einem Ligninabbau beigetragen haben. Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert, liegen die pH-Optima von Laccasen und Peroxidasen aus Basidiomyceten im sauren Milieu von ca. 3,5-6,0. Daher resultierte aus diesem Grund bei der Auftragung beider Messgrößen (Ligningehalt vs. Biogasausbeute) gegeneinander ebenfalls keine ersichtliche Korrelation.

### **3.5.3 Bewertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse deuten in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass weder Lignin abgebaut wurde noch dass in irgendeiner der Kulturen ein Biogasanstieg verzeichnet wurde. Dieses Ergebnis steht – wie bereits das Ergebnis aus 3.4 – im Widerspruch zum Screening-Ergebnis aus 3.3, bei dem der Biogasanstieg (von der beimpften Kultur im Vergleich zur Blindprobe) nahezu verdoppelt wurde.

In Anbetracht aller bisher erzielten Ergebnisse aus mehreren submersen Kultivierungsversuchen wurde im Fall des Basidiomyceten POS65 in der Weizenstrohgärrest-Brühe bisher nur dann ein Biogasanstieg beobachtet, wenn der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung gesunken ist. Dagegen blieb im Verlauf der Kultivierung in diesem Experiment der pH-Wert stets zwischen 8 und 9. Damit scheint die basidiomyceten-eigene pH-Regulierung der Gärrestbrühe einen entscheidenden Faktor darzustellen, der die Höhe der Biogasausbeute bestimmt. Dies kann insofern miteinander in Einklang gebracht werden, als dass ligninolytische Enzyme nur im sauren Bereich aktiv sind. Je mehr Lignin abgebaut wird, desto höher ist die erwartete Biogasausbeute.

Weshalb allerdings die Absenkung des pH-Werts, vermutlich bedingt durch die vom Pilz ausgeschiedenen Säuren, nicht reproduzierbar ist, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass in diesem Kultivierungsversuch der pH-Wert, der Ligningehalt und die Biogasausbeute nahezu gleich geblieben sind, deutet auf eine mangelnde Vitalität des Pilzes in den Gärrestkulturen hin.

### 3.6 Variation des pH-Wertes

Da sich im vergangenen Kultivierungsversuch offenbar der pH-Wert als wichtige Größe erwiesen hat, die sich direkt auf die Höhe der Biogasausbeute auswirkt, wurde in dem nachfolgend beschriebenen Versuch unter anderem mit einem voreingestellten pH-Wert gearbeitet.

Wie in Abbildung 29 (im Experiment 3.3) zu sehen, hat der Basidiomycet *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in dieser Kultivierung den nativen alkalischen pH-Wert des Gärrestes nach 14 Tagen auf einen sauren pH-Wert von durchschnittlich 5,8 geregelt. Dies war mit einer erhöhten Biogasausbeute verbunden. Jedoch führte eine erneute Kultivierung desselben Stammes unter gleichen Bedingungen zu keiner pH-Absenkung und ebenfalls resultierte keine signifikant gesteigerte Biogasausbeute. Ob der pH-Wert in der submersen Weizenstrohgärrest-Kultur tatsächlich mit der Biogasausbeute in einem kausalen Zusammenhang steht, sollte in diesem Experiment überprüft werden.

In der nachfolgend beschriebenen Kultivierung wurden zwei parallele Kulturreihen von *Pleurotus ostreatus* 65 angesetzt: In der einen Reihe wurde der native pH-Wert des Gärrestes beibehalten, während in der anderen Reihe der pH-Wert der Kulturbrühe auf 6,0 eingestellt wurde. Die Wahl eines geringfügig sauren pH-Werts wurde deshalb getroffen, weil ligninolytische Enzyme ihr Optimum im sauren Bereich haben (dies wurde bereits in 3.3.2 diskutiert). Zudem zeigen Basidiomyceten selbst die Tendenz, den pH-Wert des Mediums auf einen leicht sauren Bereich einzustellen, was in der Literatur bereits beschrieben wurde: Bei der Kultivierung von Basidiomyceten der Gattungen *Pleurotus* und *Polyporus* in einem Vollmedium wurde festgestellt, dass die meisten der untersuchten Stämme den pH-Wert von 6,74 auf einen Bereich von 4-5 abgesenkt haben. Im Falle der Kulturen von *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* wurde ein geringerer pH-Abfall auf einen Bereich von 5,5-6,5 beobachtet (Rigas & Dritsa, 2006).

In einer anderen Studie wurde *Trametes pubescens* in einem Vollmedium mit einem initialen pH-Wert von 5,0 in einem Vollmedium submers kultiviert. Bis zum 12. Kultivierungstag wurde ein Absinken des pH-Werts auf ca. 3,8 beobachtet, welcher erst wieder anstieg, nachdem die Glucosekonzentration erschöpft war (Galhaup *et al.*, 2002).

In Anbetracht dieser Ergebnisse aus der Literatur wurde in der Weizenstrohgärrest-Brühe ein pH-Wert von 6,0 gewählt. Bei der Einstellung dieses pH-Werts gab es mehrere Faktoren zu beachten. Die puffernde Substanz...

1. durfte nicht toxisch sein
2. sollte aus Ionen bestehen, deren chaotrope Eigenschaften (gemäß der Hofmeister-Reihe) möglichst gering sind, damit die ligninolytischen Enzyme nicht denaturiert werden
3. durfte keine chelatisierenden Anionen aufweisen, da ligninolytische Enzyme für ihre Aktivität Metallionen (Mangan in Manganperoxidasen, Kupfer in Laccasen) benötigen und die Chelatisierung zu einem Verlust der Enzymaktivität führen würde
4. sollte einen  $pK_S$ -Wert aufweisen, der möglichst dicht an 6,0 liegt, da die puffernde Wirkung am  $pK_S$ -Wert am stärksten ist

Als Puffersubstanz wurde  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gewählt. Dieser Puffer erfüllt die ersten drei der vier der o.g. Kriterien. Da der gewünschte pH-Wert 6,0 und der  $pK_{S2}$ -Wert der Phosphorsäure 7,2 beträgt, liegt der pH-Wert nicht im Bereich der größten Pufferkapazität von  $pK_S \pm 1$ . Allerdings wurde an dieser Stelle postuliert, dass der Gärrest in seiner komplexen Zusammensetzung noch weitere puffernde Komponenten enthält, die es in ihrer Summe ermöglichen, einen pH-Wert von 6,0 stabil zu halten.

Das Ansetzen der submersen Kulturen erfolgte gemäß der in 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Verfahren. Es wurden zwei parallele Weizenstrohgärrest-Kulturreihen (8 % Gärrest-Trockenmasse) mit nativem und auf 6,0 eingestelltem pH-Wert hergestellt und autoklaviert. Alle Kulturen wurden mit jeweils 13 g Pellet (Biofeuchtmasse) angeimpft und die Kulturen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die Wahl auf 13 g Biofeuchtmasse des Inokulums erfolgte deshalb, da mit ebendieser Inokulummasse die bisher höchste Biogasausbeute von 424 NmL/(goTS) in submerser Kulturführung mit POS65 erzielt wurde (s. Abbildung 35). Das Kultivierungsschema ist Abbildung 58 gezeigt.

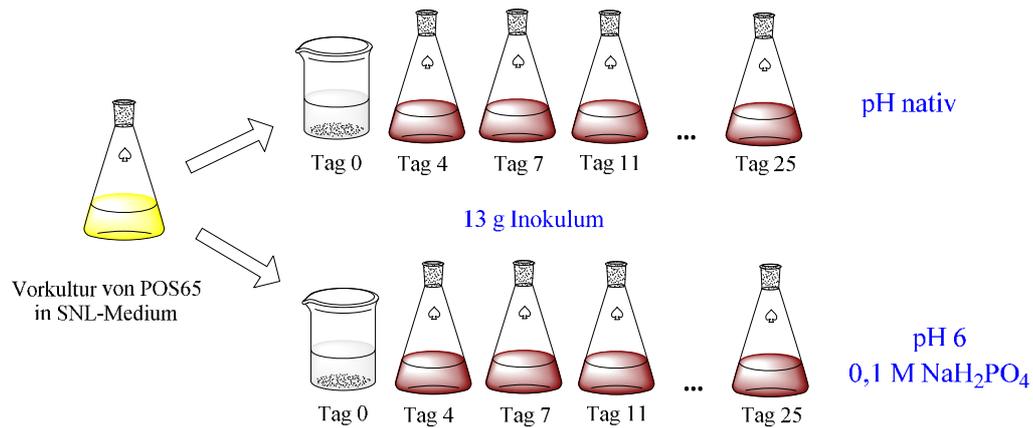


Abbildung 58: Kultivierungsschema submerser Weizenstrohgärrest-Kulturen von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) bei nativem und voreingestelltem saurem pH-Wert (pH 6, eingestellt mit 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) im Hinblick auf eine Maximierung der Biogasausbeute. Die Kulturvolumina betragen 250 mL und die Gärrestkonzentrationen je 8 % Trockenmasse. Die Kulturen wurden jeweils mit 13 g Biofeuchtmasse angeimpft. Die Ernte erfolgte in Abständen von 3-4 Tagen im Zeitraum von 25 Tagen, um zusätzlich den für eine maximale Biogasausbeute optimalen Erntezeitpunkt zu bestimmen.

Als zu bestimmender Wachstumsparameter wurde in dieser Kultivierung erneut (wie bereits in Experiment 3.4) Ergosterol gewählt. Dadurch konnte objektiv beurteilt werden, ob die pH-Voreinstellung auf 6,0 gegenüber der Kulturreihe mit nativem pH-Wert des Weizenstrohgärrestes hinsichtlich der Maximierung der Biogasausbeute und hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit des Pilzes in der Weizenstrohgärrest-Brühe einen Vorteil darstellt.

Zusätzlich zur Ergosterolbestimmung und der Bestimmung der Biogasausbeute wurde ein pH-Zeit-Profil erstellt und Aktivitäten ligninolytischer Enzyme (Laccasen und Peroxidasen) gemessen.

### 3.6.1 Ergebnisse

#### pH-Werte

Der zeitliche pH-Verlauf ist in Abbildung 59 dargestellt.

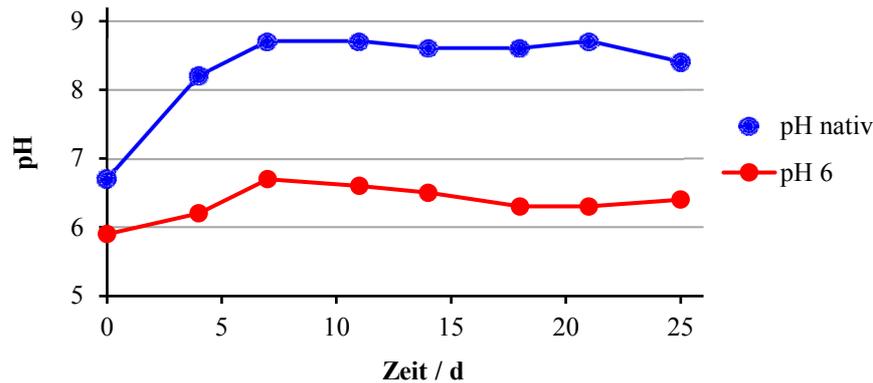


Abbildung 59: pH-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) bei nativem pH-Wert und einem auf 6,0 eingestellten pH-Wert des Weizenstrohgärrestes mit 8 % Trockenmasse (Kultivierungsschema: Abbildung 58). Mit den Bezeichnungen „pH nativ“ und „pH 6“ ist jeweils der voreingestellte pH-Wert der Kulturen vor der Animpfung mit dem Pilzpellet gemeint.

### Aktivitäten von Oxidoreduktasen

Der zeitliche Verlauf der Laccaseaktivitäten der beiden submersen Kulturreihen von *Pleurotus ostreatus* 65 in Weizenstrohgärrest ist in Abbildung 60 gezeigt.

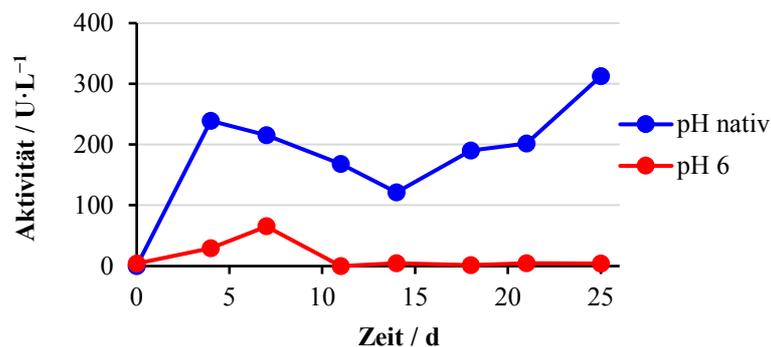


Abbildung 60: Laccaseaktivitäts-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) bei nativem pH-Wert und einem auf 6,0 voreingestellten pH-Wert des Weizenstrohgärrestes mit 8 % Trockenmasse (Kultivierungsschema: Abbildung 58).

In keinem der Kulturüberstände submerser Weizenstrohgärrest-Kulturen von POS65 wurden Peroxidaseaktivitäten detektiert.

### Bestimmung des Ergosterolgehalts

Die Messung der Ergosterolgehalte wurde nach dem in Abschnitt 2.7 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurde die Kultur zunächst alkalisch verseift, das Ergosterol extrahiert und nach Aufarbeitung die Probe mittels HPLC-DAD vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 gezeigt.

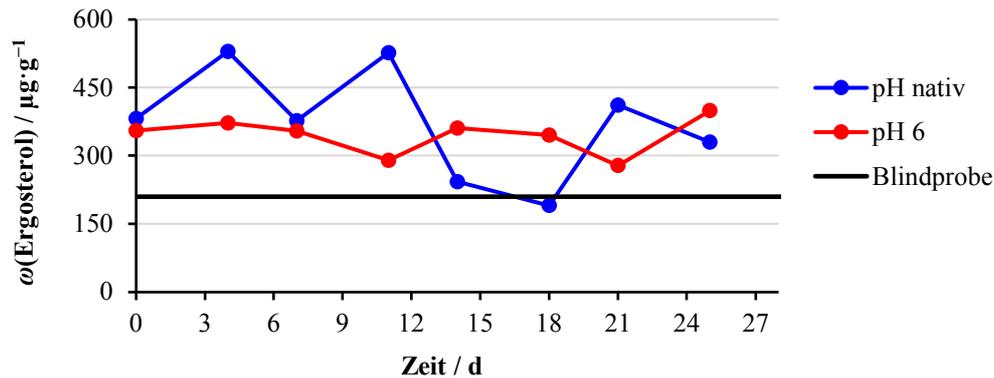


Abbildung 61: Auftragung der Ergosterolgehalte ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro  $\text{g}$  Kulturtrockenmasse) der Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen als Funktion der Kultivierungszeit. Es wurde mit zwei parallelen Kulturreihen mit nativem pH-Wert und auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert (s. Kultivierungsschema in Abbildung 58) gearbeitet. Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet. Es wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt, sodass keine Standardabweichungen angegeben wurden.

Während die vollständigen Biogasdaten im Anhang in Abbildung 110 und Abbildung 111 dargestellt sind, sind in Abbildung 62 die Biogas-Endwerte dieser Messungen gezeigt.

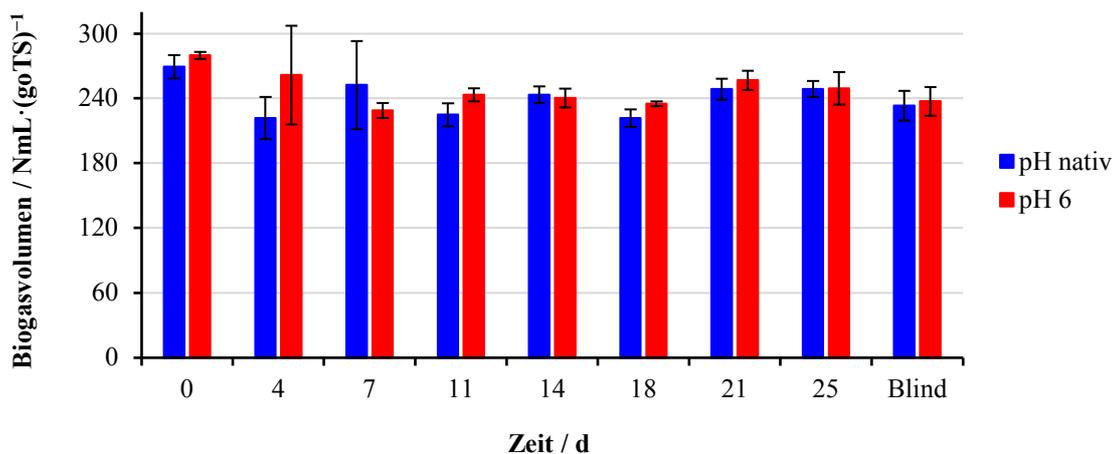


Abbildung 62: Biogasergebnisse der Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen. Es wurde mit zwei parallelen Kulturreihen mit nativem pH-Wert und auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert gearbeitet (s. Kultivierungsschema in Abbildung 58). Die Zahlen auf der x-Achse bezeichnen den Erntezeitpunkt der jeweiligen Kultur. Als Blindprobe („Blind“) wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension des entsprechenden pH-Wertes verwendet. Die hier dargestellten Biogas-Endwerte wurden aus Abbildung 110 und Abbildung 111 (Anhang) abgelesen.

### Biogasdaten und deren Zusammenhang mit dem Ergosterolgehalt bei nativem und auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert des Gärrestes

Die Auftragung der Ergosterolgehalte gegen die Biogas-Endwerte ist in Abbildung 63 gezeigt.

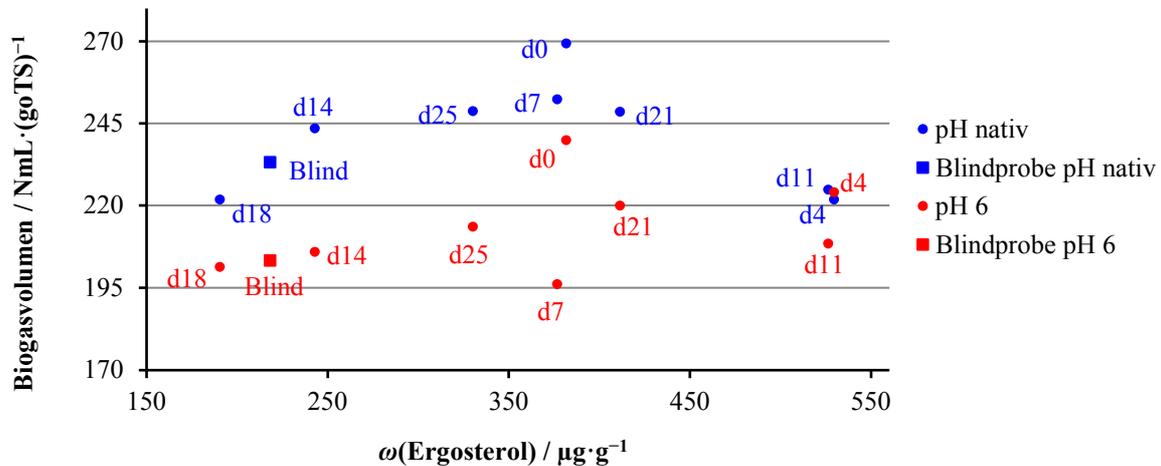


Abbildung 63: Auftragung der Ergosterolgehalte ( $\mu\text{g}$  Ergosterol pro g Kulturtrockenmasse) von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen gegen die Biogasausbeuten derselben Kulturen. Es wurde mit zwei parallelen Kulturreihen mit nativem pH-Wert und auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert gearbeitet (s. Kultivierungsschema in Abbildung 58). Als Blindproben wurden die unbeimpften Weizenstrohgärrest-Suspensionen der entsprechenden pH-Werte verwendet. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den Erntetag der jeweiligen Kultur.

### 3.6.2 Diskussion

#### pH-Werte

Der zeitliche Verlauf der pH-Profile zeigt, dass bei beiden Kulturreihen sich der pH-Wert während der Kultivierung insgesamt erhöht hat. Dabei nahm der pH-Wert der „pH nativ“-Kulturreihe Werte von 8-9 an, während in der „pH 6“-Kulturreihe Werte zwischen 7 und 8 erreicht wurden.

Ein geringfügiger pH-Anstieg im Verlauf der Kultivierung wurde bereits in einem vorherigen Experiment beobachtet (Abbildung 51). Wiederum wurde einem anderen bereits durchgeführten Kultivierungsversuch ein Absinken des pH-Werts beobachtet (Abbildung 29). Dies zeigt, dass trotz gleichbleibender Bedingungen in allen genannten Kultivierungsversuchen das pH-Zeit-Profil unterschiedlich verlaufen kann.

#### Aktivitäten von Oxidoreduktasen

Die Maxima der Laccaseaktivitäten wurden in beiden Kulturreihen in den ersten Tagen festgestellt. In den Kulturen bei nativem pH-Wert wurden insgesamt höhere Laccaseaktivitäten (bis zu 300 U/L) als bei dem auf 6,0 voreingestellten pH-Wert (bis zu 65 U/L) detektiert. Dieses Ergebnis widerspricht der Tatsache, dass Basidiomyceten und vor allem bestimmte Pilze der Gattung

*Pleurotus* für das Wachstum eher saure pH-Werte bevorzugen<sup>14</sup>. Folglich wurde erwartet, dass bei einem bereits voreingestellten sauren pH-Wert der Pilz POS65 höhere Mengen ligninolytischer Enzyme produzieren würde als beim nativen alkalischen pH-Wert des Weizenstrohgärrestes.

In einer Studie in der Literatur wurde *Pleurotus ostreatus* in einem Vollmedium mit unterschiedlichen pH-Werten kultiviert und anschließend der zeitliche Verlauf der Laccaseaktivitäten gemessen. Das Ergebnis war, dass bei einem pH-Wert von 4,5 die höchsten Laccaseaktivitäten (ca. 80 000 U/L) erzielt wurden, während bei pH 6,5 und pH 8,5 geringere Aktivitäten (in gleicher Reihenfolge) von bis zu 25 000 und 16 000 U/L resultierten (Díaz *et al.*, 2013).

Damit sind die Ergebnisse der Kultivierung von POS65 in Weizenstrohgärrest zu den Literaturdaten konträr. Allerdings muss bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, dass in der Studie *Pleurotus ostreatus* in einem Vollmedium, wohingegen dieselbe Spezies in dieser Arbeit in einer Kulturbrühe mit Weizenstrohgärrest, einem vergorenen Abfallprodukt, als Substrat kultiviert wurde.

Peroxidaseaktivitäten wurden in den Kulturüberständen nicht beobachtet. Die möglichen Gründe für das Ausbleiben von Peroxidaseaktivitäten wurden bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert. Demnach wurden in Submerskulturen des Weizenstrohgärrestes Peroxidaseaktivitäten bisher nur beobachtet, wenn die eingesetzte Gärrestkonzentration im Bereich von etwa 0,5-2,6 % Trockenmasse lag, während in diesem Versuch mit 8 % Trockenmasse gearbeitet wurde. Die Verwendung möglichst hoher Gärrestkonzentrationen hat allerdings wirtschaftliche Gründe. Diese werden in Abschnitt 3.9 und im Fazit dieser Arbeit (Abschnitt 4) näher beschrieben.

#### Bestimmung des Ergosterolgehalts

Der zeitliche Verlauf der Ergosterolgehalte in Abbildung 61 zeigt in beiden Kulturreihen tendenziell alternierende Werte, jedoch keinen klaren Trend. Lediglich der Ergosterolwert einer einzigen Kultur (pH nativ, Tag 18) wies einen Wert auf, der unterhalb des Ergosterolgehaltes der Blindprobe liegt, auf. Dieses Ergebnis ist nicht plausibel, da zu erwarten wäre, dass alle beimpften Kulturen einen höheren Ergosterolgehalt als die Blindprobe aufweisen würden. Ein Abbau von

---

<sup>14</sup> Einige Literaturquellen, die diese Aussage stützen, wurden eingangs in Abschnitt 3.6 genannt.

Ergosterol innerhalb der Kulturbrühe wird an dieser Stelle ausgeschlossen und die Gründe dafür wurden bereits in ähnlicher Form in 3.4.2 diskutiert. Demnach wird Ergosterol als chemisch stabil erachtet, sodass kein Abbau dieses Moleküls unter den Bedingungen der hier durchgeführten Kultivierung zu erwarten ist. Ebenfalls ist ein Verlust von Ergosterol während der Extraktion auszuschließen, weil (wie in 2.7 beschrieben) ein interner Standard zur Bestimmung der Wiederfindungsrate verwendet wurde. Für die gemessenen zeitlich schwankenden Ergosterolgehalte kann der folgende Erklärungsansatz in Betracht gezogen werden.

Ebenso wie in einem vorherigen Experiment (Abschnitt 3.3) beobachtet wurde, dass zwei parallele Weizenstrohgärrest-Kulturen, die mit dem Inokulum aus derselben Vorkultur angeimpft wurden, nicht zwangsläufig das gleiche pH-Zeit-Profil im Verlauf der Kultivierung aufweisen (Abbildung 29), so ist es entsprechend in diesem Experiment denkbar, dass derselbe Stamm in den parallelen Kulturen unterschiedlich anwächst. Das würde bedeuten, dass zum selben Kultivierungstag in zwei räumlich getrennten Kulturen trotz gleicher Bedingungen (pH-Wert, Art des Mediums, Temperatur etc.) die Pilzbiomassen unterschiedlich ausfallen können. Sofern der Pilz in diesem Medium ohnehin kein ausgeprägtes Wachstum zeigt, würde sich dieser Umstand in Ergosterolgehalten bemerkbar machen, die näherungsweise statistisch um den (bedingt durch die Animpfung) zugegebenen Ergosterolgehalt schwanken. Dies scheint in Abbildung 61 in den Kulturreihen bei nativem und auf pH 6,0 voreingestelltem pH-Wert der Fall zu sein.

Da kein zeitlich kontinuierlicher Anstieg der Ergosterolgehalte beobachtet wurde, kann ausgeschlossen werden, dass der Pilz in der Kultur stetig gewachsen ist. Dies deutet darauf hin, dass das Wachstum des Pilzes in einer Kulturbrühe mit einem vergorenen Produkt als Substrat gehemmt ist.

#### Biogasdaten und deren Zusammenhang mit dem Ergosterolgehalt bei nativem und auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert des Gärrestes

Aus Abbildung 62 ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergosterolgehalten der angeimpften Kulturen und der Blindprobe gibt. Zudem kann abgelesen werden, dass in der Mehrheit der Kulturen (unabhängig von Erntetag) sich die Ergosterolgehalte der „pH nativ“-Kulturreihe von denen der „pH 6,0“-Kulturreihe nicht signifikant voneinander unterscheiden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Voreinstellung des pH-Wertes auf 6,0 für den Pilz POS65 in der Gärrestbrühe entgegen der Erwartung keinen Wachstumsvorteil dargestellt hat.

Die Biogas-Endwerte in Abbildung 62 weisen keinen zeitlich erkennbaren Trend auf. Bei der Auftragung der Ergosterolgehalte gegen die Biogasausbeuten wurde ebenfalls kein klarer Zusammenhang festgestellt, anhand dessen sich die Biogasausbeute bei bekanntem Ergosterolgehalt vorhersagen ließe.

Daher kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass entgegen der Erwartung die Voreinstellung des pH-Wertes der Weizenstrohgärrest-Suspensionen zu keiner gesteigerten Biogasausbeute geführt hat.

### **3.7 Kurzzusammenfassung bisheriger Erkenntnisse**

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der bisher durchgeführten Kultivierungen festgehalten werden, dass lediglich in einem einzigen Kultivierungsversuch (Screening nach geeigneten Weißfäulepilzen in Abschnitt 3.3) in den Weizenstrohgärrest-Kulturen, die mit Basidiomyceten angeimpft wurden, signifikant höhere Biogasausbeuten erzielt wurden. Zum damaligen Kenntnisstand bestätigte dies die Realisierbarkeit des Arbeitsziels (Steigerung der Biogasausbeute von Weizenstrohgärrest durch Behandlung mit Basidiomyceten). Als Ergebnis wurde eine große Spannbreite verschiedener Biogasausbeuten (bei Verwendung von 16 unterschiedlichen Weißfäulepilzen) im Bereich von ca. 200 bis 420 NmL/(goTS) erhalten, während die Biogasausbeute der Blindprobe (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension) 233 NmL/(goTS) betrug (s. Abbildung 35). Diese Ergebnisse wurden als stammspezifische Unterschiede zwischen den verwendeten Basidiomyceten, Lignin selektiv abzubauen und somit durch eine verbesserte Zugänglichkeit zu den Kohlenhydratstrukturen (Cellulose und Hemicellulose) die Biogasausbeute zu steigern, interpretiert.

Bei allen darauffolgenden Versuchen galt es, diesen Erfolg durch Variation diverser Parameter (Testen verschiedener Massenverhältnisse von Gärrest zu Inokulum, Variation des Erntezeitpunktes, Kultivierung bei geänderten pH-Wert) so zu optimieren, dass die Biogasausbeute weiter gesteigert wird. Bei jedem dieser Versuche wurden stets in mindestens einer der Kulturen die Bedingungen wie beim erfolgreichen Screening-Experiment (in Abschnitt 3.3) konstant gehalten (pH-Wert, Inokulummasse, Kulturvolumen, Kultivierungsdauer). Die Ergebnisse dieser Kultivierungsversuche haben systematisch gezeigt, dass der einmalig erzielte Erfolg trotz gleicher Bedingungen nicht reproduziert werden konnte: Die Biogasausbeuten der beimpften Kulturen blieben stets im Bereich der Ausbeute der jeweiligen Blindprobe. Eine plausible Erklärung für diese Diskrepanz wurde bisher nicht gefunden.

Ebenfalls wurde bisher bei keinem der untersuchten Parameter (Laccaseaktivität, Gesamtphenolgehalt, Ergosterolgehalt, Inokulummasse) eine Korrelation mit der Biogasausbeute erhalten. Dies wäre insofern bedeutsam, da sich andernfalls durch die schnelle Bestimmung eines chemisch messbaren Parameters die Biogasausbeute prognostizieren ließe, ohne zeitaufwändige GB21-Versuche durchführen zu müssen.

Die weiteren Schritte dieser Arbeit sehen vor, unter anderem eine Kultivierung mit einem Pilz, der aus der Kompostmiete eines Strohgärrestes isoliert wurde, fortzuführen (s. Abschnitt 3.8). Außerdem soll eine Kultivierung unter geringer Nährstoffzugabe erfolgen, um dem Pilz das Anwachsen in der Weizenstrohgärrest-Brühe zu erleichtern (s. Abschnitt 3.9). Dadurch soll zugleich die Produktion ligninolytischer Enzyme begünstigt und die Biogasausbeute gesteigert werden.

### **3.8 Submerse Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* (Wollstieliger Tintling)**

Während der Arbeiten am Institut wurde aus einer Weizenstrohgärrest-Kompostmiete<sup>15</sup> eines hessischen Biogasanlagenbetreibers ein Pilz isoliert, der auf diesem Substrat Fruchtkörper bildete. Gerade weil dieser Pilz augenscheinlich ein gutes Wachstum auf diesem Substrat zeigte, wurde er als ein besonders vielversprechender Kandidat hinsichtlich des Ligninabbaus auf vergorenen strohhaltigen Substraten erachtet.

Durch Verdünnungsausstriche konnte eine Reinkultur dieses Pilzes erhalten werden, der nach ITS-Sequenzierung als *Coprinopsis cinerea*, auch *Coprinus cinereus* genannt (Wollstieliger Tintling), identifiziert wurde. Diesem Pilz wurde die Stammmnummer 324 zugeordnet, sodass im Folgenden dieser Pilz als „CCI324“ bezeichnet wird. *Coprinopsis cinerea* ist in der Literatur als Weißfäulepilz bekannt (Moutaouakkil & Blaghen, 2011; Raymond *et al.*, 2015).

Wie in 3.7 beschrieben, führte bisher die Kultivierung mit der konstanten Inokulummasse von 13 g (Biofeuchtmasse des Pilzpellets) in 8 % Gärresttrockenmasse nur ein einziges Mal zu einer signifikanten Biogasausbeute-Steigerung, was in den darauffolgenden Experimenten trotz Einhaltung gleicher Bedingungen nicht reproduzierbar war. Daher wurde in dem hier vorliegenden Experiment beschlossen, die Inokulummasse auf 20 g zu erhöhen. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde bei nativem pH-Wert des Gärrestes die Kultivierungsdauer variiert. Damit ähnelt dieses

---

<sup>15</sup> Als „Miete“ ist in diesem Zusammenhang ein gestapeltes Schüttgut zu verstehen.

Experiment dem in 3.5 beschriebenen Versuch mit dem Unterschied, dass erstmalig der vielversprechende Basidiomycet *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) kultiviert wurde. Ebenfalls wurden die Basidiomyceten POS65 und TVE84 (in gleicher Reihenfolge der beste und der zweitbeste Stamm aus dem Screening, s. Abbildung 35) mitkultiviert.

Alle drei verwendeten Pilze wurden in je drei Submerskulturen in Suspensionen mit 8 % Weizenstrohgärrest (Trockenmasse) überimpft und diese Kulturen jeweils zu den Tagen 7, 14 und 21 geerntet. Das Kultivierungsschema ist in Abbildung 64 gezeigt.

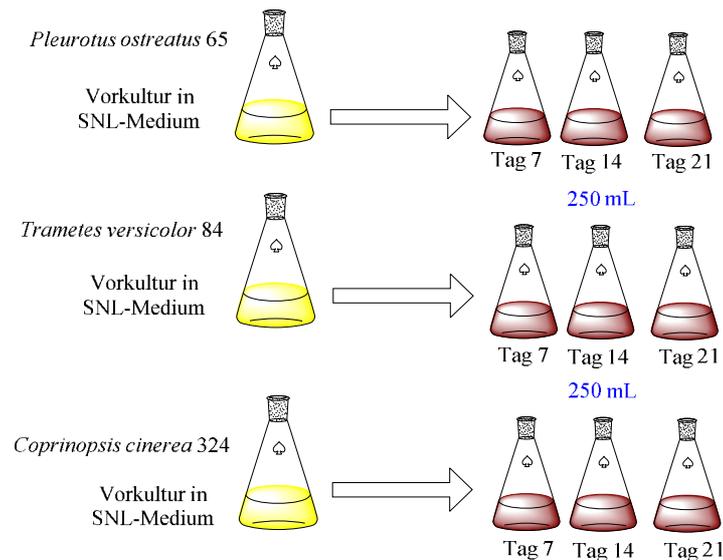


Abbildung 64: Schema der submersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Weizenstrohgärrest. Diese Stämme wurden jeweils in SNL-Medium vorkultiviert und anschließend mit je 20 g Inokulummasse (Pilzbiofeuchtmasse) in autoklavierte Hauptkulturen mit 8 % Weizenstrohgärrest (Trockenmasse) überimpft. Die Kulturvolumina betragen in allen Fällen 250 mL. Die angegebenen Tage geben den jeweiligen Erntezeitpunkt der Kultur an.

Zur Wachstumsbeurteilung wurden (im Gegensatz zur bisher durchgeführten Ergosterolbestimmung) die Kulturen in regelmäßigen Abständen gemäß Abschnitt 2.4 auf SNL-Agar ausplattiert. Das Ausplattieren erfolgte stets aus derjenigen Kultur, die zuletzt geerntet wurde, der „Tag 21“-Kultur. Neben den Biogasmessungen wurden in diesen Kulturen Enzymaktivitäten (Laccasen, Peroxidasen, Cellulasen und Xylanasen) sowie die Ligningehalte gemessen.

Parallel zur submersen Kulturreihe wurde von jedem der drei verwendeten Pilze eine emerse Kultur auf autoklaviertem Gärrest gemäß 2.3.6 angeimpft, um zusätzlich das Wachstumsverhalten der Pilze in dieser Kulturführung zu untersuchen. Von der emersen Kulturen wurden weder Bio-

gasmessungen noch weitere Analysen durchgeführt. Sie dienten lediglich der optischen Beurteilung des Wachstumsverhaltens der drei verwendeten Basidiomyceten auf dem autoklavierten Weizenstrohgärrest.

### 3.8.1 Ergebnisse

#### pH-Werte

Das pH-Zeit-Profil der submersen Kultivierung der drei verwendeten Weißfäulepilze (POS65, TVE84 und CCI324) ist in Abbildung 65 dargestellt.

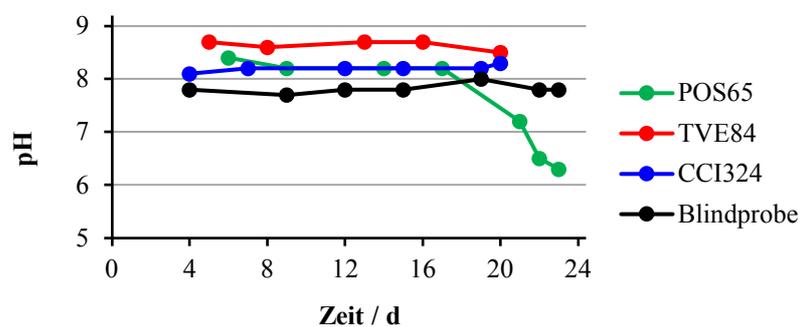


Abbildung 65: pH-Zeit-Profil der submersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet.

#### Enzymaktivitäten

Die Laccaseaktivitäten sind in Abbildung 66 gezeigt.

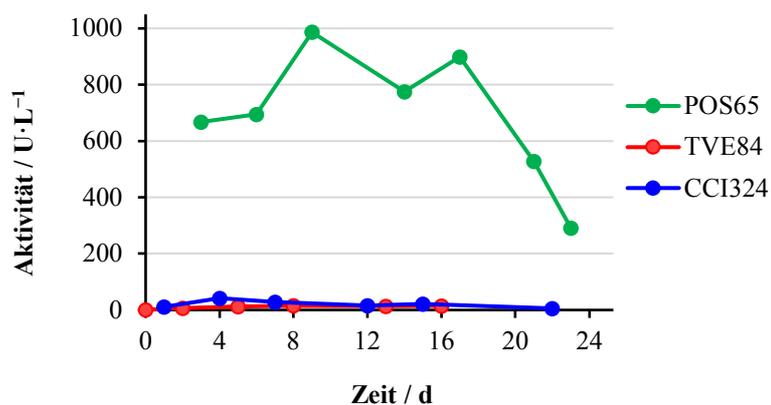


Abbildung 66: Laccaseaktivitäten der submersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). Die Blindprobe (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension) zeigte an keinem Tag messbare Aktivitäten.

Es wurden weder Peroxidase- noch Cellulaseaktivitäten festgestellt. Die Aktivitäten von Xylanasen (gemessen nach der in 2.5.3 beschriebenen Methode) fanden sich lediglich in den Kulturüberständen von CCI324, was in Abbildung 67 gezeigt ist.

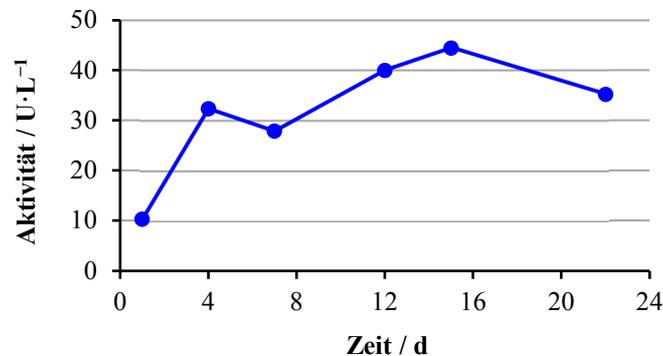


Abbildung 67: Xylanaseaktivitäten in den Kulturüberständen von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). In den Kulturüberständen von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) sowie der Blindprobe (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension) wurden keine Xylanaseaktivitäten detektiert.

### Ligninbestimmung

Die Ergebnisse der gravimetrischen Ligninbestimmung in den submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen sind in Abbildung 68 dargestellt. Die Ligninbestimmung wurde nach dem in 2.8 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

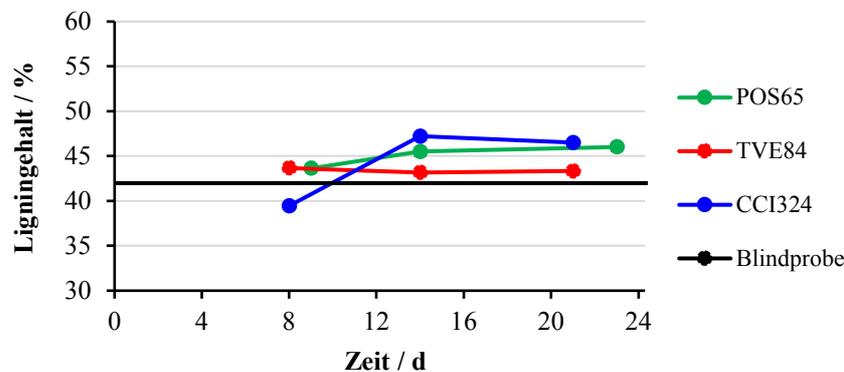


Abbildung 68: Relative Ligningehalte in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und des *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). Es wurde für jede Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Da die Standardabweichungen stets im Bereich von 0,3-3,0 % lagen, wurden sie in diesem Diagramm (in Form von Fehlerbalken) nicht berücksichtigt. In der Blindprobe (nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension) wurde ein Ligningehalt von 42 % gemessen.

### Biogasergebnisse

Die vollständigen Daten der Biogasmessungen sind in Abbildung 69 dargestellt. Für eine genauere Betrachtung sind in Abbildung 70 die Biogas-Endwerte angegeben.

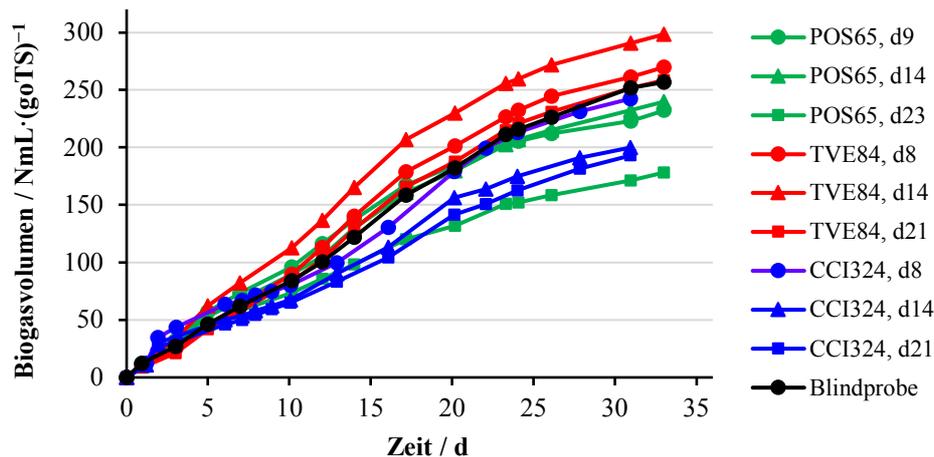


Abbildung 69: Biogasergebnisse der submersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag der Kultur. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet. Auf das Einzeichnen der Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurde übersichtshalber verzichtet.

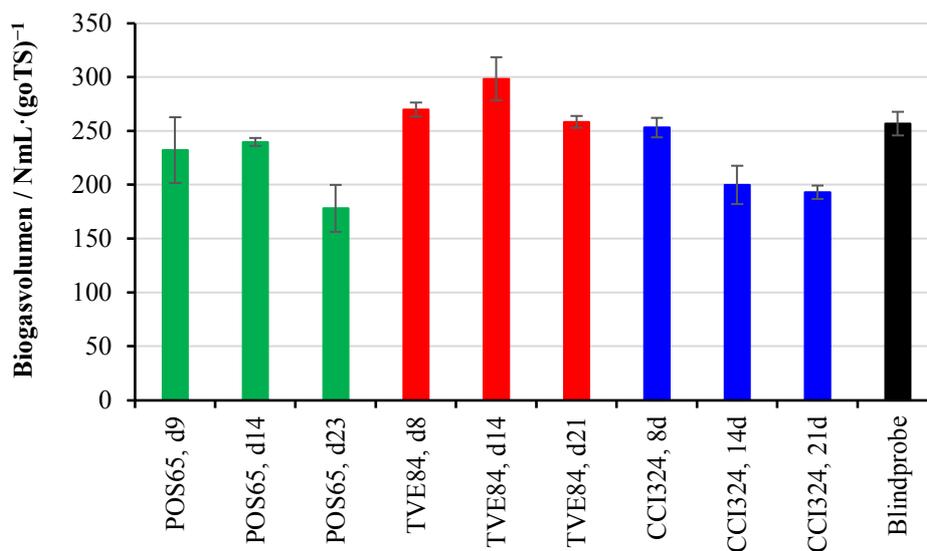


Abbildung 70: Biogasergebnisse der submersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64). Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag der Kultur. Als Blindprobe wurde eine unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet. Es wurden hier die Biogas-Endwerte für die jeweilige Kultur aus Abbildung 69 angegeben.

### Vitalitätskontrolle durch Ausplattieren

Die submersen Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen auf SNL-Agar ausplattiert, um die Vitalität der Pilze zeitlich zu verfolgen. Abbildung 71 zeigt das Resultat.

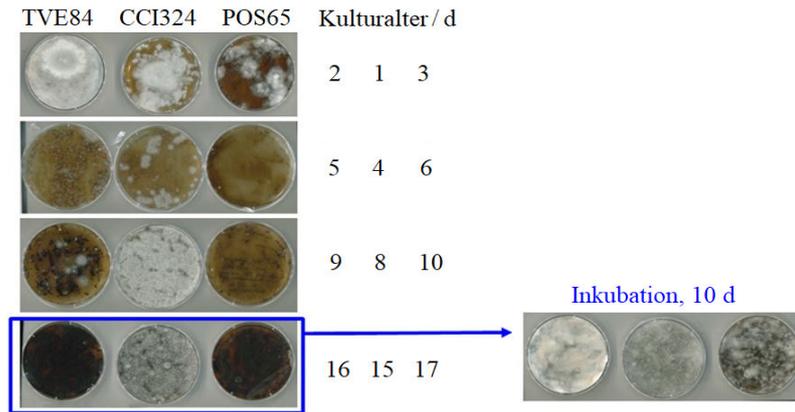


Abbildung 71: Ergebnisse der Vitalitätskontrolle durch Ausplattieren der submersen Kulturen der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in 8 % Weizenstrohgärrest (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 64) auf SNL-Agar. Alle Kulturen wurden zum jeweils angegebenen Kultivierungstag (gemäß des in 2.4 beschriebenen Verfahrens) ausplattiert und die Platten 3-4 Tage im Brutschrank bei 24 °C inkubiert. Die unterste Plattenreihe wurde bis zum 10. Tag weiter inkubiert (rechts dargestellt).

### Emerse Kultivierungen

Von den drei verwendeten Basidiomyceten zeigte lediglich CCI324 auf dem Weizenstrohgärrest die Ausbildung von Fruchtkörpern und die Bildung von Myzel, was in Abbildung 72 gezeigt ist.

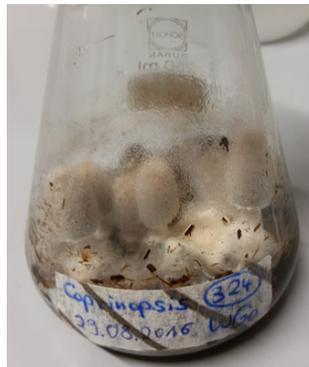


Abbildung 72: Ausbildung von Fruchtkörpern von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest. Die emersen Kulturen von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) sowie die Blindprobe waren nicht bewachsen.

## 3.8.2 Diskussion

### pH-Werte

Die Ergebnisse zeigen, dass die pH-Werte der Kulturen und die der Blindprobe sich meist im alkalischen Bereich befanden. Eine Ansäuerung des Kulturmediums durch den Basidiomyceten selbst wurde lediglich bei POS65 ab dem 17. Kultivierungstag beobachtet. Entgegen dem ursprünglichen Plan, alle Kulturen am 21. Tag zu ernten, wurde – um den Verlauf des pH-Werts weiter zu beobachten – die Kultur von POS65 erst am 23. Tag geerntet. Der pH-Abfall in diesem

Experiment ähnelt der Beobachtung im Screening-Versuch (Abbildung 29), in der POS65 ab dem 14. Kultivierungstag das Medium angesäuert hat. Allerdings steht diese Beobachtung im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Kultivierungen (unter denselben Bedingungen), in denen kein Absinken des pH-Werts über die Zeit erfolgte (s. Abbildung 51 und Abbildung 59). Dies bedeutet, dass die mehrmalige Kultivierung des gleichen Stammes zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht unbedingt zu reproduzierbaren pH-Zeit-Profilen führt.

### Enzymaktivitäten

Während dieser Kultivierung zeigten lediglich POS65 und CCI324 messbare Laccaseaktivitäten, während TVE84 und die Blindprobe keine Aktivitäten aufwiesen.

Die Höhe der Laccaseaktivitäten bei POS65 lag im Bereich 250-1000 U/L. Vergleichbar hohe Aktivitäten von bis zu 1000 U/L wurden in einem zuvor durchgeführten Versuch bereits gemessen (Abbildung 52). Im Falle von TVE84 wurden Laccaseaktivitäten von bis zu 15 U/L detektiert. Damit weicht dieses Ergebnis von dem des Screening-Versuchs, in dem TVE84 mit ca. 250 U/L relativ hohe Aktivitäten (Abbildung 30) zeigte, um mehr als den Faktor 10 ab.

Es wurden in diesem Versuch in keiner der Kulturen Peroxidaseaktivitäten festgestellt. Das grundsätzliche Potential von *Coprinopsis cinerea* zur Produktion von Peroxidasen ist in der Literatur allerdings bekannt (Aitken & Heck, 1998; Kjalke *et al.*, 1992). Mögliche Gründe für das Ausbleiben von Peroxidaseaktivitäten in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen wurden bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert: Demnach haben bisher alle verwendeten Basidiomyceten bei einer Konzentration von 8 % Trockenmasse des Gärrestes bisher in keinem der Experimente Peroxidasen sekretiert. Dies lässt den Schluss zu, dass der Weizenstrohgärrest auf alle bisher verwendeten Basidiomyceten oberhalb einer bestimmten Konzentration eine toxische Wirkung hat, sodass die Sekretion von Peroxidasen ausbleibt. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse dieses Versuchs bestätigt.

Hinsichtlich der Aktivitäten kohlenhydratabbauender Enzyme konnten keine Cellulaseaktivitäten nachgewiesen werden, was für das zu erreichende Projekt zielführend ist, da gerade ein minimaler Kohlenhydratabbau für eine maximale Biogasausbeute nötig ist. Grundsätzlich ist *Pleurotus ostreatus* in der Lage, auf lignocellulosehaltigen Substraten Cellulasen zu produzieren. In der Literatur führte die Kultivierung dieser Spezies auf Sägemehl, Reisstroh und Zuckerrohr-Bagasse

zur Aktivität von Endo- und Exoglucanasen und  $\beta$ -Glucosidasen (Khalil *et al.*, 2011), die in ihrer Gesamtheit als „Cellulasen“ erachtet werden können (s. Abschnitt 2.5.2).

Bezüglich des enzymatischen Hemicelluloseabbaus wurden Xylanaseaktivitäten lediglich in den Kulturüberständen von CCI324 in Höhe von maximal 45 U/L gefunden. In der Literatur führte die Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* auf lignocellulosehaltigen Substraten (Weizenkleie, Zuckerrohr-Bagasse, Weizenstroh und Reisstroh) dagegen zu höheren Xylanaseaktivitäten von 23-467 U/mL, d.h. 23 000-460 000 U/mL (Dutt *et al.*, 2013).

Allerdings wurde in dieser Arbeit einerseits ein submerses Kultivierungsverfahren angewendet, wohingegen in den beiden hier zitierten Literaturquellen ein emerses Verfahren zum Einsatz kam. Andererseits handelt es sich beim Weizenstrohgärrest um ein vergorenes Produkt, während in den beiden Literaturquellen nicht-fermentierte Substrate eingesetzt wurden. Insofern lassen sich die eigens erzielten Ergebnisse nicht direkt mit den Literaturdaten vergleichen. Allerdings stehen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Literaturdaten nicht im Widerspruch, da *Coprinopsis cinerea* in beiden Fällen in Gegenwart lignocellulosehaltiger Substrate Xylanasen produziert hat.

### Ligninbestimmung

Die Ergebnisse der Ligninbestimmung zeigen, dass in nahezu allen gemessenen Kulturen die relativen Ligningehalte höher sind als in der Blindprobe. Die einzige Ausnahme ist in diesem Fall die Kultur von CCI324 am 7. Erntetag, die mit 39 % einen geringeren Ligningehalt als die Blindprobe (42 %) aufwies.

Es sei an dieser Stelle betont, dass es sich hierbei um prozentuale Ligningehalte handelt, die das Verhältnis von Ligninauswaage auf die Einwaage des getrockneten Kulturaliaquots (getrocknetes Homogenat der Pilz/Gärrest-Kultur) bezogen wurden. Zwar lassen sich mit dieser Berechnungsmethode prozentuale Änderungen der Kulturproben feststellen, jedoch ist keine Aussage über die Änderung der absoluten Ligningehalte möglich. Allgemein führt der selektive Ligninabbau zu einer relativen Ligninanteil-Erniedrigung, während die Veratmung der restlichen Bestandteile des Gärrestes durch die Basidiomyceten zu einer relativen Ligninanteil-Erhöhung führt.

Da allerdings der Ligninabbau bevorzugt im sauren Milieu erfolgt (dies wurde bereits in Abschnitt 3.3.2 diskutiert), der pH-Wert des Mediums jedoch während der Kultivierung der drei Basidiomyceten POS65, TVE84 und CCI324 meist im alkalischen Bereich war, ist davon auszugehen, dass kein Lignin abgebaut wurde. Daher sprechen die Ergebnisse der Ligninbestimmung

(Abbildung 68) dafür, dass die verwendeten Basidiomyceten andere Gärrestbestandteile (z.B. Cellulose, Hemicellulose und wasserlösliche organische Substanzen) zum Teil metabolisiert haben, was zu einer gemessenen prozentualen Ligninanteil-Erhöhung geführt hat.

### Biogasergebnisse

Die Biogasergebnisse dieser Kultivierung sind in Abbildung 69 gezeigt. Darin zeigt sich, dass lediglich in einer Kultur von TVE84 (zu Tag 14) eine erhöhte Biogausausbeute gemessen wurde, während in allen anderen Kulturen entweder keine signifikante Steigerung erzielt wurde oder die Biogausausbeute signifikant niedriger als die der Blindprobe (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension) ausfiel.

Diese Biogasergebnisse konnten nicht widerspruchsfrei mit den Ergebnissen der Laccaseaktivitäten (Abbildung 66) und Xylanaseaktivitäten (Abbildung 67) in Einklang gebracht werden, was sich durch folgende beide Befunde zeigt:

- Bei POS65 wurden (verglichen mit TVE84 und CCI324) die höchsten Laccaseaktivitäten und keine Xylanaseaktivitäten festgestellt. Daher wäre zu erwarten gewesen, dass dieser Pilz die höchsten Biogausausbeuten erbringt. Aus Abbildung 70 geht allerdings hervor, dass die Biogausausbeuten der POS65-Kulturen stets geringer sind als die der Blindprobe.
- Bei TVE84 wurden weder nennenswerte ligninolytische noch kohlenhydratabbauende Enzymaktivitäten festgestellt. Dennoch liegt die Biogausausbeute der TVE84-Kultur, die am 14. Kultivierungstag geerntet wurde, geringfügig oberhalb des Blindprobenbiogawerts. Dagegen weisen die Biogausausbeuten der TVE84-Kulturen am 7. und 21. Erntetag keinen signifikanten Unterschied zur Blindprobe auf.

Bei CCI324 wurden Laccaseaktivitäten von bis zu 41 U/L und keine Peroxidaseaktivitäten detektiert. Die Xylanaseaktivitäten lagen in den entnommenen Kulturüberständen bei 10-45 U/L (Abbildung 67). Dies steht im Einklang mit den Biogasergebnissen, da hierbei die Biogausausbeuten stets geringer als die der Blindprobe waren. Je länger die Weizenstrohgärrest-Kulturen mit CCI324 inkubiert wurden, desto geringer fiel die gemessene Biogausausbeute aus (s. Abbildung 70).

### Vitalitätskontrolle durch Ausplattieren

Durch das Ausplattieren wurde gezeigt, dass alle drei verwendeten Basidiomyceten in der Weizenstrohgärrest-Brühe bis zum 15. Kultivierungstag vital waren. Am 16. bzw. 17. Kultivierungstag war die Vitalität von TVE84 bzw. POS65 erst dann erkennbar, wenn die Agarplatten länger inkubiert wurden (s. Abbildung 71, rechts). Auffällig ist, dass die ausplattierten Kulturen von CCI324 meist eine höhere Myzeldichte aufwiesen als die von POS65 und TVE84. Allgemein hat sich in diesem Kultivierungsversuch der Basidiomycet CCI324 als besonders vital im Vergleich zu POS65 und TVE84 erwiesen.

Erwartungsgemäß wurde bei allen drei Basidiomyceten ein sukzessiver Vitalitätsverlust festgestellt, da die Myzeldichte mit zunehmender Kultivierungsdauer auf der Agarplatte abnahm. Dies bedeutet vermutlich, dass es sich hierbei eher um ein Überleben der Pilze in der Gärrestbrühe als um vitales Leben handelt.

### Emerse Kultivierungen

Die emerse Kultivierung zeigte, dass von den drei getesteten Pilzen lediglich *Coprinopsis cinerea* 324 deutlich sichtbare Anzeichen von Leben auf dem autoklavierten Gärrest zeigte. Es waren sowohl Myzel als auch Fruchtkörper zu beobachten. Dies bestätigt die These, die bereits eingangs in Abschnitt 3.8 geäußert wurde, dass dieser Stamm ein gutes Wachstum auf vergorenen strohhaltigen Substraten zeigt.

Die Tatsache, dass die Pilze POS65 und TVE84 dagegen weder Myzel- und Fruchtkörper bildeten, deutet darauf hin, dass zwischen diesem Gärrest und dem natürlichen Habitat dieser Pilze, nämlich Totholz, zu große Unterschiede bestehen, sodass ein Wachstum auf dem Weizenstrohgärrest kaum möglich ist.

### **3.8.3 Bewertung der Ergebnisse**

Die isolierte Betrachtung der Biogasdaten führt zur Aussage, dass in diesem Experiment die Biogasausbeute lediglich mit Hilfe des Basidiomyceten TVE84 bei 14-tägiger Kultivierungsdauer gesteigert werden konnte. Allerdings ist dieses vermeintlich positive Ergebnis zu hinterfragen, da eine Steigerung des Biogasertrags nur dann als (im Sinne des in Abschnitt 1.4 beschriebenen Arbeitsziels) erfolgreich und bedeutsam gilt, wenn während der Kultivierung zugleich Lignin abgebaut wurde. Die Messung der Ligningehalte widerlegt jedoch einen selektiven Ligninabbau in den TVE84-Kulturen. Zudem war im Falle von TVE84 kein Absinken des pH-Werts während

der Kultivierung zu beobachten, sodass der pH-Wert durchgehend im alkalischen Bereich lag, in dem keine Aktivität ligninolytischer Enzyme zu erwarten ist. Dies lässt am Biogasergebnis der Kultur von TVE84 zu Tag 14 zweifeln.

Die Biogasausbeuten der Gärrestkulturen, die mit den Stämmen POS65 und CCI324 beimpft wurden, zeigten dagegen geringere Biogasausbeuten als die Blindprobe, was mit den gemessenen Daten (Enzymaktivitäten und Ligningehalte) nicht im Widerspruch steht.

Für zukünftige Versuche wird daher eine andere Strategie verwendet werden müssen, z.B. die gezielte Supplementierung von Nährstoffen. Dadurch soll eine höhere Vitalität der Weißfäulepilze als in den bisherigen Versuchen erzielt werden, wodurch zugleich die Aktivität ligninolytischer Enzyme gesteigert und infolgedessen die Biogasausbeute erhöht werden soll. Dies ist Gegenstand des nachfolgend beschriebenen Experiments.

### **3.9 Submerse Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* in unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen unter Nährstoffzugabe**

Bisher wurde in allen submersen Kultivierungen stets eine Weizenstrohgärrest-Konzentration von 8 % Trockenmasse verwendet. In diesem Versuch wurde neben 8 % zusätzlich mit geringeren Weizenstrohgärrest-Konzentrationen gearbeitet, wobei die Wahl auf 4 % und 6 % fiel. Durch die gezielte Verringerung der Gärrestkonzentration sollte überprüft werden, ob und inwieweit der Ligninabbau im Vergleich zu 8 % Trockenmasse effizienter erfolgt und ob infolgedessen die Biogasausbeute gesteigert werden kann.

Unter wirtschaftlichen Aspekten ist die Nachbehandlung von Gärresten mit Weißfäulepilzen umso vorteilhafter, je höher die eingesetzte Gärrestkonzentration ist. Falls durch Weißfäulepilze die Biogasausbeute generell in einem wirtschaftlich attraktiven Maße gesteigert werden kann, wäre solch ein Nachbehandlungsprozess bei dem größtmöglichen Substrat-Durchsatz am rentabelsten. Dies ist im Falle submerser Kultivierungen bei 8 % Weizenstrohgärrest-Trockenmasse (der höchsten Konzentration, bei der die Suspension technisch noch pumpbar ist) der Fall.

Bisher resultierte in keinem der durchgeführten Versuche (abgesehen vom Screening-Versuch in Abschnitt 3.3) eine gesteigerte Biogasausbeute. Als Ursache dafür wurde bereits in Abschnitt 3.3.2 vermutet, dass der Gärrest, da es sich hierbei um ein fermentiertes Produkt handelt, eine toxische Wirkung auf den Pilz hat. Folglich würde, basierend auf dieser Hypothese, eine Verringerung der Gärrestkonzentration zu einer geringeren Toxizitätswirkung führen, sodass die Vitalität des Pilzes

und die Produktion ligninolytischer Enzyme erhöht und somit das Potential zum Ligninabbau gesteigert werden würde.

Des Weiteren wurde in diesem Experiment erstmalig eine Supplementierung von Nährstoffen durchgeführt, die dem Pilz als Starthilfe dienen sollten. Dazu wurden in die Kulturbrühe 10 g/L Glucose Monohydrat und 2,4 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  zugegeben. Die Wahl dieser Substanzen ist in der leichten Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle begründet. Die Konzentrationen dieser Substanzen wurden in Anlehnung an die Zusammensetzung des SNL-Mediums (Tabelle 4 in Abschnitt 1.1.5) gewählt, in dem Glucose ebenfalls eine Konzentration von 10 g/L aufweist. Die molare Stickstoffkonzentration ist in beiden Medien mit 0,03 mol/L ebenfalls gleich, wobei im SNL-Medium 4,5 g/L Asparagin Monohydrat als N-Quelle zum Einsatz kam, während im hier vorliegenden Gärrestmedium dagegen 2,4 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  verwendet wurden. Zudem weisen beide Verbindungen jeweils zwei Stickstoffatome pro Formeleinheit auf. Die Wahl von Ammoniumnitrat anstelle von Asparagin Monohydrat wurde in diesem Versuch aufgrund des kommerziell deutlich geringeren Preises von Ammoniumnitrat getroffen.

In diesem Versuch wurde mit einer neuen Charge des Weizenstrohgärrestes gearbeitet, da die ursprüngliche Charge bezüglich der Gärrestmenge nicht ausgereicht hat.

Als zu kultivierender Pilz wurde in diesem Experiment *Coprinopsis cinerea* 324 gewählt, da dieser Pilz (neben POS65 und TVE84) im vorherigen Versuch die beste Vitalität im Rahmen einer dreiwöchigen Kultivierungszeit in Suspensionen von Weizenstrohgärrest aufwies. Ähnlich wie im vorherigen Versuch wurden die Kulturen in der Weise angesetzt, dass zugleich Aussagen zur Erntekinetik im Hinblick auf die Maximierung der Biogasausbeute getroffen werden können. Dazu wurden die Kulturen der unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen nach jeweils 7, 14 und 21 Tagen geerntet. Das Kultivierungsschema ist in Abbildung 73 dargestellt.

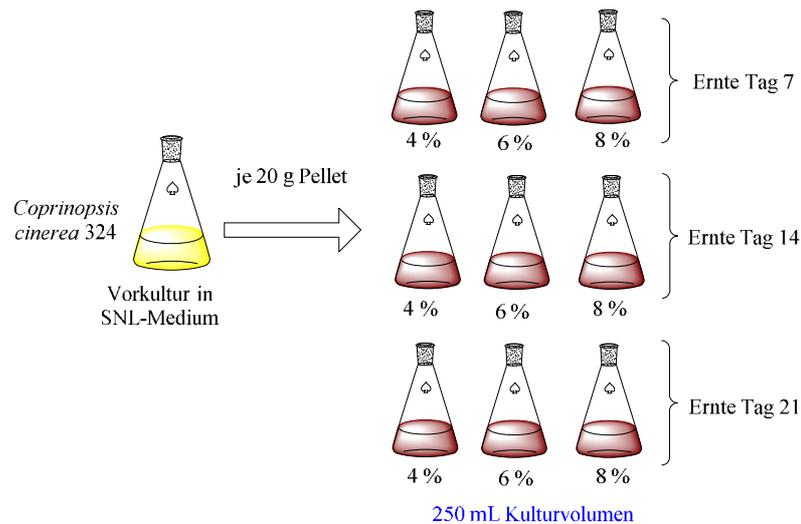


Abbildung 73: Kultivierungsschema zur submersen Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Weizenstrohgärrest unterschiedlicher Konzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse. In allen Kulturen wurden nach dem Autoklavieren Endkonzentrationen von 10 g/L Glucose Monohydrat und 2,4 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  eingestellt. Die Kulturvolumina betragen jeweils 250 mL. Blindproben von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse und äquimolaren Konzentrationen von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wurden ebenfalls mitgeführt (hier nicht dargestellt).

Die Kulturen wurden so vorbereitet, dass zuerst eine Gärrest-Suspension (zunächst in einem Volumen < 250 mL) hergestellt und autoklaviert wurde und anschließend Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in gelöster Form über Sterilfilter zugegeben wurden. Durch die Zugabe dieser zusätzlichen Volumina wurde jeweils ein Endvolumen von 250 mL erreicht.

Wie bereits in den vorherigen Experimenten wurden in dieser Kultivierung zusätzlich zur Biogasausbeute weitere Parameter während der Kultivierung gemessen (pH-Wert, Enzymaktivitäten, Ligningehalt). Dies ist nachfolgend beschrieben.

### 3.9.1 Ergebnisse

#### pH-Werte

Das pH-Zeit-Profil der Kultivierung von CCI324 ist in Abbildung 74 gezeigt.

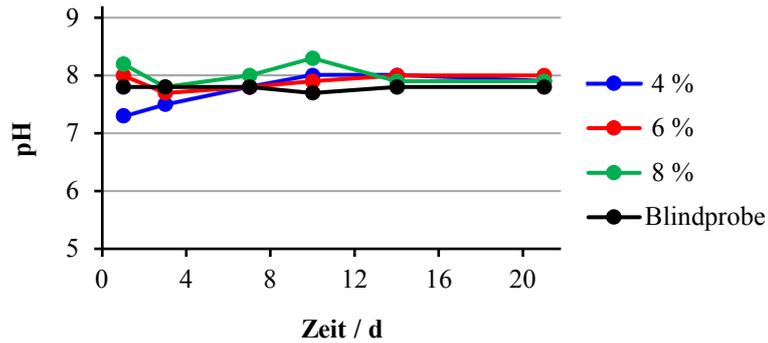


Abbildung 74: pH-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 73) von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse. Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension verwendet.

### Enzymaktivitäten

Die Ergebnisse der Laccaseaktivitäten sind in Abbildung 75 und die der Xylanaseaktivitäten in Abbildung 76 gezeigt.

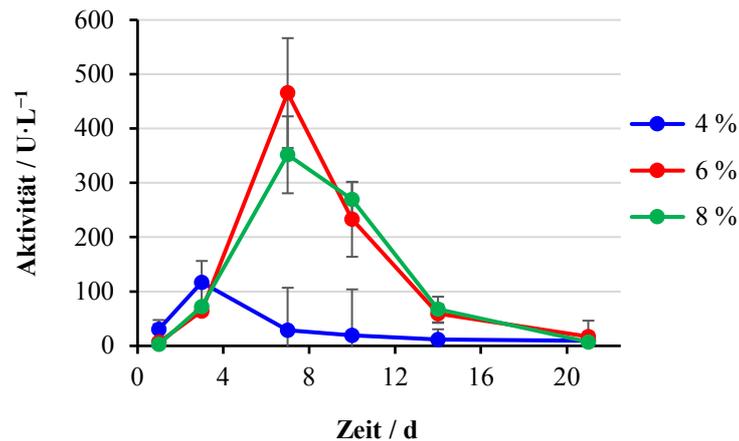


Abbildung 75: Laccaseaktivitäts-Zeit-Profil der submersen Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Weizenstrohgärrest-Konzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 73). Die Blindproben (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Kulturen) wiesen keine messbaren Laccaseaktivitäten auf.

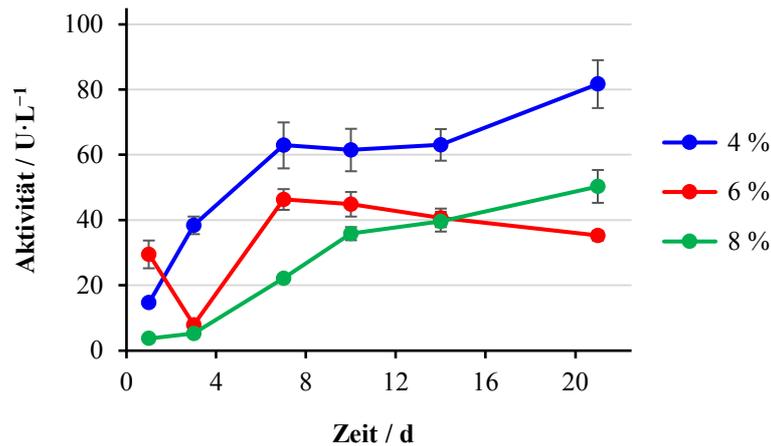


Abbildung 76: Xylanaseaktivitäts-Zeit-Profil der Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Weizenstrohgärrest-Konzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 73). Die Blindproben (unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Kulturen) wiesen keine messbaren Xylanaseaktivitäten auf.

In den Kulturüberständen wurden weder Cellulase- noch Peroxidaseaktivitäten festgestellt.

### Ligningehalte

Die Ergebnisse der Ligninbestimmung sind in Abbildung 77 gezeigt.

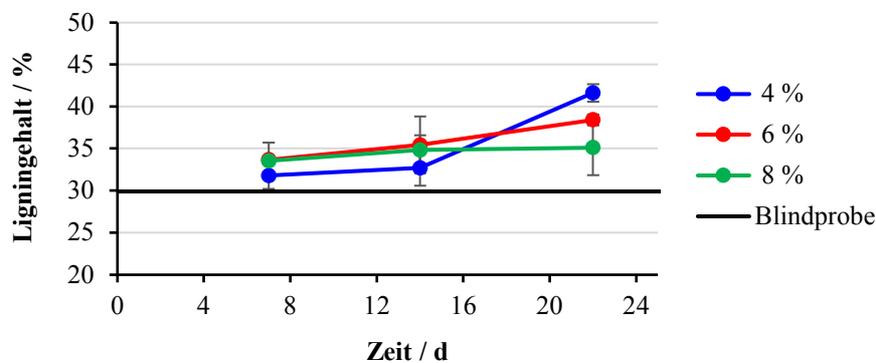


Abbildung 77: Ergebnisse der gravimetrischen Ligninbestimmung der submersen Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen (4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 73. Als Blindproben wurden nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspensionen verwendet.

### Biogasergebnisse

Die vollständigen Biogasergebnisse sind in Abbildung 78 dargestellt. Zwecks einer besseren Übersicht wurden in Abbildung 79 separat die dazugehörigen Biogas-Endwerte gezeigt.

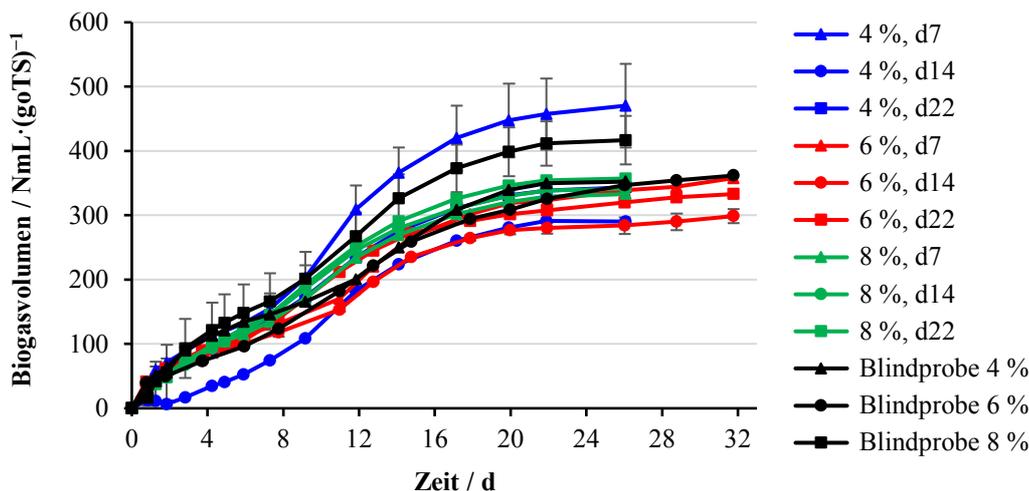


Abbildung 78: Biogasergebnisse zur submersen Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 73). Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag der Kultur. Als Blindproben wurden nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspensionen entsprechender Konzentrationen verwendet.

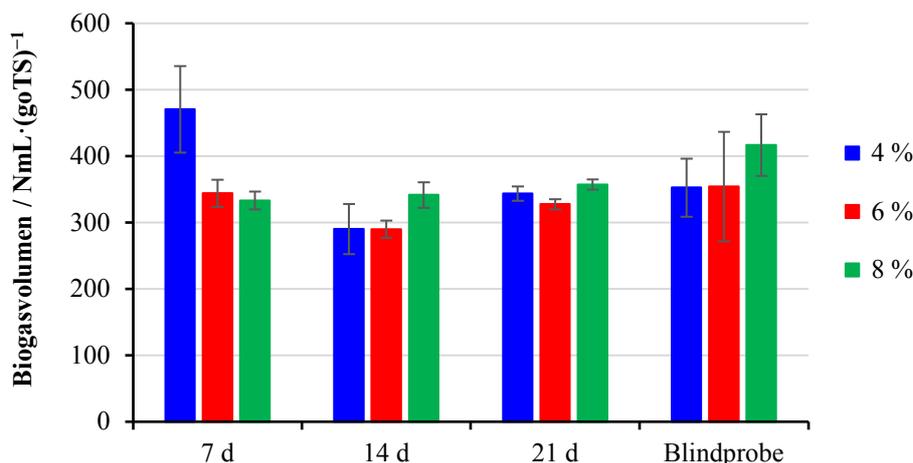


Abbildung 79: Biogasergebnisse der Kultivierung von *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in unterschiedlichen Weizenstrohgärrest-Konzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse (gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 73). Die hier dargestellten jeweiligen Biogas-Endwerte wurden aus Abbildung 78 abgelesen. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag der Kultur. Als Blindproben wurden nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspensionen entsprechender Konzentrationen verwendet. Als Fehlerbalken wurde jeweils die Standardabweichung (Dreifachbestimmung) angegeben.

### 3.9.2 Diskussion

#### pH-Werte

Die Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert in allen Kulturen während der gesamten Zeit zwischen 7,2 und 8,2 lag. Demnach wurde der native pH-Wert des Gärrestes von ca. 8,0 durch den Pilz in keiner Kultur nennenswert geändert. Damit ähnelt dieses Ergebnis dem zeitlichen pH-Verlauf einer früheren Kultivierung von CCI324 in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen (s. Abbildung 65). Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass die Nährstoffzugabe von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  keine

Auswirkungen auf den zeitlichen pH-Verlauf der Kultivierung von CCI324 in submersen Weizenstrohgärrest-Kulturen hatte.

### Enzymaktivitäten

In diesem Kultivierungsversuch wurden Laccaseaktivitäten bis zu 466 U/L festgestellt. Damit ist dieser Wert ca. um den Faktor 10 größer als die Laccaseaktivitäten von *Coprinopsis cinerea* 324 im vorherigen Versuch (Abbildung 66 in Abschnitt 3.8.1), in dem keine Supplementierung von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  erfolgte. Vermutlich führte die Anwesenheit dieser leicht bioverfügbaren Nährstoffe zur vermehrten Produktion und Sekretion von Laccasen.

Die Xylanaseaktivitäten zeigten im Falle aller drei Gärrestkonzentrationen mit Aktivitäten bis maximal 80 U/L (Abbildung 76), dass *Coprinopsis cinerea* 324 die Hemicellulose-Einheiten als Nahrungsquelle genutzt hat. Insgesamt wurden die höchsten Xylanaseaktivitäten im Falle der Gärrestkonzentration von 4 % Trockenmasse gemessen, während im Falle von 6 % und 8 % die Aktivitäten mit durchschnittlich ca. 40 U/L vergleichbar hoch waren.

### Ligningehalte

Die Ergebnisse der gravimetrischen Ligninbestimmung zeigen, dass die Blindprobe der hier verwendeten Gärrestcharge einen Ligningehalt von 30 % (Abbildung 77) aufweist. Damit unterscheidet sich diese Gärrestcharge von der bisher verwendeten Charge mit einem Ligningehalt von 42 % (Abbildung 68).

Die Ergebnisse zeigen, dass in den beimpften Kulturen mit verschiedenen Weizenstrohgärrest-Trockenmassen gegenüber der Blindprobe (30 % Lignin) höhere Ligningehalte von 32-42 % gemessen wurden. Zu einem ähnlichen Befund kam es bereits in einer zuvor durchgeführten Kultivierung (Abbildung 68), in der die beimpften Kulturen prozentual höhere Ligningehalte aufwiesen als die unbeimpfte Blindprobe. Die Interpretation solcher Ergebnisse wurde bereits in 3.8.2 behandelt: Demnach ist die Zunahme des relativen Ligningehalts nur dadurch zu erklären, dass der Kohlenhydratabbau gegenüber dem Ligninabbau begünstigt ist. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen, da die vorhandenen Xylanaseaktivitäten für einen Hemicelluloseabbau sprechen, wobei ein Ligninabbau angesichts fehlender Peroxidaseaktivitäten nicht möglich war.

### Biogasergebnisse

Es sei hier noch einmal angemerkt, dass in diesem Kultivierungsversuch erstmalig eine Supplementierung von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  erfolgte. Diese sollten dem Pilz als „Starthilfe“ dienen, nachdem dieser aus der Vorkultur (Vollmedium) in die Weizenstrohgärrest-Brühe überimpft wurde.

Bei der Betrachtung der Biogasergebnisse fällt auf, dass die Mehrheit der angeimpften Kulturen mit 4 %, 6 % und 8 % Weizenstrohgärrest-Trockenmasse keine signifikant höheren Biogasausbeuten als die dazugehörigen Blindproben (gleicher Gärrest-Trockenmassen) erbracht haben.

Zudem wurde beim Vergleich der hier erzielten Biogasergebnisse mit den Ergebnissen der vorherigen Kultivierungen festgestellt, dass erwartungsgemäß (aufgrund der Supplementierung von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) die Biogasausbeute der Blindprobe mit 8 % Weizenstrohgärrest-Trockenmasse einen Wert von 417 NmL/goTS) erreichte, während in den zuvor durchgeführten Versuchen (mit 8 % Weizenstrohgärrest-Trockenmasse ohne Supplementierung von Nährstoffen) ca. halb so große Biogasausbeuten erzielt wurden<sup>16</sup>.

Da alle Proben in diesem Experiment im Vorfeld autoklaviert wurden, können diese supplementierten Nährstoffe nicht durch Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen verbraucht worden sein. Daher bedeutet dies, dass diese Nährstoffe von den Mikroorganismen des Impfschlammes, der für die Biogasmessungen verwendet wird, genutzt wurden, was die erhöhten Biogasausbeuten erklärt.

Die Tatsache, dass bis auf die „Tag 7, 4 %“-Kultur (Abbildung 78) alle Kulturen verglichen zur jeweiligen Blindprobe niedrigere Biogasausbeuten aufwiesen, bedeutet dass der Basidiomycet CCI324 die supplementierte Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als Nahrungsquellen genutzt haben muss. Warum allerdings in der „Tag 7, 4 %“-Kultur die Biogasausbeute erhöht war, konnte nicht geklärt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von Glucose und Ammoniumnitrat, zweier leicht bioverfügbarer Nährstoffquellen, die dem Basidiomyceten als Starthilfe in der Gärrestbrühe dienen sollten, in der Mehrheit der Kulturen zu keiner gesteigerten Biogasausbeute

---

<sup>16</sup> 257 NmL/(goTS) in Abbildung 69, 232 NmL/(goTS) in Abbildung 62 und 233 NmL/(goTS) in Abbildung 35.

(verglichen zur jeweiligen Blindprobe der entsprechenden Weizenstrohgärrest-Konzentration) geführt hat. Zudem hat die Supplementierung der Nährstoffe die Auswertung der Biogasergebnisse sehr erschwert. Somit konnte nicht differenziert werden, ob eine Änderung hinsichtlich der Biogasausbeute einer Kultur tatsächlich auf einen Ligninabbau durch den Pilz zurückzuführen war oder lediglich auf die Supplementierung an sich.

### 3.9.3 Bewertung der Ergebnisse

Neben dem bereits zuvor beschriebenen Versuch 3.6, in dem mit Hilfe eines Puffers der pH-Wert der Gärrestkulturbrühe auf 6,0 voreingestellt wurde, um die ligninolytischen Aktivitäten zu maximieren, stellte der hier beschriebene Versuch den zweiten Ansatz dar, in dem ein Input<sup>17</sup> vorgenommen wurde, um die Biogasausbeute zu maximieren. Bei diesem Versuch wurden den Kulturen vor der Animpfung einmalig Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  zugegeben, die dem Pilz als Start-Nahrungsquellen dienen sollten und somit die Pilzvitalität und damit indirekt die Produktion ligninolytischer Enzyme (Laccasen und insbesondere Peroxidasen) vereinfachen bzw. überhaupt erst ermöglichen sollten.

Bei der Betrachtung der Biogasergebnisse galt es, zwei Aspekte zu berücksichtigen:

1. Die Supplementierung von Glucose und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  hat die Auswertung der Biogasergebnisse erschwert.
2. Trotz der Supplementierung konnte in den Kulturen, die mit dem Weißfäulepilz *Coprinopsis cinerea* 324 angeimpft wurden, in acht von neun Kulturen kein signifikanter Anstieg der Biogasausbeute im Vergleich zum unbeimpften Gärrest erreicht werden. Dies bedeutet, dass in der Mehrheit der Kulturen der Output (d.h. das Biogas) den Input (d.h. die Zugabe der Nährstoffe) nicht kompensiert hat.

Insgesamt lässt sich resümieren, dass die Supplementierung der Nährstoffe keinen Vorteil hinsichtlich einer ligninabbau-basierten Steigerung der Biogasausbeute erbracht hat.

In den zukünftigen Experimenten wird daher auf Nährstoffzugaben in die Kulturen verzichtet.

---

<sup>17</sup> Unter einem Input ist in diesem Zusammenhang die Zugabe von Nährstoffen bzw. puffernden Substanzen in die Kulturbrühe zu verstehen.

### 3.10 Untersuchung der Biogasausbeute in Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung des Gärrestes

Bisher wurde in allen Kultivierungsversuchen der Gärrest vor der Animpfung autoklaviert. Dadurch wurde die im Gärrest enthaltene Mikroflora eliminiert, um zu untersuchen, inwiefern der jeweils verwendete Basidiomycet mit Hilfe seines Enzymspektrums Lignin abbauen und somit zu einer Steigerung der Biogasausbeute beitragen konnte, ohne dass störende Aktivitäten durch andere Mikroorganismen zu erwarten waren.

Inwieweit diese thermische Vorbehandlung einen Einfluss auf die Biogasausbeute des puren Gärrestes (in Abwesenheit von Basidiomyceten) hat, wird in diesem Abschnitt beschrieben.

Es wurde sowohl purer Gärrest (mit einer unveränderten Trockenmasse von 20-21 %) als auch eine wässrige Gärrest-Suspension mit 6 % Trockenmasse eingesetzt. Es erfolgte anschließend eine thermische Inkubation. Diese umfasste Temperaturen im Ofen von 60 °C und 80 °C und eine Autoklavierungstemperatur von 121 °C bei jeweils 20 min und 60 min. Daraufhin wurden die Biogasausbeuten dieser Gärreste jeweils in Dreifachbestimmung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 80 gezeigt.

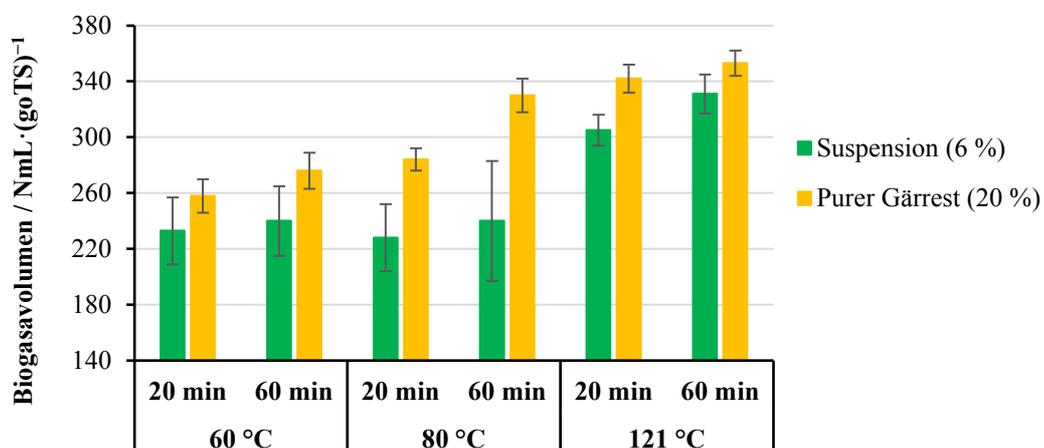


Abbildung 80: Biogasausbeuten unterschiedlich thermisch vorbehandelter Weizenstrohgärreste von 20 % Trockenmasse („Purer Gärrest“) und 6 % Trockenmasse („Suspension“). Bei 60 °C und 80 °C ist mit den Zeitangaben die Standzeit (20 min bzw. 60 min) der jeweiligen Gärrestprobe im Ofen bei Atmosphärendruck gemeint. Bei 121 °C wurde der Gärrest im geschlossenen Druckbehälter bei 2 bar autoklaviert.

### 3.10.1 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass mit intensiverer thermischer Behandlung die Biogasausbeuten der Gärreste erwartungsgemäß steigen. Beim Vergleich der Biogasergebnisse der Gärrest-Suspensionen (6 % Trockenmasse) bei 60 °C und 80 °C fällt auf, dass sich die Biogasausbeuten je nach 20- oder 60-minütiger Inkubationszeit nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass es sich hierbei um eine bloße Standzeit der Gärreste bei diesen Temperaturen handelt und dass diese nominellen Werte nicht den Kerntemperaturen im Inneren des Gärrestes bzw. der Gärrest-Suspension entsprochen haben. Eine separate Messung der Kerntemperaturen wurde nicht durchgeführt.

Im Falle des reinen Gärrestes mit 20 % Trockenmasse sind die Unterschiede der Biogasausbeuten zwischen 60 und 80 °C dagegen signifikant. Dies ist vermutlich durch den geringeren Wassergehalt zu begründen: Dadurch, dass die Proben weniger Wasser enthalten, sind die absoluten Wärmekapazitäten der Proben geringer, sodass ein schnellerer Temperaturanstieg möglich war, wodurch folglich eine vermehrte thermische Depolymerisation der Lignocellulosestruktur erfolgen konnte. Dies erklärt, weshalb im Falle des reinen Gärrestes (20 % Trockenmasse) bei gleichen Inkubationsbedingungen stets die höhere Biogasausbeute als bei der entsprechenden Suspension (6 % Trockenmasse) erzielt wurde.

Beim Vergleich der Biogasmittelwerte zwischen 60 °C und 120 °C mit Inkubationszeiten von jeweils 60 min wurde im Falle der Gärrest-Suspension (6 % Trockenmasse) die Biogasausbeute von  $233 \pm 24$  NmL/(goTS) auf  $331 \pm 14$  NmL/(goTS) gesteigert, was einer prozentualen Erhöhung von 42 % entspricht.

Diese Ergebnisse führen unweigerlich zu der Erkenntnis, dass der in dieser Arbeit bisher stets durchgeführte Autoklaviervorgang (121 °C, 20 min) an sich bereits zu einer signifikanten Steigerung der Biogasausbeuten des Weizenstrohgärrestes (im Vergleich zu thermisch unvorbehandeltem Gärrest) geführt hat. Zwar war aus der Literatur bekannt, dass das Autoklavieren von lignocellulosehaltigem Substrat zu einer partiellen Zersetzung führt (Kumar *et al.*, 2009), da beispielsweise durch hohe Temperaturen die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Cellulose-Gerüsts gebrochen werden (Nongthombam *et al.*, 2017), jedoch wurde das Ausmaß der Biogasausbeute-Zunahme durch das Autoklavieren unterschätzt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, gerade durch den Einsatz von Basidiomyceten die Biogasausbeute der Gärreste zu erhöhen. Da das Autoklavieren selbst bereits zu einer erheblichen Biogasausbeute-Erhöhung führt, kann der weiter zu erreichende Biogasanstieg durch die Behandlung des Gärrestes mit Basidiomyceten nur noch erschwert gesteigert werden. Insofern ist das Autoklavieren von Gärresten mit dem Arbeitsziel nicht vereinbar.

Ab dieser Stelle wurde beschlossen, in den zukünftigen Kultivierungen die thermische Vorbehandlung der Gärreste entweder auf das nötige Minimum einzuschränken bzw. vollständig darauf zu verzichten.

### **3.11 Wachstumsfähigkeit zweier Basidiomyceten auf unterschiedlich thermisch vorbehandelten Gärresten**

In Anlehnung an die Ergebnisse aus Abschnitt 3.10 sollte erstmalig die Kultivierung von Basidiomyceten auf Weizenstrohgärresten stattfinden, die in unterschiedlicher Weise thermisch behandelt wurden. Ziel des Versuchs war es, die Vitalität der Pilze in der Kulturbrühe über die Zeit zu untersuchen, weil die Vitalität der entsprechenden Weißfäulepilze eine Grundvoraussetzung dafür ist, dass ein Ligninabbau überhaupt stattfinden kann. In allen bisher beschriebenen Kultivierungsversuchen wurde der Gärrest stets autoklaviert und damit die Vitalität der Mikroorganismen, die im Gärrest bereits von vornherein enthalten waren, ausgeschaltet. Inwieweit Basidiomyceten mit den Mikroorganismen des Gärrestes konkurrieren können, wurde erstmalig in diesem Experiment untersucht. Biogasmessungen wurden in diesem Versuch nicht durchgeführt.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden, ähnlich wie im vorherigen Abschnitt, Weizenstrohgärrest-Brühen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und anschließend mit den Basidiomyceten POS65 bzw. CCI324 von jeweils 15 g Pilzpellet (Biofeuchtmasse) angeimpft. Es wurden mehrere Gärrest-Suspensionen auf 6 % Trockenmasse eingestellt und bei Temperaturen von 60 °C, 80 °C und 121 °C im Ofen für jeweils 20 min inkubiert (ähnlich wie in Experiment 3.10 beschrieben), wobei zum Wachstumsvergleich eine Kulturreihe autoklaviert wurde. Das Schema der thermischen Vorbehandlung ist in Abbildung 81 gezeigt.

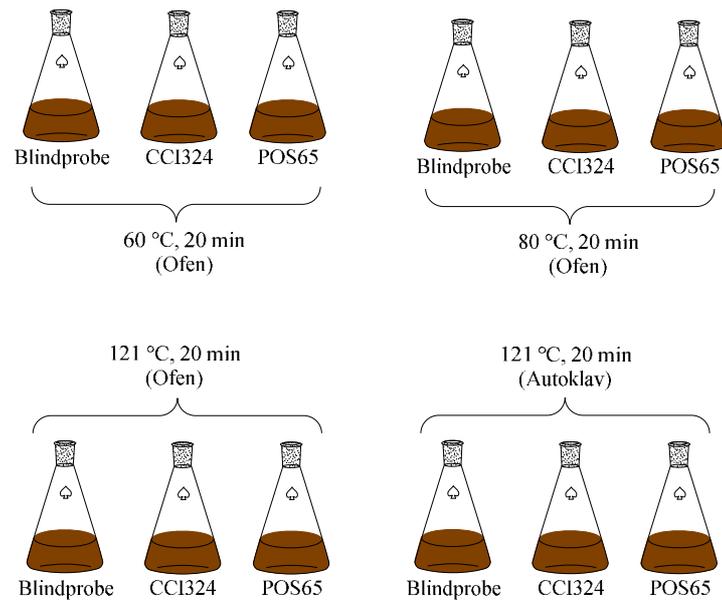


Abbildung 81: Schema der thermischen Vorbehandlung von Weizenstrohgärrest-Suspensionen mit 6 % Trockenmasse und 250 mL Volumen zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der beiden Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) und *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65). Die Gärrest-Suspensionen wurden zunächst bei 60 °C, 80 °C und 121 °C im Ofen und bei 121 °C im Autoklaven für jeweils 20 min vorbehandelt. Anschließend wurden SNL-Medium-Vorkulturen der beiden Stämme angesetzt (gemäß der in 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Verfahren). Nach Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet mit 15 g Biofeuchtmasse in die hier schematisch gezeigten Kulturen überimpft. Als Blindproben wurden unbeimpfte Weizenstrohgärrest-Suspensionen verwendet.

In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen gemäß des in 2.4 beschriebenen Verfahrens zwecks einer Vitalitätskontrolle ausplattiert. Es wurde (da nicht alle der Kulturen vor dem Animpfen autoklaviert wurden), um das unerwünschte Wachstum von Bakterien auf dem Agar zu unterdrücken, Ampicillin als Breitbandantibiotikum verwendet.

### 3.11.1 Ergebnisse

Die ausplattierten Kulturen sind auf den jeweiligen Agarplatten in Abbildung 82 für den 15. Kultivierungstag gezeigt.

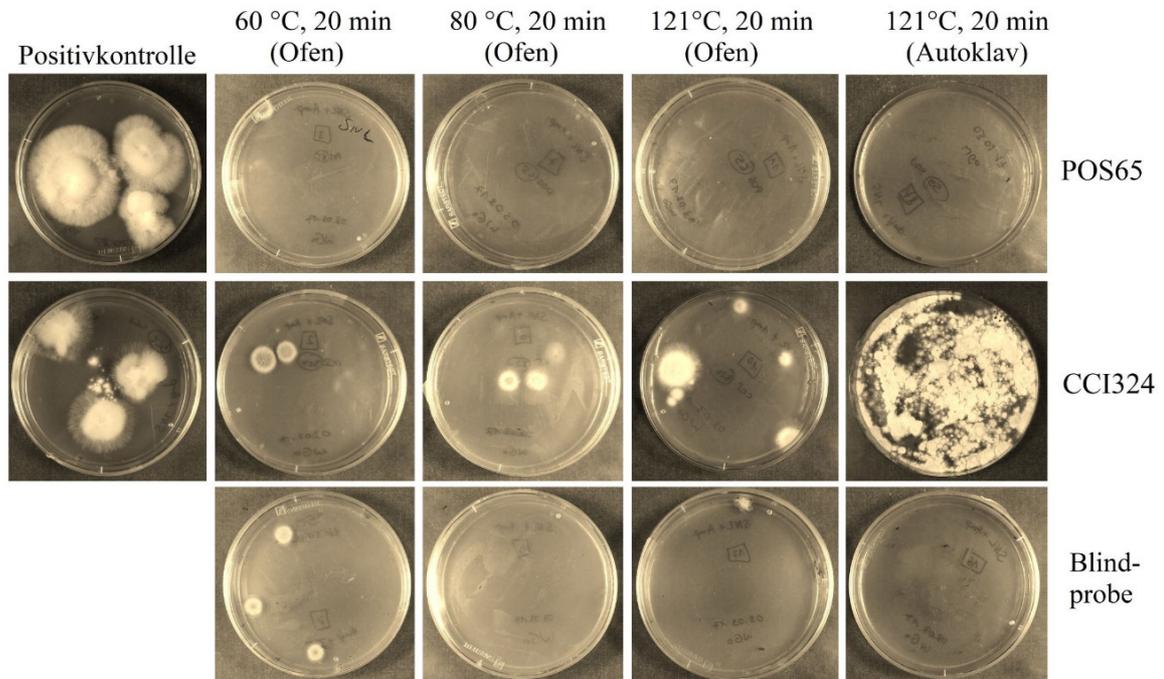


Abbildung 82: Ausstriche von thermisch unterschiedlich behandelten Weizenstrohgärrest-Kulturen auf SNL-Agar (mit Ampicillin). Die obere Reihe stellt Ausstriche von Kulturen dar, die mit dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) angeimpft wurden, während die mittlere Reihe mit *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) angeimpft wurde. Die Übersicht über die thermischen Vorbehandlungen der verwendeten Kulturen ist in Abbildung 81 gezeigt. Die Blindproben (Gärrest-Suspensionen) wurden nicht beimpft. Mit den Temperatur- und Zeitangaben sind die Inkubationsbedingungen der Gärrest-Suspensionen gemeint. Alle Kulturen (mit Ausnahme der Positivkontrollen) wurden am 15. Kultivierungstag ausplattiert und die Platten 7 Tage im Brutschrank bei 24 °C inkubiert und die Agarplatten anschließend fotografiert. Bei den Positivkontrollen handelt es sich um Pilzpellet des jeweiligen Stammes (POS65 bzw. CCI324), welches aus der Vorkultur im SNL-Medium gewonnen wurde und direkt auf die ampicillin-haltige SNL-Agarplatte überführt wurde.

### 3.11.2 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass das Wachstum der Basidiomyceten auf dem Agar (und folglich auch in der Gärrestbrühe) umso eher erleichtert wurde, je intensiver der Gärrest thermisch vorbehandelt wurde. Während bei den Kulturen, die bei 60 °C behandelt wurden, stets Wachstum von Schimmelpilzen vorhanden war, wurde dieses Wachstum bei 80 °C und 121 °C Ofentemperatur geringer. Bei den autoklavierten Proben war dagegen stets kein Wachstum von Schimmelpilzen zu beobachten. Das Wachstum von Bakterien auf der Agarplatte wurde von vornherein durch die Zugabe von Ampicillin ausgeschaltet. Die Positivkontrollen beweisen die Wachstumsfähigkeit der Basidiomyceten POS65 und CCI324 auf ampicillin-behandeltem SNL-Agar.

Das Ausplattieren am 15. Kultivierungstag zeigte in keiner der thermisch vorbehandelten Gärrestkulturen, die anschließend mit dem Pellet von POS65 beimpft wurden, Lebenszeichen dieses Basidiomyceten (trotz der Tatsache, dass die Agarplatten 7 Tage im Brutschrank inkubiert wurden).

Bei CCI324 zeigte sich am 15. Kultivierungstag erst bei Vorbehandlungsbedingungen von 121 °C und 20 min (Standzeit im Ofen) Myzelwachstum, während bei 60 °C und 80 °C lediglich das Wachstum von Schimmelpilzen beobachtet wurde.

### 3.11.3 Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

Insgesamt erweist sich die Wachstumsfähigkeit der beiden getesteten Basidiomyceten POS65 und CCI324 in den submersen Gärrestbrühen ohne thermische Behandlung als gering. Dies lässt sich daran erkennen, dass in den nicht-autoklavierten Kulturen nahezu kein Wachstum von POS65 und CCI324 zu beobachten war. Lediglich im Falle der Kultur, die bei 121 °C im Ofen inkubiert wurde, konnte CCI324 mit den Schimmelpilzen hinsichtlich des Wachstums konkurrieren. Dass CCI324 insgesamt eine höhere Vitalität als POS65 in der Weizenstrohgärrest-Brühe aufweist, konnte bereits in Abschnitt 3.8 (s. Abbildung 71) gezeigt werden.

Die Ergebnisse deuten einerseits an, dass in Gärrestbrühen mit geringer thermischer Vorbehandlung die Basidiomyceten bezüglich ihres Wachstums mit der gärrest-inhärenten Mikroflora konkurrierten. Andererseits sagen die Ergebnisse aus, dass nach 15-tägiger Kultivierungszeit im autoklavierten Gärrest die Vitalität der Basidiomyceten nicht mehr gewährleistet war, woraus geschlussfolgert wurde, dass (wie bereits in Abschnitt 3.8.2 vermutet) es sich hierbei eher um ein Überleben der Pilze in der Gärrestbrühe handelt und kein vitales Leben.

Da die Biogasergebnisse aller bisher durchgeführten submersen Kultivierungen (mit Ausnahme der Ergebnisse beim Screening-Experiment in Abschnitt 3.3) gezeigt haben, dass die Behandlung des Weizenstrohgärrestes mit Weißfäulepilzen zu keiner signifikanten Steigerung der Biogasausbeute geführt hat und aus den Ergebnissen des Ausplattierens im hier durchgeführten Versuch hervorging, dass die beiden verwendeten Basidiomyceten (POS65 und CCI324) keine hohe Vitalität in den thermisch unvorbehandelten Submerskulturen aufwiesen, wurde ab diesem Zeitpunkt beschlossen, in zukünftigen Experimenten auf submerse Kultivierungen zu verzichten und stattdessen emerse Kultivierungen durchzuführen.

Vor dem Hintergrund der in 3.10.1 erzielten Ergebnisse<sup>18</sup> müssen die Ergebnisse der bereits zuvor durchgeführten emersen Kultivierung (in Abschnitt 3.3) in einen größeren Zusammenhang eingeordnet werden: Im Experiment 3.3 wurden auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest mehrere Weißfäulepilze emers kultiviert. Nominell haben die Ergebnisse gezeigt, dass die Biogasausbeuten der angeimpften Kulturen bei vier von fünf Stämmen höher ausfielen als die der Blindprobe. Da allerdings der Gärrest in 3.3 stets autoklaviert wurde, kann daher retrospektiv nicht beurteilt werden, inwieweit die gesteigerten Biogasausbeuten auf das Autoklavieren oder auf ligninolytische Enzymaktivitäten zurückzuführen ist.

Ob Basidiomyceten in emerser Kultivierung auf nicht-sterilem Gärrest wachstumsfähig sind, wurde bisher nicht untersucht, sodass diese Frage im Hinblick auf die Steigerung der Biogasausbeute von Gärresten Gegenstand der folgenden Arbeitsschritte darstellt.

### **3.12 Emerse Kultivierung ausgewählter Basidiomyceten in luftbegasten Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest**

In Anbetracht der Ergebnisse aus 3.11 sollte erstmalig die emerse Kultivierung von Basidiomyceten auf thermisch unbehandeltem, d.h. nicht sterilem, Gärrest erfolgen.

Es ist davon auszugehen, dass die Nichtsterilität von Substraten für Weißfäulepilze prinzipiell kein Wachstumshindernis darstellen sollte, da deren natürliches Habitat in der Regel Totholz ist, welches in der Natur ebenfalls keine Sterilität aufweist. Im biotechnologischen Sinne stellt das Wachstum eines Weißfäulepilzes auf Totholz eine emerse Kultur dar.

Angelehnt an das emerse Wachstum von Weißfäulepilzen in der Natur werden diese auch gezielt im s.g. Mietenverfahren eingesetzt. Mit der „Miete“ ist in diesem Zusammenhang ein Schüttgut gemeint, welches zu einem Haufen gestapelt wird. Das Ziel eines solchen Verfahrens ist häufig die Bodensanierung, bei dem das Enzymspektrum von Weißfäulepilzen zur Zersetzung von Schadstoffen genutzt wird (Michels *et al.*, 2001). Dabei kann z.B. der Boden ausgehoben werden, um eine verbesserte Sauerstoffzufuhr und somit einen effizienteren Schadstoffabbau durch die Weißfäulepilze zu ermöglichen.

Am Beispiel der Zersetzung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) wird in der Literatur das weißfäulepilz-basierte Bodensanierungsverfahren wie folgt beschrieben

---

<sup>18</sup> Die Kernaussage dieser Ergebnisse war, dass bereits das Autoklavieren des Gärrestes zu einer erheblichen Steigerung der Biogasausbeute führt.

(Trude, 1990): Der Pilz wurde in den belasteten Boden eingebracht, den es zu dekontaminieren galt. Des Weiteren wurde Stroh in den Boden eingebracht, das dem Pilz als Nahrungsquelle dienen sollte. Über die Zeit hat der Pilz sowohl die Schadstoffe als auch das Strohsubstrat abgebaut.

Auf eine ähnliche Weise wird in einer anderen Literaturquelle das Mietenverfahren am Beispiel der Dekontamination von belastetem Holz<sup>19</sup> beschrieben (Stottmeister, 2003): Hierbei wurde das belastete Holz mit Kartoffelpülpe und Wasser vermischt. Die Kartoffelpülpe bietet dem Pilz (im Vergleich zum Holz) eine leichter zugängliche Nährstoffquelle und erleichtert ihm das Anwachsen. Im Zeitraum von 4-8 Wochen konnte das Holz auf diese Weise weitestgehend dekontaminiert werden.

Zur Beschleunigung aerober Abbauprozesse können Mieten auch gezielt belüftet werden (Sutter, 1996; Ulbricht, 2002), sodass dieses Verfahren möglicherweise zum schnelleren Ligninabbau, der ebenfalls aerob erfolgt, in pflanzlichen Gärresten genutzt werden kann.

Das natürliche emerse Wachstum von Weißfäulepilzen auf totem Holz und der gezielte Einsatz im Mietenverfahren führten im Rahmen dieser Arbeit zu der Idee, beide Verfahren zu kombinieren. Dazu wurde in einem belüftbaren Festbettreaktor (Z373206, Sigma Aldrich) Gärrest vorgelegt und mit dem Pellet des jeweiligen Basidiomyceten inokuliert, durch Rühren homogenisiert und die Kultur mehrere Wochen bei Raumtemperatur unter schwacher Belüftung inkubiert. Die Vorgehensweise zu dieser Kultivierung ist in 2.3.6 in „Kultivierung in luftbegasten Festbettreaktoren“ beschrieben. Ursprünglich wurde dieser Reaktortyp (Z373206, Sigma Aldrich) für die Kultivierung von Pflanzen konzipiert, was beispielhaft in der Literatur in (Ginova *et al.*, 2012) beschrieben ist.

Schematisch ist das emerse Kultivierungsverfahren in einem solchen belüftbaren Festbettreaktor in Abbildung 83 gezeigt.

---

<sup>19</sup> Es handelt sicher hierbei um persistente Holzschutzmittel, Insektizide und andere Gefahrstoffe wie z.B. DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan), Lindan (1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan) und Pentachlorphenol.

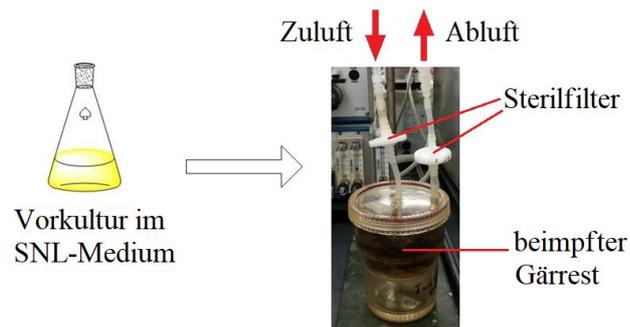


Abbildung 83: Schema der emersen Kultivierung von Basidiomyceten im luftbegasten Festbettreaktor. Zunächst wird das aus der Vorkultur (SNL-Medium) erhaltene Pilzpellet zentrifugiert und mit Wasser gewaschen und anschließend auf den unsterilen Gärrest im Reaktor überführt. Der Reaktor wird mit steriler Luft begast. Dabei wird der Luftstrom zunächst über das innere, mittige Rohr zum Boden geführt, der anschließend den Gärrest von unten nach oben durchströmt. Zur Vermeidung einer eventuellen Freisetzung von Sporen wurde an den zur Abluft führenden Schlauch ebenfalls ein Sterilfilter eingesetzt.

Gemäß Abbildung 83 erfolgte die Animpfung von 75 g Weizenstrohgärrest-Feuchtmasse (15,1 g Trockenmasse) mit 15 g Pellet Biofeuchtmasse (ca. 0,75 g Trockenmasse) des jeweiligen Basidiomyceten. Als zu kultivierende Weißfäulepilze wurden POS65, TVE84 und CCI324 verwendet.

Die Auswahl dieser Stämme ist darin begründet, dass POS65 bereits in einer vorherigen emersen Kultivierung einen Zuwachs an Biogasausbeute gezeigt hat (Abbildung 34). Zudem gilt TVE84 (wie bereits in 3.2.1.2 beschrieben) unter den Weißfäulepilzen als Modellorganismus bezüglich des Ligninabbaus, während der Basidiomycet CCI324 in emerser Kultivierung auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest Fruchtkörper gebildet (Abbildung 72).

Alle Kulturen dieses Experiments wurden für 21 Tage inkubiert. Das Kultivierungsverfahren ist in Abbildung 84 gezeigt.

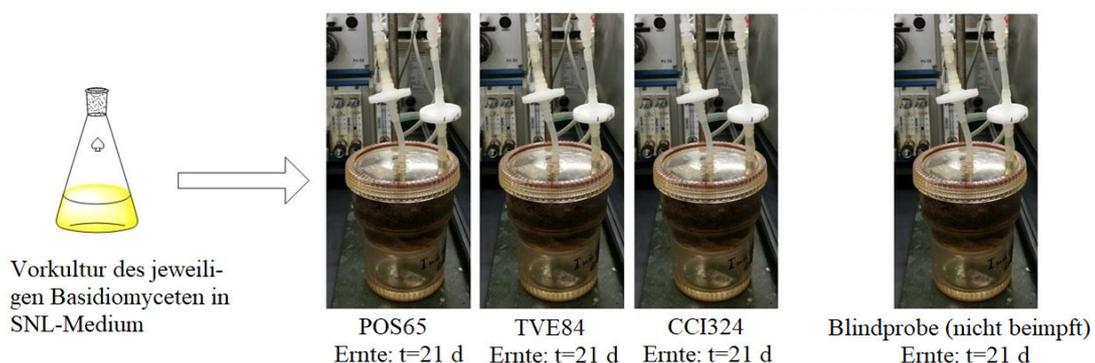


Abbildung 84: Schema der emersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf thermisch unvorbehandeltem Weizenstrohgärrest in Festbettreaktoren unter Begasung mit steriler Luft. Alle beimpften Kulturen wurden am 21. Kultivierungstag geerntet. Jeder dieser Stämme wurde jeweils in SNL-Medium vorkultiviert und anschließend 75 g Gärrest-Feuchtmasse mit 15 g Pilzpellet-Feuchtmasse angeimpft. Als Blindprobe wurde ein unbeimpfter Weizenstrohgärrest verwendet.

Die Probenahme aus den Festbettreaktoren erfolgte im Abstand von 3-4 Tagen nach dem in 2.3.7 beschriebenen Verfahren: Dazu wurde eine definierte Menge der Kultur in einem definierten Volumen Wasser suspendiert, der Ansatz zentrifugiert und der so erhaltene Kulturüberstand zur Messung von pH-Werten und Enzymaktivitäten verwendet.

Nach 21 Tagen wurde die gesamte Kultur geerntet und direkt für Biogasmessungen verwendet.

### 3.12.1 Ergebnisse

#### Wachstum

Die folgenden Bilder zeigen das Wachstumsverhalten von CCI324 (Abbildung 85) und POS65 (Abbildung 86) auf dem thermisch unvorbehandelten Weizenstrohgärrest. Der Basidiomycet TVE84 zeigte zu keinem Zeitpunkt Anzeichen von Wachstum, sodass von diesem im Folgenden keine Fotos gezeigt sind.



Abbildung 85: Myzel- und Fruchtkörperbildung von *Coprinopsis cinerea* 324 auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) an den Tagen 10, 12, 14 und 21 (v.l.n.r.) in einem luftbegasteten Festbettreaktor.



Abbildung 86: Myzelbildung von *Pleurotus ostreatus* 65 in emerser Kultivierung auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) an den Tagen 10 (links) und 21 (rechts) in einem luftbegasteten Festbettreaktor.

#### pH-Werte

In Abbildung 87 ist der Verlauf der pH-Werte in den Kulturüberständen gezeigt. Die Kulturüberstände wurden dadurch erzeugt, dass Kulturmaterial entnommen und in Wasser suspendiert wurde (s. Abschnitt 2.3.7).

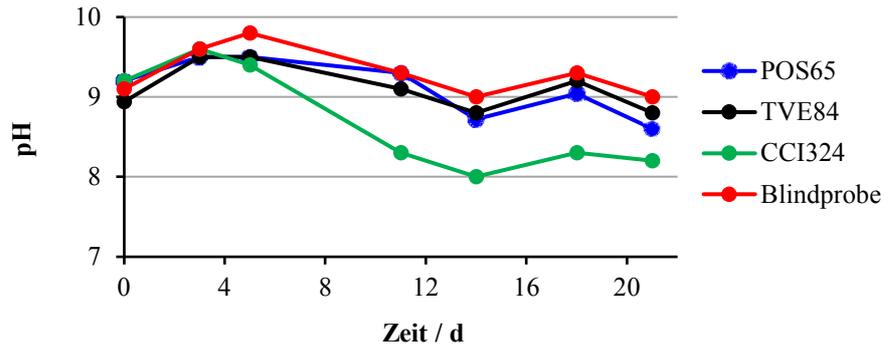


Abbildung 87: pH-Zeit-Profil der Kulturüberstände der emersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 84. Als Blindprobe wurde ein unbeimpfter Gärrest verwendet.

### Enzymaktivitäten

Die Laccaseaktivitäten der drei verwendeten Basidiomyceten, die in luftbegasten Festbettreaktoren kultiviert wurden, sind in Abbildung 88 dargestellt.

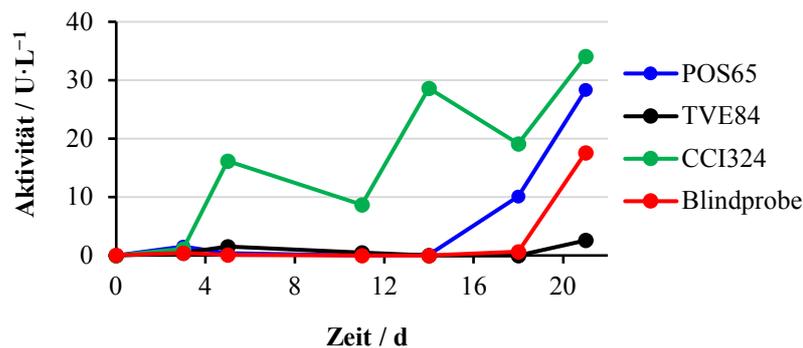


Abbildung 88: Laccaseaktivitäten der Kulturüberstände der emersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 84. Als Blindprobe wurde ein unbeimpfter Gärrest verwendet.

Es wurden weder Peroxidase- noch Cellulaseaktivitäten festgestellt. Die Xylanaseaktivitäten sind in Abbildung 89 dargestellt.

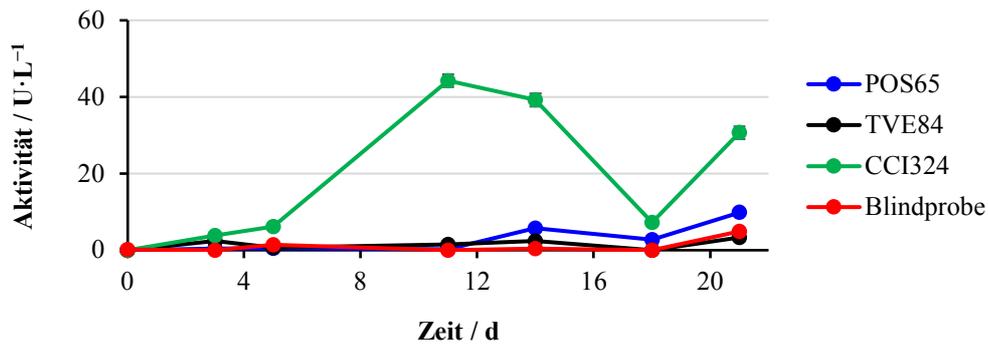


Abbildung 89: Xylanaseaktivitäten der Kulturüberstände der emersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 84. Als Blindprobe wurde ein unbeimpfter Gärrest verwendet.

### Biogasergebnisse

Die Ergebnisse der Biogasmessungen der Weizenstrohgärrest-Kulturen, die mit den Basidiomyceten POS65, TVE84 und CCI324 am 21. Kultivierungstag geerntet wurden, sind in Abbildung 90 dargestellt.

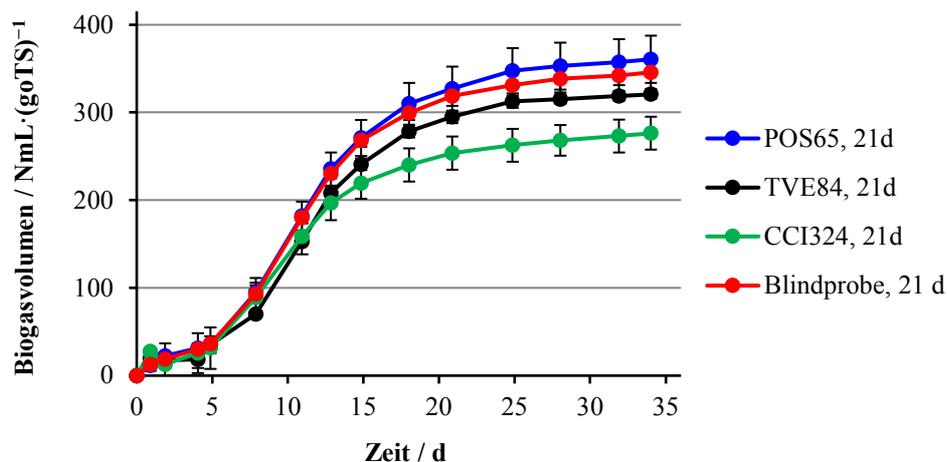


Abbildung 90: Biogasausbeuten der emersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65), *Trametes versicolor* 84 (TVE84) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Weizenstrohgärrest (keine thermische Vorbehandlung) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 84. Als Blindprobe wurde ein unbeimpfter Gärrest verwendet. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den Erntetag der jeweiligen Kultur.

### 3.12.2 Diskussion

#### Wachstum

Da die Pilze POS65 und CCI324, nicht jedoch TVE84, Anzeichen von Wachstum auf dem Gärrest zeigten, bedeutet dies, dass lediglich für die ersteren beiden Pilze im emersen Kultivierungsverfahren der Weizenstrohgärrest eine verwertbare Nahrungsquelle darstellte.

Ab dem 14. Kultivierungstag bildete der Basidiomycet CCI324 Fruchtkörper (Abbildung 85). Nach einer weiteren Woche war die Degradation der Fruchtkörper in Form eines schwarzen tintenartigen Zerfließens zu erkennen, was für diese Pilzart („Tintlinge“) typisch ist (Muraguchi *et al.*, 2008; Zolan & Pukkila, 2009).

### pH-Werte

Die zeitlichen Verläufe der pH-Werte der Kulturen von POS65, TVE84 und der Blindprobe sind nahezu deckungsgleich und liegen stets im alkalischen Bereich von 8,7 und 9,8. Lediglich der pH-Wert der CCI324-Kultur unterscheidet sich von den anderen insofern, als dass ein geringfügiges Absinken auf pH 8,0 am 14. Kultivierungstag beobachtet wurde.

### Enzymaktivitäten

Die Ergebnisse des ABTS-Assays (zur Messung von Laccase- und Peroxidaseaktivitäten) zeigen in diesem Experiment erstmalig das vermeintliche Vorhandensein von Laccasen in der Blindprobe, die erst ab dem 21. Kultivierungstag nachgewiesen wurden, was bisher in keinem vorherigen Kultivierungsversuch festgestellt wurde. Dies kann dadurch erklärt werden, dass im (thermisch nicht vorbehandelten) Gärrest Mikroorganismen enthalten waren, die Oxidoreduktasen produziert haben, welche anschließend im ABTS-Assay (s. Abschnitt 2.5.1) nachgewiesen wurden.

Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten, die die Herkunft solcher Mikroorganismen erklären würden:

1. Die Mikroorganismen haben erst während dieses Kultivierungsversuchs, z.B. in Form von Schimmelpilzsporen, den Gärrest besiedelt.
2. Diese Mikroorganismen waren bereits ein Bestandteil der Mikroflora, die der Gärrest seit dem Verlassen der Biogasanlage besaß.

In beiden Fällen muss es sich um Oxidoreduktasen handeln, deren Redoxpotential höher als der von ABTS ist.

Hinsichtlich der ersteren Möglichkeit ist es denkbar, dass in der Blindprobe Sporen von ubiquitär vorkommenden Schimmelpilzen, z.B. der Gattungen *Aspergillus* oder *Trichoderma*, vorhanden waren. Ein eventueller Kontakt zwischen dem Gärrest und solchen Schimmelpilzsporen ist dadurch möglich, dass der Gärrest in den Reaktor unter nicht-sterilen Bedingungen befüllt wurde oder dass der Reaktor während der Kultivierung zu Probenahme-Zwecken an der Luft geöffnet

wurde. Für eine Präsenz von Schimmelpilzen im Weizenstrohgärrest spricht die Tatsache, dass das Ausplattieren eines nicht-autoklavierten Weizenstrohgärrestes in einem früheren Versuch (Abschnitt 3.11) das Vorhandensein von Schimmelpilzen aufgezeigt hat (Abbildung 82). Dass auch Ascomyceten, zu denen die Schimmelpilze gehören, ebenfalls zur Produktion von laccase-ähnlichen Enzymen in der Lage sind, findet sich in der Literatur: So ergaben bioinformatische Analysen des Genoms von *Aspergillus niger* die Existenz von 13 Multikupferoxidase-Genen, von denen zehn überexprimiert wurden, von denen vier wiederum ABTS oxidieren konnten (Tamayo Ramos *et al.*, 2011). Damit ähneln sie in dieser Hinsicht den Laccasen aus Basidiomyceten. Im Falle von *Trichoderma reesei* wurden ebenfalls mehrere Multikupferoxidase-Gene annotiert. Die homologe Überexpression eines Gens ergab extrazelluläre Aktivitäten hinsichtlich der Oxidation von ABTS (Levasseur *et al.*, 2010).

Hinsichtlich der zweiten Möglichkeit ist es denkbar, dass – obwohl Pilze im Allgemeinen einen obligat aeroben Stoffwechseltyp haben (Sauberer *et al.*, 2008) – die hier vermuteten Gattungen *Trichoderma* bzw. *Aspergillus* den anaeroben Prozess in der Biogasanlage überlebt haben und somit im Weizenstrohgärrest immer noch präsent waren. In der Literatur wurden Studien durchgeführt, in denen unter anaeroben Bedingungen bzw. bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck die Überlebensfähigkeit von *Aspergillus* (Kelly *et al.*, 1990; Lockington *et al.*, 1997) und *Trichoderma* (Chovanec *et al.*, 2005; Kurakov *et al.*, 2008) gezeigt wurde. Auf diesem Wege ist es möglich, dass Schimmelpilze Oxidoreduktasen produziert haben, die sich im hier durchgeführten ABTS-Assay als scheinbare (basidiomyceten-basierte) Laccaseaktivitäten geäußert haben.

Vor diesem Hintergrund sind die gemessenen Oxidoreduktaseaktivitäten in den Kulturüberständen von POS65 und TVE84 vermutlich ebenfalls nicht auf Laccasen aus ebendiesen Basidiomyceten zurückzuführen. Diese Enzymaktivitäten traten erst am 18. (POS65) bzw. am 21. Kultivierungstag (TVE84) auf, sodass diese als nicht-basidiomycetische Oxidoreduktaseaktivitäten zu deuten sind. In allen bisherigen Kultivierungen waren Laccaseaktivitäten (sofern der jeweilige Basidiomycet in der autoklavierten Weizenstrohgärrest-Brühe überhaupt Laccasen gebildet hat) spätestens nach dem dritten Kultivierungstag messbar.

Dagegen wurden im Vergleich zu POS65 und TVE84 im Fall von CCI324 bereits am 5. Kultivierungstag messbare Laccaseaktivitäten beobachtet, die an dieser Stelle eher als basidiomyceten-

eigene Laccaseaktivitäten interpretiert werden. Dafür sprechen Ergebnisse aus zuvor durchgeführten submersen Kultivierungen von CCI324, in denen bereits nach ca. 3 Tagen nach der Animpfung Laccaseaktivitäten beobachtet wurden<sup>20</sup> (Abbildung 66, Abbildung 75).

Ähnlich wie bei der Blindprobe messbare Laccaseaktivitäten auftraten, wurden in dieser auch Xylanaseaktivitäten nachgewiesen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der hier verwendete Gärrest vor der Animpfung mit Weißfäulepilzen nicht autoklaviert wurde und dieser somit keine Sterilität aufwies. In der Literatur sind in Gegenwart von lignocellulosehaltigem Material sowohl *Aspergillus* (Gawande & Kamat, 1999; Kang *et al.*, 2004; Pal & Khanum, 2010) als auch *Trichoderma* (Goyal *et al.*, 2008; Tenkanen *et al.*, 1992; Wong & Saddler, 1992) als Xylanaseproduzenten bekannt, sodass dies eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von Xylanaseaktivitäten darstellt.

### Biogasergebnisse

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine 21-tägige Inkubation des Gärrestes nur im Falle des Basidiomyceten POS65 zu einer erhöhten Biogasausbeute auf dem unsterilen Gärrest in emerser Kulturführung geführt hat. Dagegen haben die Kulturen der Pilze *Trametes versicolor* 84 und *Coprinopsis cinerea* 324 – verglichen zur unbeimpften Blindprobe – erniedrigte Biogasausbeuten hervorgebracht.

Angesichts der bereits diskutierten (und in Abschnitt 3.11 bewiesenen) Lebensfähigkeit von Schimmelpilzen auf dem thermisch unbehandelten Gärrest sind diese Biogasergebnisse mit Vorsicht zu betrachten, da nicht unterschieden werden kann, inwieweit die gemessene Biogasausbeute durch die enzymatischen Aktivitäten durch Basidiomyceten bzw. durch Schimmelpilze (die den Gärrest ebenfalls als Nahrungsquelle nutzen können) beeinflusst wird. In beiden Fällen lässt sich die Aussage treffen, dass bei der CCI324-Kultur angesichts der vorhandenen Xylanaseaktivitäten und der fehlenden Peroxidaseaktivitäten die verminderte Biogasausbeute, verglichen zur Blindprobe, erklärt lässt. Anhand der Biogasdaten (Abbildung 90) lässt sich dies daran erkennen, dass die Biogasausbeute der CCI324-Kultur signifikant geringer ist als die Biogasausbeute der Blindprobe. Dagegen finden sich zwischen den Biogasergebnissen der Kulturen von POS65 und TVE84

---

<sup>20</sup> In diesen Fällen wurde der Gärrest im Vorfeld autoklaviert, sodass die Laccaseaktivitäten durch die zur Animpfung verwendeten Basidiomyceten verursacht worden sein müssen. Die Herkunft dieser Oxidoreduktasen durch andere Mikroorganismen ist in diesem Fall somit ausgeschlossen.

sowie Blindprobe keine signifikanten Unterschiede, woraus geschlussfolgert werden kann, dass durch diese beiden eingesetzten Weißfäulepilze kein Ligninabbau in nennenswertem Maße stattgefunden hat.

### **3.12.3 Bewertung der Ergebnisse**

Anhand der Ergebnisse der Enzymaktivitäten ließ sich unter den drei getesteten Basidiomyceten lediglich im Fall von *Coprinopsis cinerea* 324 ein vitales Wachstum auf dem nicht-autoklavierten Weizenstrohgärrest feststellen. Zugleich hat sich dieses Wachstum allerdings in Form einer geringeren Biogasausbeute im Vergleich zur Blindproben-Biogasausbeute bemerkbar gemacht. Dieser Stamm ist der einzige der drei getesteten Basidiomyceten, bei dem Xylanaseaktivitäten bis zu 44 U/L gemessen wurden. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Basidiomycet die Hemicellulose des Gärrestes als Nährstoffquelle für den Aufbau seiner eigenen Biomasse genutzt hat (assimilativer Stoffwechsel), was sich anhand der Myzel- und Fruchtkörperbildung erkennen ließ. Vorhandene Xylanaseaktivitäten während der Kultivierung führen im Allgemeinen zu einer erwartungsgemäß verringerten Biogasausbeute, weil dadurch der Gehalt nutzbarer C-Quellen im Gärrest verringert wird. Dadurch steht der Anteil der vom Pilz katabolisierten Hemicellulose bei der Messung der Biogasausbeute den im Impfschlamm (der für die Biogasmessungen eingesetzt wird) enthaltenen Mikroorganismen nicht mehr für die Biogasbildung zur Verfügung.

Dagegen waren sowohl die Xylanaseaktivitäten als auch die Biogasausbeuten der Kulturen von POS65, TVE84 und der Blindprobe nicht signifikant unterschiedlich.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die emerse Kultivierung der drei Weißfäulepilze POS65, TVE84 und CCI324 auf thermisch unvorbehandeltem Weizenstrohgärrest zu keiner signifikant erhöhten Biogasausbeute geführt hat.

## **3.13 Untersuchung des zeitlichen Wachstumsverhaltens dreier Basidiomyceten auf drei verschiedenen Gärresten**

Im Rahmen der Kultivierungsversuche von Basidiomyceten auf thermisch nicht vorbehandeltem Gärrest wurde beschlossen, nicht nur Weizenstrohgärrest als einziges Substrat zu verwenden, sondern auch weitere industrielle bzw. landwirtschaftliche Abfälle. Von einer Versuchsanlage zur Strohvergärung konnte ein Reisstrohgärrest (Abbildung 14), der wie der Weizenstrohgärrest (Abbildung 13) eine durchschnittliche Verweilzeit von 30 Tagen in der Biogasanlage hatte,

bezogen werden. Ein weiterer Gärrest, der durch die Kooperation mit der Technischen Universität Hamburg-Harburg vom „Biogas- und Kompostwerk Bützberg“ (BKW Bützberg) auf Grünschnitt- und Gartenabfällen erhalten wurde, durchlief die Biogasanlage mit einer Verweilzeit von 21 Tagen in s.g. Boxenfermentern. Im Folgenden wird dieser als „Grünschnittgärrest“ (Abbildung 15) bezeichnet.

Im Gegensatz zum dicht gepackten Reisstrohgärrest, der mechanisch schwer zu trennende Klumpen gebildet hat, in dem (wie bereits beim Weizenstrohgärrest) Strohfasern mit bloßem Auge erkennbar waren, hatte der Grünschnittgärrest eine lockere, blumenerde-artige Beschaffenheit und war in sich heterogen zusammengesetzt. Der Grünschnittgärrest enthielt neben vereinzelt Blättern und Zweigen auch nicht-pflanzliche Abfälle (Steine und teilweise Plastikmüll).

Bevor jedoch diese Gärreste (nach Animpfung mit Basidiomyceten) hinsichtlich ihrer Biogasausbeuten vermessen wurden, sollte zunächst nur die Wachstumsfähigkeit dreier ausgewählter Basidiomyceten auf diesen Gärresten untersucht werden. Ziel dieses Versuchs war es, die Wachstumsfähigkeit der jeweiligen Stämme sowohl direkt auf dem Substrat optisch als auch mikrobiologisch in Form von regelmäßigen Ausstrichen der Kulturen auf ampicillin-haltigem SNL-Agar zu beurteilen. Entsprechend wurden in dem hier beschriebenen Abschnitt keine Biogasmessungen durchgeführt.

Es wurden drei ausgewählte Basidiomyceten auf Grünschnitt-, Reisstroh- und Weizenstrohgärrest kultiviert. Dazu wurden zwei emerse Kulturreihen angesetzt, von denen eine autoklaviert wurde (121 °C, 20 min), während die andere keiner thermischen Behandlung unterzogen wurden.

Das Schema dieser emersen Kultivierung ist in Abbildung 91 dargestellt.

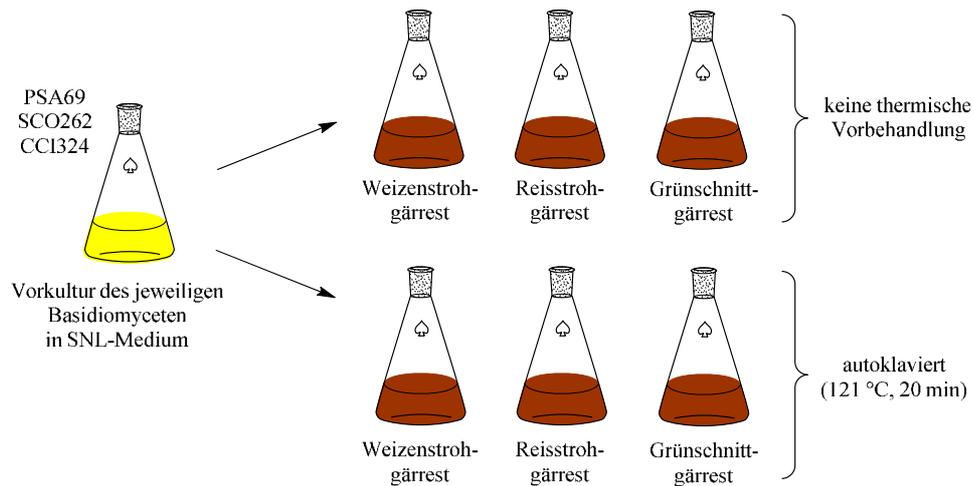


Abbildung 91: Kultivierungsschema der Untersuchung des emersen Wachstumsverhaltens der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf je drei Gärresten (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest). Die obere Kulturreihe wurde vor der Animpfung thermisch nicht vorbehandelt, während die untere Reihe autoklaviert (121 °C, 20 min) wurde. Entsprechende Blindproben (unbeimpfte Gärreste, die autoklaviert bzw. thermisch nicht vorbehandelt wurden) wurden ebenfalls mitgeführt (im Schema nicht gezeigt).

Da die Stämme POS65 und TVE84 auf dem thermisch unvorbehandelten Weizenstrohgärrest kein ausgeprägtes bzw. gar kein Wachstum gezeigt haben (Abschnitt 3.12.1), fiel die Wahl der zu testenden Basidiomyceten neben *Coprinopsis cinerea* 324 auf *Pleurotus sapidus* 69 und *Schizophyllum commune* 262. Diese Basidiomyceten haben in einer vorherigen emersen Kultivierung im Experiment 3.2.1 Wachstum auf Weizenstrohgärrest gezeigt (Tabelle 11), wobei einschränkend anzumerken ist, dass der Gärrest in diesem Versuch (Abschnitt 3.2) autoklaviert wurde.

Die Animpfung erfolgte gemäß des in Abschnitt 2.3.6 beschriebenen Verfahrens. Von allen drei verwendeten Gärresten wurden je 70 g Feuchtmasse in 500-mL-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit Pilzpellet des entsprechenden Stammes von ca. 20 g Biofeuchtmasse, die nach der Ernte der SNL-Medium-Vorkultur erhalten wurden, angeimpft. Anschließend wurde die Hauptkultur durch mechanisches Verrühren unter der Sterilbank homogenisiert. Alle Kulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probenahme von jeweils 0,5-1,0 g festem Material, welches anschließend auf SNL-Agar (mit Ampicillin) ausgestrichen wurde, erfolgte im Abstand von 3-4 Tagen. Ampicillin wurde hierbei verwendet, um das Wachstum der im Gärrest enthaltenen Bakterien auf dem Agar zu unterbinden. Dass das im SNL-Agar hier verwendete Ampicillin für die Basidiomyceten kein Wachstumshindernis darstellt, konnte bereits in einem zuvor durchgeführten Versuch (Abschnitt 3.11) gezeigt werden (Abbildung 82).

### 3.13.1 Ergebnisse

Im Abbildung 92 ist das Wachstumsverhalten des Basidiomyceten CCI324 auf den unterschiedlichen Gärresten (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest) gezeigt. Im Falle des Basidiomyceten PSA69 war lediglich auf dem autoklavierten Grünschnitt- und Weizenstrohgärrest eine geringe Myzelbildung innerhalb der ersten Kultivierungstage zu beobachten, während SCO262 auf keinem der Gärreste Myzel bildete.

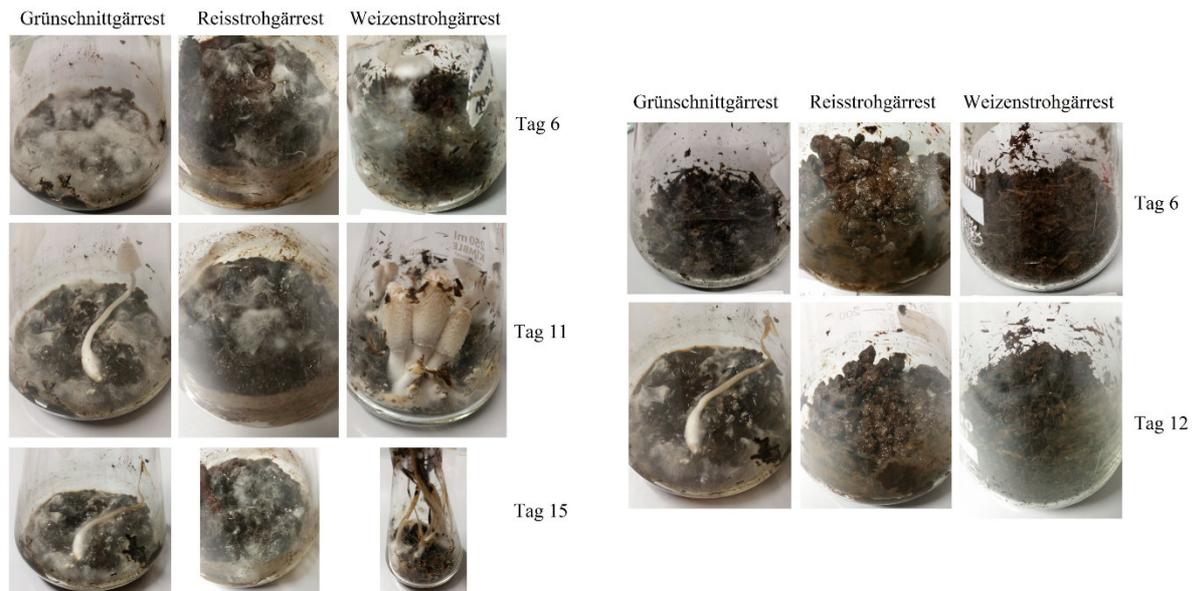


Abbildung 92: Wachstumsverhalten des Basidiomyceten CCI324 auf drei unterschiedlichen Gärresten. Die Gärreste wurden vor der Animpfung autoklaviert (links) bzw. keiner thermischen Vorbehandlung unterzogen (rechts).

In Abbildung 93 sind zusätzlich die Kulturausstriche auf dem SNL-Agar von CCI324 gezeigt. Dagegen wurden im Falle von PSA69 und SCO262 auf dem SNL-Agar keine Wachstumsanzeichen festgestellt.

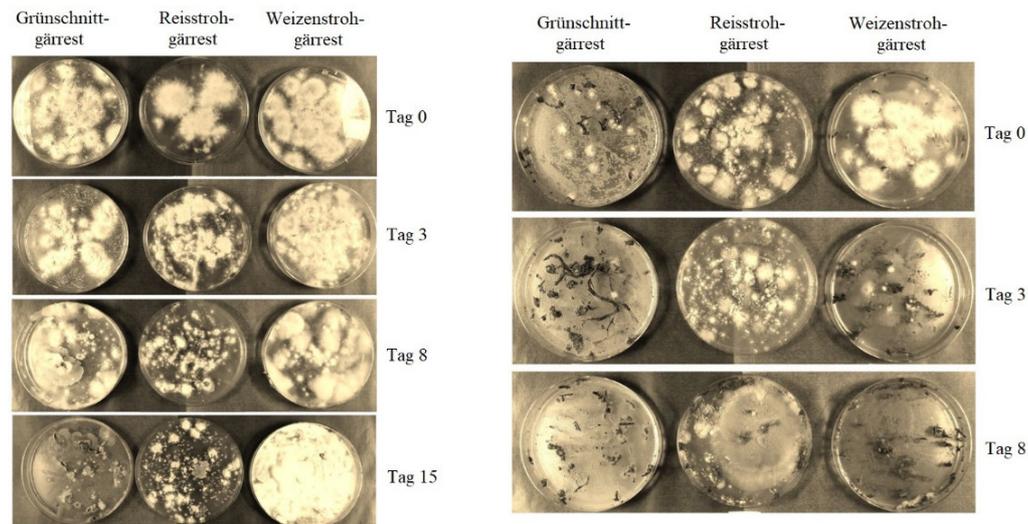


Abbildung 93: Kulturausstriche (auf SNL-Agar mit Ampicillin) zur zeitlichen Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Coprinopsis cinerea* 324 auf autoklavierten (links) und thermisch unvorbehandelten Gärresten (rechts).

### 3.13.2 Diskussion und Ausblick

Bei der Kultivierung der drei Basidiomyceten PSA69, SCO262 und CCI324 zeigte lediglich CCI324 Wachstum auf den Gärresten. Erwartungsgemäß war das Wachstum von CCI324 auf den autoklavierten Gärresten insgesamt ausgeprägter und als auf den thermisch unvorbehandelten Gärresten, was sich anhand der größeren Myzeldichte und Fruchtkörperbildung erkennen ließ.

Zudem war die Vitalität von CCI324 in den autoklavierten Kulturen langlebiger als im Falle der thermisch unvorbehandelten. Dies war in den Kulturausstrichen auf ampicillin-haltigem SNL-Agar daran zu erkennen, dass der Ausstrich aus der autoklavierten Kultur noch am 15. Tag lebendes Myzel zeigte, während im Falle der thermisch unvorbehandelten Kultur bereits am 8. Tag keine Vitalität mehr zu beobachten war.

Der Stamm *Coprinopsis cinerea* 324 hat bereits in einem vorherigen Experiment eine hohe Vitalität auf dem Weizenstrohgärrest gezeigt (Abbildung 71, Abbildung 82). Im hier durchgeführten Versuch wurde bestätigt, dass dieser Pilz auch auf Reisstroh- und Grünschnittgärrest Myzel und Fruchtkörper bilden kann.

Insgesamt haben sich der Grünschnitt- und der Weizenstrohgärrest im Vergleich zum Reisstrohgärrest (unabhängig davon, ob im Vorfeld eine thermische Vorbehandlung der Gärreste erfolgte) als geeignetere Substrate für CCI324 hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit dieses Pilzes erwiesen, da auf diesen der Pilz eine höhere Myzeldichte hat. Zudem hat der autoklavierte Weizenstrohgärrest (verglichen mit dem unbehandelten Analogon) eine Bildung von Fruchtkörpern begünstigt,

während im Falle beider Grünschnittgärreste (autoklaviert und thermisch unvorbehandelt) die Bildung von Fruchtkörpern gleichermaßen begünstigt wurde.

Da jedoch eine Wachstumsfähigkeit des jeweiligen Basidiomyceten nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten Biogasausbeute führt (dies wurde in 3.12.1 gezeigt), galt es zu untersuchen, wie sich die Kultivierung verschiedener Basidiomyceten auf die Biogasausbeuten (in emerser Kulturführung in luftbegasten Biogasreaktoren) dieser erstmalig zu testenden Gärreste (Grünschnitt- und Reisstrohgärrest) auswirkt. Dies ist Gegenstand des nachfolgenden Abschnitts.

### **3.14 Kultivierung dreier ausgewählter Basidiomyceten auf Grünschnittgärrest und Reisstrohgärrest**

In den meisten Experimenten dieser Arbeit (3.2 bis 3.13) wurde für die eingesetzten Weißfäulepilze Weizenstrohgärrest als Substrat verwendet. Im Experiment 3.12 konnte in emerser Kultivierung die Biogasausbeute des Weizenstrohgärrestes durch die verwendeten Weißfäulepilze POS65, TVE84 und CCI324 nicht gesteigert werden. In dem hier beschriebenen letzten Kultivierungsversuch wurden daher als alternative Substrate Reisstroh- und Grünschnittgärrest verwendet.

In zwei aufeinanderfolgenden Kultivierungen wurden jeweils 52 g Reisstrohgärrest (Feuchtmasse) bzw. 70 g Grünschnittgärrest (Feuchtmasse) eingewogen. Die Wahl dieser Einwaagen erfolgte mit der Begründung, dass der jeweilige Festbettreaktor (s. Abbildung 83) ca. zur Hälfte befüllt ist. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Schüttung nicht zu dicht ist und dass das Substrat mit Luft durchströmt werden konnte, um aerobe Bedingungen sicherzustellen. Die Hauptkulturen wurden jeweils mit 29 g Biofeuchtmasse des Pilzpellets aus den SNL-Medium-Vorkulturen angeimpft. Als zu testende Stämme wurden die Weißfäulepilze PSA69, SCO262 und CCI324, die bereits im zuvor beschriebenen Experiment 3.13 zur Wachstumsbeurteilung auf allen drei Gärresten (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest) kultiviert wurden, gewählt. In diesem Versuch sollten mit Hilfe dieser drei Stämme die Biogasausbeuten von thermisch unvorbehandeltem Reisstroh- und Grünschnittgärrest gesteigert werden.

Das Kultivierungsschema wird im Folgenden erläutert.

Es wurden von jedem der drei Basidiomycetenstämme (PSA69, SCO262 und CCI324) je eine Kultur mit Reisstroh- und eine mit Grünschnittgärrest (in luftbegasten Festbettreaktoren) angesetzt, die allesamt am 21. Tag geerntet wurden. Blindproben (unbeimpfte Gärreste) wurden ebenfalls in Festbettreaktoren gleichermaßen belüftet und ebenfalls am 21. Tag geerntet.

Es wurde bereits in einem früheren Kultivierungsversuch (s. Abschnitt 3.3.1) erwähnt, dass die Animpfung selbst einen Input von Biomasse darstellt, die sich in einer Erhöhung der Biogasausbeute äußern muss. Um anhand der Biogasdaten abschätzen zu können, ob eine Erhöhung der Biogasausbeute auf Ligninabbauleistungen oder lediglich auf die Animpfung (d.h. Zugabe von Pilzbiomasse) zurückzuführen ist, wurden „Tag 0“-Kulturen vorbereitet, bei denen derselben Gärrestmenge dieselbe Pilzpelletmasse wie in allen anderen Kulturen zugegeben wurde (in diesem Experiment 29 g Biofeuchtmasse des Inokulums). Diese Kulturen wurden unmittelbar nach dem Animpfen geerntet. Somit kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, dass in diesen Kulturen sich der Gärrest in seiner Zusammensetzung (infolge von Stoffwechselaktivitäten durch Mikroorganismen) verändert hat.

Exemplarisch wurde von der reinen Pilzpelletmasse des Basidiomyceten CCI324 (ebenfalls 29 g Biofeuchtmasse) die Biogasausbeute bestimmt. Auf die Bestimmung der Biogasausbeute der anderen beiden Basidiomyceten (PSA69 und SCO262) wurde verzichtet, da alle Pilze im gleichen Medium vorkultiviert wurden und demnach keine bzw. keine eklatanten Unterschiede im Hinblick auf deren Biogasausbeute aufweisen sollten.

Schematisch ist die Vorgehensweise der Kultivierung in Abbildung 94 gezeigt.

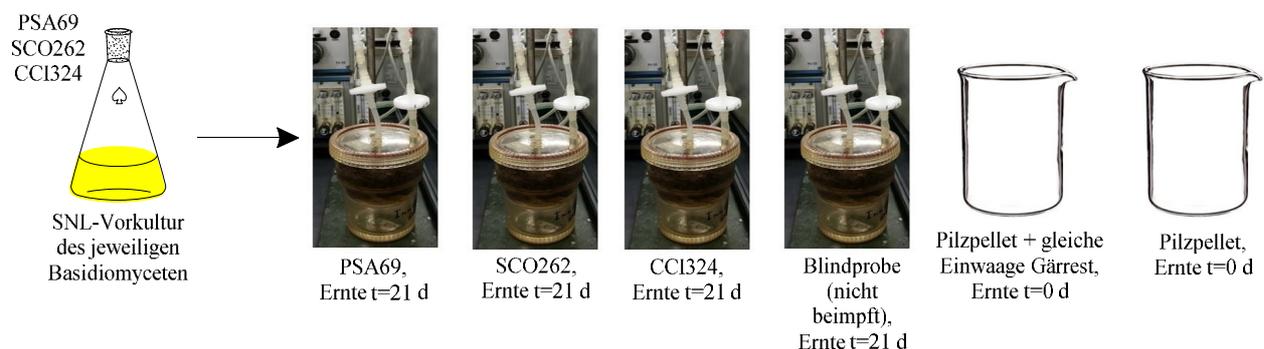


Abbildung 94: Schema der emersen Kultivierung der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Reisstroh- bzw. Grünschnittgärrest. Die beiden Gärreste wurden vor der Animpfung thermisch nicht vorbehandelt. Die Kulturen wurden nach 21-tägiger Inkubation bei Raumtemperatur geerntet. Dagegen wurde die „Tag 0“-Kultur (zweite Kultur von rechts) des jeweiligen Gärrestes (Reisstroh- bzw. Grünschnittgärrest) direkt nach der Animpfung geerntet. Als Referenz wurde die reine Pilz-Inokulummasse (erste Kultur von rechts) mitgeführt, um separat die Biogasausbeute des Inokulums zu bestimmen (repräsentativ wurde dazu die Pilzbiomasse von CCI324 verwendet). Die Blindprobe bezeichnet den jeweiligen unbeimpften Gärrest.

Das Ziel dieser Kultivierung war die Steigerung der Biogasausbeuten des (bisher nicht verwendeten) Reisstroh- und Grünschnittgärrestes durch die drei verwendeten Weißfäulepilze PSA69, SCO262 und CCI324.

Ein Teilziel dieser Kultivierung war es, herauszufinden, ob die Biogasausbeute des beimpften Gärrestes genauso groß ausfällt wie die Summe der Biogasausbeuten des separat vermessenen Gärrestes und des Inokulums.

Die Probenahme aus den Festbettreaktoren erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen gemäß des in 2.3.7 beschriebenen Verfahrens. Dabei wurde eine definierte Menge der Kulturprobe in Wasser suspendiert und nach der Zentrifugation der Überstand für die Messung von pH-Werten und Enzymaktivitäten verwendet.

### 3.14.1 Ergebnisse

#### Wachstum

Das Wachstumsverhalten der Stämme *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf Grünschnittgärrest ist in Abbildung 95 aufgeführt.

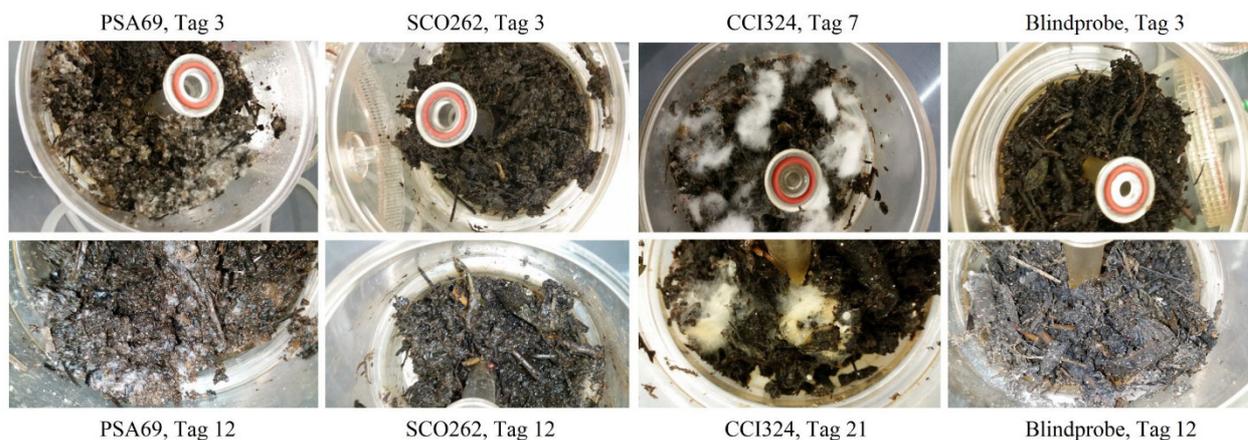


Abbildung 95: Wachstumsverhalten der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in emerser Kultivierung auf Grünschnittgärrest in luftbegasten Festbettreaktoren gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94 zu verschiedenen Kultivierungstagen. Als Blindprobe wurde der nicht beimpfte Grünschnittgärrest verwendet.

Auf Reisstrohgärrest wurden dagegen bei allen drei Stämmen keine Anzeichen von Wachstum beobachtet, sodass im Folgenden keine Fotos dieser Kulturen gezeigt werden.

## pH-Werte

Die pH-Werte der Kultivierungen der Basidiomyceten PSA69, SCO262 und CCI324 auf Reisstroh- bzw. Grünschnittgärrest sind in Abbildung 96 dargestellt.

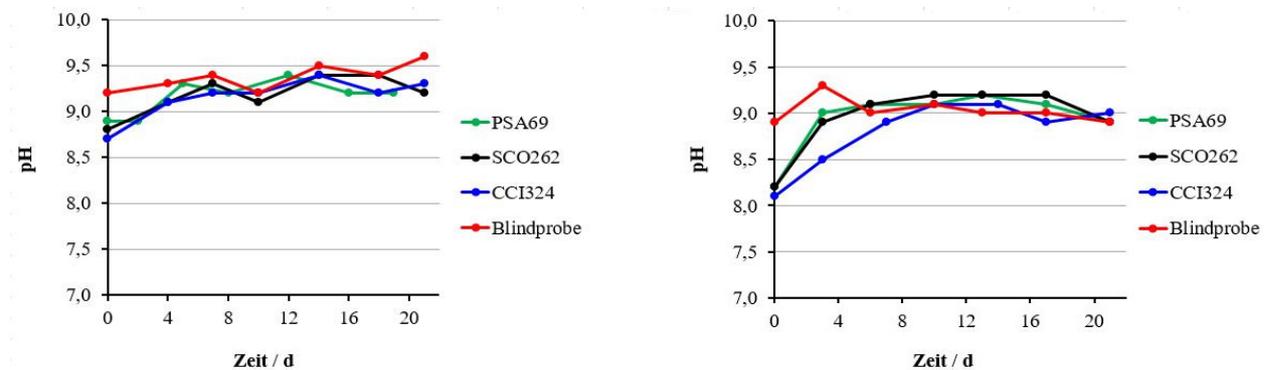


Abbildung 96: pH-Zeit-Profile der emersen Kultivierungen der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf Reisstrohgärrest (links) und Grünschnittgärrest (rechts) in luftbegasteten Festbettreaktoren gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94. Als Blindprobe wurde der jeweils nicht beimpfte Gärrest verwendet.

## Enzymaktivitäten

Die Laccaseaktivitäten der Kultivierung sind in Abbildung 97 gezeigt.

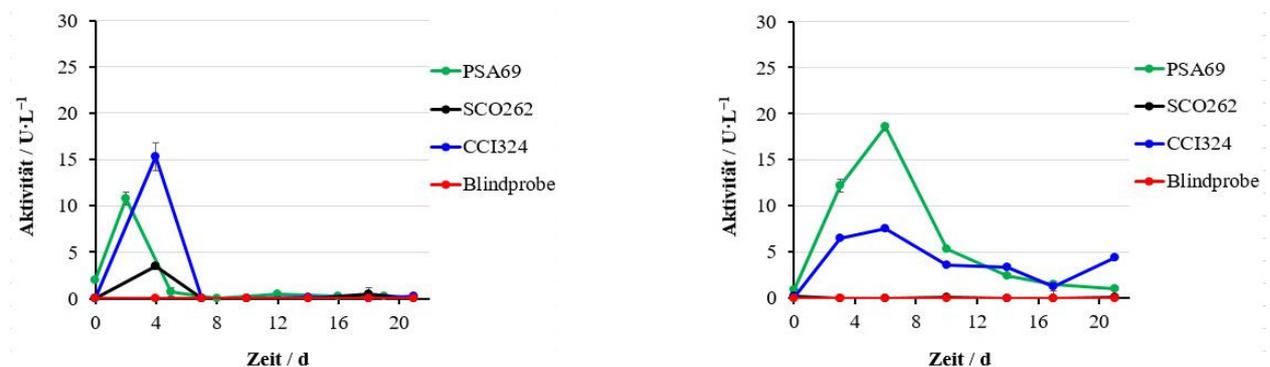


Abbildung 97: Laccaseaktivitäten der emersen Kultivierungen der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) auf Reisstrohgärrest (links) und Grünschnittgärrest (rechts) in luftbegasteten Festbettreaktoren gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94. Als Blindprobe wurde der jeweils nicht beimpfte Gärrest verwendet.

Peroxidase- und Cellulaseaktivitäten wurden weder in den Kulturüberständen des Reisstrohgärrestes noch in denen des Grünschnittgärrestes detektiert. Es wurden keine messbaren Xylanaseaktivitäten in den Kulturen des Reisstrohgärrestes festgestellt. Die Xylanaseaktivitäten der Kultivierung auf Grünschnittgärrest sind in Abbildung 98 dargestellt.

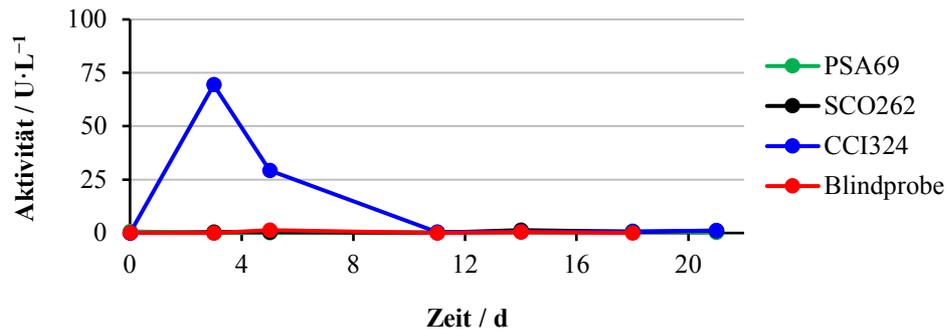


Abbildung 98: Xylanaseaktivitäten der Kulturüberstände der emersen Kultivierung von *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Grünschnittgärrest gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94. Als Blindprobe wurde der unbeimpfte Grünschnittgärrest verwendet.

### Biogasergebnisse

Die Biogasergebnisse der Kultivierungen von PSA69, SCO262 und CCI324 sind in Abbildung 99 für Reisstrohgärrest und in Abbildung 100 für Grünschnittgärrest gezeigt.

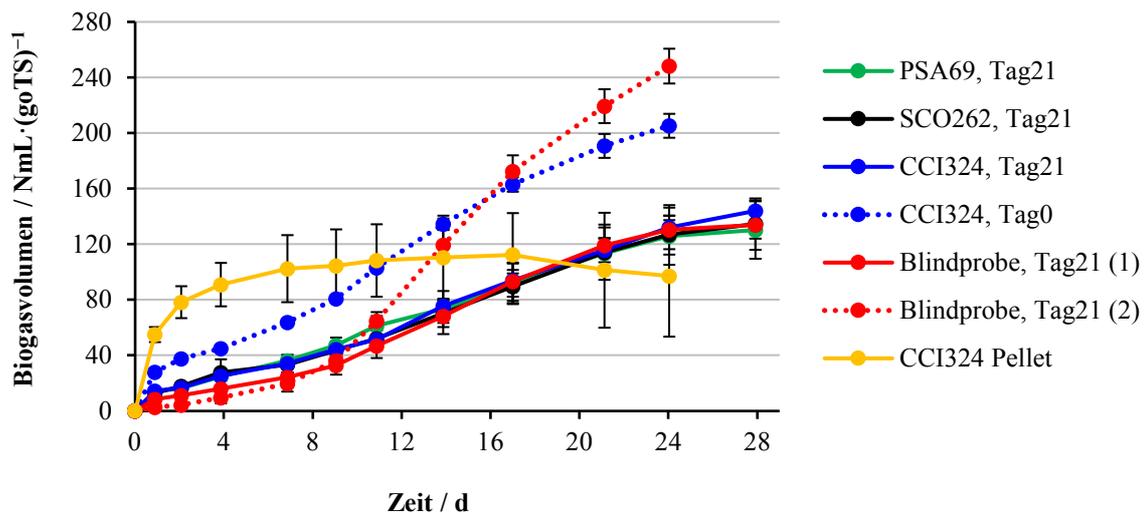


Abbildung 99: Biogasergebnisse der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Reisstrohgärrest gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94. Die Blindprobe bezeichnet den unbeimpften Gärrest. Diese wurde in zwei Chargen „(1)“ und „(2)“ aufgeteilt, die unabhängig voneinander (jeweils in Dreifachbestimmung) vermessen wurden. Die „Tag 0“-Kultur bezeichnet den Gärrest, der unmittelbar nach der Animpfung mit Pilzpellet geerntet wurde. Mit „CCI324 Pellet“ wurde das reine Inokulum von CCI324 bezeichnet.

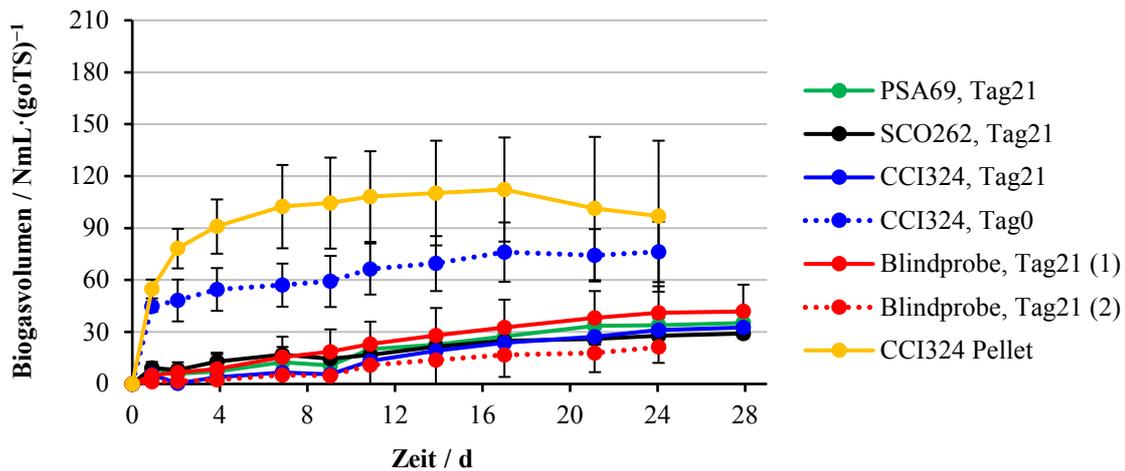


Abbildung 100: Biogasergebnisse der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* 69 (PSA69), *Schizophyllum commune* 262 (SCO262) und *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) in luftbegasten Festbettreaktoren auf Grünschnittgärrest gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 94. Die Blindprobe bezeichnet den unbeimpften Gärrest. Diese wurde in zwei Chargen „(1)“ und „(2)“ aufgeteilt, die unabhängig voneinander (jeweils in Dreifachbestimmung) vermessen wurden. Die „Tag 0“-Kultur bezeichnet den Gärrest, der unmittelbar nach der Animpfung mit Pilzpellet geerntet wurde. Mit „CCI324 Pellet“ wurde das reine Inokulum von CCI324 bezeichnet.

Wie bereits in 3.14 erwähnt, sollte als ein Teilziel dieses Versuchs überprüft werden, ob die Biogasausbeute einer Probe, die den Gärrest und das Pilz-Inokulum enthält, dieselbe Biogasausbeute liefert wie die Summe des separat vermessenen Gärrestes und des Pilz-Inokulums. Ob dieser Sachverhalt zutrifft, wurde anhand der gemessenen Daten (aus der vorherigen beiden Abbildungen) in Abbildung 101 grafisch veranschaulicht.

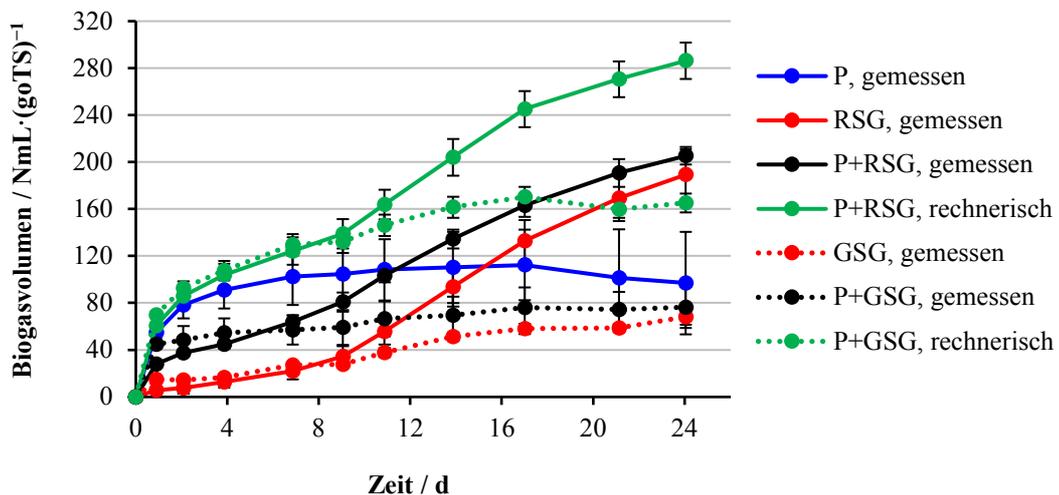


Abbildung 101: Vergleich der Biogasausbeuten beimpfter Gärreste (d.h. Gärrest + Pilzinokulum) mit der Summe der Biogasausbeuten des separat vermessenen Pilzinokulums (P) und des entsprechenden Gärrestes. Somit veranschaulicht diese Grafik, ob „das Ganze (schwarze Kurven) der Summe seiner Teile (grüne Kurven = rote + blaue Kurven) entspricht“. Es wurden hierbei Reisstrohgärrest (RSG) und Grünschnittgärrest (GSG) als Substrate verwendet. Die gemessenen Werte entsprechen den Biogasausbeuten, die aus Abbildung 99 und Abbildung 100 für die „Tag 0“-Kulturen abgelesen wurden. Die rechnerischen Werte entsprechen der Biogasausbeute-Summe des jeweiligen Gärrestes (RSG bzw. GSG) und dem Pilzinokulum (P).

### 3.14.2 Diskussion

#### Wachstum

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Basidiomycetenstämme PSA69 und CCI324 lediglich der Grünschnittgärrest ein brauchbares Substrat darstellte, was anhand der Bildung von Myzel zu erkennen war, während auf dem Reisstrohgärrest alle drei Stämme keine Anzeichen von Wachstum zeigten.

Auf dem Grünschnittgärrest hat der Stamm *Coprinopsis cinerea* 324 am 21. Kultivierungstag stecknadelkopfgroße Primordien gebildet (Abbildung 95), die sich allerdings nicht zum Fruchtkörper weiter entwickeln konnten, da die Kultur an diesem Tag geerntet wurde. Dagegen hat *Pleurotus sapidus* 69 lediglich Myzel, jedoch keine Ansätze von Fruchtkörpern während dieser Kultivierung ausgebildet. Ein solches Wachstumsverhalten, bei dem lediglich Myzel beobachtet wurde, wurde bereits bei der Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 auf Weizenstrohgärrest festgestellt (Abbildung 86). Dagegen zeigte *Schizophyllum commune* 262 auf dem Grünschnittgärrest keine Wachstumsanzeichen.

#### pH-Werte

In allen Kulturen war unmittelbar nach der Animpfung (Tag 0) der pH-Wert stets gegenüber dem der jeweiligen Blindprobe erniedrigt. Dies wurde im Falle beider Gärreste beobachtet und hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass das Pellet, welches zur Animpfung verwendet wurde, aus der SNL-Medium-Vorkultur mit einem pH-Wert von 6,0 erhalten wurde. Die Blindprobe wurde dagegen nicht angeimpft, sodass in diesem Fall keine Zugabe von (leicht saurer) Biomasse erfolgte. Im Falle beider Gärreste war bei den beimpften Kulturen über die Kultivierungszeit eine Alkalisierung zu beobachten, bei der der pH-Wert auf 9,0-9,5 anstieg. Allerdings wurden bezüglich der Verläufe der pH-Wert-Kurven weder auf dem Reisstroh- noch auf dem Grünschnittgärrest stammspezifische Unterschiede festgestellt. Dagegen wurde in einem analogen Kultivierungsversuch mit nicht-autoklaviertem Weizenstrohgärrest eine geringfügige Absenkung des pH-Werts über die Kultivierungszeit beobachtet (Abbildung 87).

### Enzymaktivitäten

Messbare Laccaseaktivitäten wurden im Falle des Reisstroh- und Grünschnittgärrestes bei den getesteten Basidiomyceten PSA69 und CCI324 in Höhe von 15-20 U/L beobachtet. Dass CCI324 auch auf einem ehemals verwendeten Weizenstrohgärrest Laccasen produziert, konnte bereits in einem vorherigen Experiment gezeigt werden (Abbildung 88). Dagegen hat SCO262 auf keinem der beiden Substrate Laccasen produziert.

Im Hinblick auf Xylanasen waren lediglich in den Kulturüberständen von CCI324 in Gegenwart des Grünschnittgärrestes messbare Aktivitäten vorhanden. Dieses Ergebnis ähnelt dem in Abbildung 89 erzielten Ergebnis, bei dem CCI324 bei der emersen Kultivierung auf Weizenstrohgärrest Xylanasen produzierte. Dies bedeutet, dass aufgrund nennenswerter Xylanaseaktivitäten CCI324 in diesen beiden Gärresten (Weizenstroh- und Grünschnittgärrest) die Hemicellulose als Nahrungsquelle genutzt haben muss. Da mit Reisstrohgärrest als Substrat im Falle aller drei getesteten Pilze (PSA69, SCO262 und CCI324) keine Xylanasen gemessen wurden, stellt dieser Gärrest hinsichtlich der Hemicellulose-Verwertung vermutlich keine brauchbare Nährstoffquelle dar. Dies deutet darauf hin, dass der Reisstrohgärrest im Vergleich zu Grünschnitt- und Weizenstrohgärrest ein nährstoffärmeres Substrat für die eingesetzten Weißfäulepilze darstellt.

### Biogasergebnisse

Anhand der Ergebnisse (Abbildung 99 und Abbildung 100) kann abgelesen werden, dass sich die Biogasausbeuten der beimpften Kulturen nicht signifikant von denen der jeweiligen Blindproben (nicht beimpfte Gärreste) unterscheiden haben. Demnach hat die Animpfung der Gärreste keine gesteigerte Biogasausbeute erbracht. Die „Tag 21“-Kulturen (Kulturen, die nach 21-tägiger Inkubationszeit geerntet wurden) von CCI324 wiesen signifikant geringere Biogasausbeuten auf als die entsprechenden „Tag 0“-Kulturen (Kulturen, die direkt nach der Animpfung geerntet wurden). Dafür können im Wesentlichen zwei Gründe genannt werden: Während der 21-tägigen Inkubation hat entweder der Basidiomycet den Gärrest als Nahrungsquelle genutzt oder die im Gärrest enthaltenen Mikroorganismen haben den Gärrest und den Basidiomyceten als Nahrungsquelle genutzt.

Der letztere Aspekt hat bei den meisten vorherigen Kultivierungen (Experimente 3.3 bis 3.9) keine Rolle gespielt, da der Gärrest vor der Animpfung mit Pilzen stets autoklaviert wurde.

Die beiden Erklärungsansätze schließen sich gegenseitig nicht aus. In beiden Fällen trägt die Veratmung von Biomasse dazu bei, dass der Anteil verwertbarer Kohlenstoffquellen sinkt, was zu einer verminderten Biogasausbeute führt.

Bei der Messung der Biogasausbeute des reinen Inokulums fiel auf, dass dabei das Plateau (Maximum der Biogasausbeute) relativ schnell (nach 14 Tagen) erreicht wurde (s. „Pellet“ in Abbildung 99), während die maximalen Ausbeuten der jeweiligen beimpften Kulturen des Reisstroh- und Grünschnittgärrestes selbst am 28. Messtag noch nicht vollständig erreicht wurden. Das schnelle Erreichen des Maximums bei der Vermessung des reinen Inokulums – verglichen mit den Gärrestkulturen – wurde bereits in einem früheren Experiment (Abschnitt 3.5) gezeigt (s. Abbildung 55). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Inokulum, welches aus der SNL-Vorkultur (Vollmedium) erhalten wurde, einerseits leicht verfügbare Nährstoffe (z.B. Glucose und Aminosäuren) gespeichert hat, wodurch die maximale Biogasausbeute nach kurzer Zeit erreicht werden kann. Andererseits ist davon auszugehen, dass das Inokulum keine sonstigen schwer abbaubaren Stoffe (mit Ausnahme des pilzeigenen Biopolymers Chitin) beinhaltet.

Bezüglich des Reisstrohgärrestes wurde in diesem Fall eine große Diskrepanz der Blindproben-Biogasausbeuten festgestellt: der unbeimpfte Gärrest (Blindprobe) wurde zwecks einer Doppelbestimmung in zwei Chargen aufgeteilt. Die Vermessung beider Chargen (jeweils in Dreifachbestimmung) lieferte Biogasausbeuten, die sich um 114 NmL/goTS unterschieden ( $134 \pm 18$  NmL/(goTS) vs.  $248 \pm 13$  NmL/(goTS)), s. Abbildung 99. Da sich die Fehlerbalken (Standardabweichungen) der beiden Mittelwerte nicht überschneiden, ist dieser Unterschied als signifikant zu bezeichnen. Eine plausible Erklärung für diesen Unterschied konnte nicht gefunden werden. Eine gleichermaßen durchgeführte Doppelbestimmung der Biogasausbeute von Grünschnittgärrest führte dagegen zwar zu einem messbaren, jedoch keinem signifikanten Unterschied.

Als Teilziel dieses Versuchs galt es zu überprüfen, ob hinsichtlich der Biogasausbeuten (im Folgenden mit „B“ abgekürzt) „das Ganze der Summe seiner Teile entspricht“, d.h. ob die Gleichung  $B(\text{Gärrest}+\text{Pilz}) = B(\text{Gärrest}) + B(\text{Pilz})$  zutreffend ist. Mathematisch wurde die Gültigkeit dieser Gleichung in Abbildung 101 überprüft. Dabei hat sich herausgestellt, dass Pilz und

Gärrest in einer gemeinsamen Brühe eine geringere Biogasausbeute hervorgebracht haben als die Summe der einzelnen (separat gemessenen) Biogasausbeuten von Pilz und Gärrest<sup>21</sup>. Aus Abbildung 101 geht hervor, dass die Ungleichungen „ $B(P+RSG) < B(P) + B(RSG)$ “ und „ $B(P+GSG) < B(P) + B(GSG)$ “ jedem Zeitpunkt der Messung Gültigkeit haben. Da dieses Ergebnis aussagt, dass die Biogasausbeute des Pilzinokulums in Gegenwart des jeweiligen Gärrestes (Reisstroh- bzw. Grünschnittgärrest) niedriger als in Abwesenheit des Gärrestes ausfällt, deutet es sich an, dass die beiden Gärreste auf die Mikroorganismen des Impfschlammes eine toxische Wirkung haben. Das Zutreffen solch einer Aussage wäre plausibel, da der Gärrest durch Mikroorganismen vergoren wurde und sich entsprechend toxische Ausscheidungsstoffe (bakterielle Abbauprodukte der Bestandteile von Weizenstroh) im Gärrest akkumuliert haben. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Gärreste auf die Basidiomyceten ebenfalls eine toxische Wirkung haben. Das Ausmaß dieser Toxizität kann jedoch an dieser Stelle nicht beurteilt werden, da nach gegenwärtigem Kenntnisstand in der Literatur noch keine ökotoxikologische Bewertung von Strohgärresten aus Biogasanlagen auf Mikroorganismen vorgenommen wurde.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass die Biogasausbeuten von Reisstroh- und Grünschnittgärrest in emerser Kultivierung mit den Basidiomyceten PSA69, SCO262 und CCI324 nicht signifikant gesteigert wurden. Zudem hat sich im Rahmen der durchgeführten Berechnungen gezeigt, dass die Biogasausbeute einer Pilz/Gärrest-Probe geringer ausfiel als die Summe der einzeln vermessenen Biogasausbeuten von Pilz und Gärrest. Das Zutreffen dieser Aussage zeigte sich sowohl beim Reisstroh- als auch beim Grünschnittgärrest, woraus eine gewisse Toxizität dieser beiden vergorenen Substrate abgeleitet wurde.

### 3.14.3 Bewertung der Ergebnisse

In diesem Experiment wurden erstmalig (neben dem in dieser Arbeit bisher hauptsächlich eingesetzten Weizenstrohgärrest) Reisstroh- und Grünschnittgärrest als alternative Substrate für Weißfäulepilze verwendet. Durch eine Animpfung dieser Substrate mit Pilzbiomasse sollte in emerser Kultivierung deren Biogasausbeute gesteigert werden. Allerdings erfolgte auch im Falle dieser

---

<sup>21</sup> Im Folgenden werden der Reisstrohgärrest, der Grünschnittgärrest und das Pilzpellet in gleicher Reihenfolge als RSG, GSG und P abgekürzt.

Gärreste keine Steigerung der Biogasausbeuten im Vergleich zu den Biogasausbeuten der jeweiligen Blindproben (unbeimpfte Gärreste).

Aufgrund der geringen Laccaseaktivitäten und der fehlenden Peroxidaseaktivitäten ist davon auszugehen, dass in diesem Experiment kein Abbau von Lignin stattgefunden hat. Vorhandene Xylanaseaktivitäten gingen mit der Myzelbildung auf dem jeweiligen Gärrest einher, woraus geschlussfolgert wurde, dass der entsprechende Basidiomycet die Hemicellulose als Nahrungsquelle genutzt hat. Allerdings war der letztere Aspekt in diesem Experiment (und in den meisten anderen Versuchen dieser Arbeit) zugleich mit einer Verringerung von Biogas verbunden und ist daher nicht im Sinne des Arbeitsziels. Ideal wäre ein Pilz, der Lignin abbauen würde, ohne sich von der Cellulose und Hemicellulose des Gärrestes zu ernähren.

## 4 Fazit und Bewertung

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene pflanzliche Gärreste (Abfallprodukte der anaeroben Fermentation in Biogasanlagen) mit Weißfäulepilzen nachzubehandeln, sodass durch eine erneute Vergärung deren Biogasausbeuten (gegenüber nicht-nachbehandelten Gärresten) gesteigert werden. Weißfäulepilze haben unter den Basidiomyceten (Ständerpilzen) die einzigartige Fähigkeit, mit Hilfe ihrer Enzyme das schwer abbaubare Biopolymer Lignin abzubauen. Auf mikroskopischer Ebene stellt Lignin eine mechanische Barriere dar, indem es die Zugänglichkeit zu Cellulose und Hemicellulose (den wichtigsten pflanzlichen Ausgangssubstanzen, aus denen Biogas gebildet werden kann) erschwert und somit den limitierenden Faktor hinsichtlich der Biogasmaximierung darstellt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Kultivierungsversuche durchgeführt, in denen mit Hilfe ausgewählter Weißfäulepilze die Steigerung der Biogasausbeute von Strohgärresten zunächst erprobt und anschließend durch die Variation von Kultivierungsbedingungen (pH-Wert, Kultivierungsdauer, Art der Kulturführung etc.) maximiert werden sollte. Die meisten Experimente erfolgten mit Weizenstrohgärrest als Substrat (Abschnitte 3.2 bis 3.13). Zusätzlich wurden in den letzten beiden Versuchen Reisstroh- und Grünschnittgärrest verwendet (Abschnitte 3.13 und 3.14).

Der Übersicht halber sei hier auf das allgemeine Schema in Abbildung 12 (Abschnitt 2.10) verwiesen, nach dem alle Kultivierungsversuche in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Im Folgenden werden alle durchgeführten Experimente sowie die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen in Kürze zusammengefasst.

Im ersten Experiment dieser Arbeit (Abschnitt 3.2) wurden acht Weißfäulepilze in submerser Kultivierung in Weizenstrohgärrest-Brühen und 36 Weißfäulepilze in emerser Kultivierung auf dem Weizenstrohgärrest direkt kultiviert. In beiden Fällen wurde der Gärrest im Vorfeld autoklaviert. In der submersen Kulturführung wurden die höchsten Aktivitäten von Laccasen und Peroxidasen (ligninabbauende Enzyme) bei *Trametes versicolor* 84 sowie den Stämmen der Gattung *Pleurotus* festgestellt. In emerser Kulturführung zeigte die Mehrheit der 36 getesteten Stämme auf dem Weizenstrohgärrest kein Wachstum (z.B. in Form von Myzel oder Fruchtkörpern), während im Falle der meisten *Pleurotus*-Spezies ein ausgeprägtes Wachstum beobachtet wurde. Ein moderates emerses Wachstum zeigte der Stamm *Schizophyllum commune* 262.

Somit wurde geschlussfolgert, dass insbesondere *Pleurotus*-Spezies als besonders geeignet für die Kultivierung auf diesem Gärrest sind.

Basierend auf den Erkenntnissen des ersten Versuchs wurden für das Screening, dem zweiten Experiment dieser Arbeit (Abschnitt 3.3), überwiegend Pilze der Gattung *Pleurotus* eingesetzt. Es wurden 16 Stämme submers und fünf Stämme emers kultiviert. Erstmalig wurden in diesem Versuch Biogasausbeuten aller submerser und emerser gemessen. Außerdem wurden in den Submerskulturen chemische Parameter (pH-Wert, Enzymaktivitäten, Gesamtphenolgehalt) erfasst, die im Zusammenhang mit der Biogasausbeute stehen könnten. Es zeigte sich in den Submerskulturen im Falle von 15 von 17 verschiedenen Kulturen und in emerser Kulturführung im Falle von vier von fünf eine gesteigerte Biogasausbeute. Zu diesem Zeitpunkt schien die Realisierbarkeit des Arbeitsziels als bestätigt. Da die Biogasausbeuten in der submersen Kulturführung höher als in der emersen ausfielen, wurde in den darauffolgenden Experimenten submers kultiviert.

Es wurden für die folgenden Kultivierungen, in denen die Kultivierungsparameter (pH-Wert, Kultivierungsdauer, Art der Kulturführung, Massenverhältnis von Gärrest zu Inokulum) variiert werden sollten, die vielversprechendsten Pilze ausgesucht. Die Auswahlkriterien waren nicht nur hohe Biogasausbeuten, sondern auch hohe Laccaseaktivitäten, da diese Enzyme am Abbau von Lignin beteiligt sind. Dies waren überwiegend Stämme der Gattung *Pleurotus*.

In einem weiteren Versuch (Abschnitt 3.4) galt es, anhand der drei ausgewählten Weißfäulepilze POS65, PSA224 und PSAJ284 in submerser Kulturführung das optimale Massenverhältnis von Gärrest zu Pilzinokulum zu bestimmen, das die höchste Biogasausbeute hervorbringt. Als Substrat wurde hierbei autoklavierter Weizenstrohgärrest verwendet. Anhand der gemessenen Biogasdaten konnte jedoch kein optimales Verhältnis ermittelt werden, da die Biogasausbeuten der einzelnen Kulturen sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Zudem zeigten die Daten keinen klaren Trend, sodass kein Erkenntnisgewinn resultierte, der sich für die nachfolgenden Kultivierungen nutzen ließe.

Im dritten Experiment (Abschnitt 3.5) sollte durch die submerse Kultivierung von POS65 in der Weizenstrohgärrest-Brühe durch Variation des Erntezeitpunktes die optimale Kultivierungsdauer bestimmt werden, die zum Erreichen der maximalen Biogasausbeute nötig ist. Als Modellorganismus wurde POS65 gewählt, da dieser Stamm unter 16 verschiedenen Basidiomyceten beim

Screening (Abschnitt 3.3) die höchste Biogasausbeute hervorbrachte. Durch die Messung der Biogasausbeuten der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kulturen konnte allerdings kein Optimum abgelesen werden, da die Biogasausbeuten der einzelnen Kulturen (einschließlich der Blindprobe) sich nicht signifikant voneinander unterschieden haben. Zudem konnte die im Screening (Abschnitt 3.3) erzielte Biogasausbeute von  $424 \pm 33$  NmL/(goTS) nicht reproduziert werden, da die durchschnittliche Biogasausbeute in allen Kulturen dieses Versuchs lediglich ca.  $300 \pm 20$  NmL/(goTS) betrug. Für diese Diskrepanz konnte keine zufriedenstellende Begründung gefunden werden. Es wurde vermutet, dass möglicherweise der Pilz in diesem Versuch in der Gärrestbrühe nur wenig Vitalität gezeigt hat. Somit würde kein Lignin abgebaut werden und infolgedessen würde dies zu keiner signifikanten Biogasausbeute-Differenz zwischen den beimpften Kulturen und der Blindprobe (nicht beimpfter Gärrest) führen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Kultivierung des exemplarisch ausgewählten Pilzes POS65 bei einem voreingestellten pH-Wert, um die Biogasausbeute im Vergleich zu einer Referenz-Kulturreihe mit nativem pH-Wert des Weizenstrohgärrestes zu steigern (Abschnitt 3.6).

Der Weizenstrohgärrest an sich hat einen alkalischen pH Wert, wohingegen ligninolytische Enzyme aus Weißfäulepilzen ihr Optimum im sauren Bereich bei 3,5-6,0 haben<sup>22</sup>. Daher wurde erwartet, dass das Kultivieren bei pH 6,0 einen Vorteil in Bezug auf die Biogasmaximierung darstellt. Vor dem Animpfen beider Weizenstrohgärrest-Kulturreihen wurde der Gärrest autoklaviert. Die Kulturreihen beider pH-Werte wurden zudem über einen Zeitraum von 25 Tagen in Intervallen von 3-4 Tagen geerntet, um zusätzlich Informationen über die Biogasausbeute in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit zu erhalten.

Die Kultivierung des Stammes POS65 bei pH 6,0 (voreingestellt mittels Natriumphosphatpuffer) zeigte jedoch gegenüber der Referenzreihe mit nativem pH-Wert des Gärrestes keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Biogasausbeuten. Zudem ließ sich aus den verschiedenen Biogasausbeuten der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kulturen kein Trend erkennen.

Als ein Teilziel dieser Arbeit wurde ein mathematischer Zusammenhang zwischen messbaren Parametern (Enzymaktivitäten, Gesamtphenolgehalt, Inokulummasse, Ergosterolgehalt) und der entsprechenden Biogasausbeute einer Kultur gesucht (Abschnitte 3.3 und 3.4). Wenn solch ein Parameter gefunden werden würde, der stets proportional zur Biogasausbeute ist, ließe sich

---

<sup>22</sup> Auf die entsprechende Literatur, die diese Aussage belegt, wurde bereits in Abschnitt 3.3.2 eingegangen.

dadurch auf langwierige GB21-Versuche (zur Messung der Biogasausbeute), die in der Regel 26-32 Tage dauern, verzichten. Die Auftragung sämtlicher o.g. Messgrößen gegen die Biogasausbeute zeigte jedoch keine erkennbare Korrelation. Dies wurde damit begründet, dass eine gesteigerte Biogasausbeute nicht das Ergebnis eines einzigen Parameters ist (z.B. der Laccaseaktivität), sondern in komplexer Weise durch das Zusammenspiel mehrerer Parameter (Lebensfähigkeit und -dauer der Pilze in der Kulturbrühe, Vorhandensein von Peroxidaseaktivitäten und kohlenhydratabbauenden Enzymaktivitäten etc.) bestimmt wird.

Im Verlauf dieser Arbeit erfolgte die Isolierung eines (zunächst nicht bekannten) Basidiomyceten, der auf einem Kompostmieten-Strohgärrest Fruchtkörper bildete und somit als vielversprechender Basidiomycet für die Nachbehandlung strohhaltiger Gärrest erachtet wurde. Nachdem eine Reinkultur dieses Pilzes isoliert wurde, konnte nach einer ITS-Sequenzierung dieser Pilz als *Coprinopsis cinerea* (Wollstieliger Tintling) identifiziert werden, der in der Literatur als Weißfäulepilz bekannt ist. Diesem Pilz wurde die interne Stammnummer 324 zugeordnet und der Stamm als CCI324 abgekürzt.

In einem weiteren Kultivierungsversuch (Abschnitt 3.8) wurden neben diesem Stamm zur Animpfung des autoklavierten Gärrestes auch jeweils die Weißfäulepilze POS65 und TVE84, die sich beim Screening (Abschnitt 3.3) als besonders aussichtsreich erwiesen haben, verwendet. Bis auf eine einzige Kultur (TVE84, Erntezeitpunkt 14 Tage) zeigte keine der übrigen Kulturen gesteigerte Biogasausbeuten im Vergleich zur Blindprobe (unbeimpfter Gärrest). Trotz der Tatsache, dass CCI324 auf Weizenstrohgärresten grundsätzlich wachstumsfähig war, was sich in einer Bildung von Fruchtkörpern und Myzel äußerte, zeigten die Biogasergebnisse der mit CCI324 beimpften submersen Gärrestkulturen verglichen zur Blindprobe keine gesteigerten Biogasausbeuten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sah vor, eine Kultivierung unter Nährstoffzugabe durchzuführen (Abschnitt 3.9). Dazu wurden in autoklavierten Weizenstrohgärrest-Kulturen mit 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse vor der Animpfung Konzentrationen von 10 g/L Glucose und 2,4 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  eingestellt. Diese sollten dem Weißfäulepilz *Coprinopsis cinerea* 324 (CCI324) als Starthilfe dienen, um einen effizienteren Ligninabbau zu erzielen oder diesen gar erst zu ermöglichen. Infolge dieses Ligninabbaus sollte die Biogasausbeute erhöht werden. Die Kulturen wurden nach 7, 14 und 21 Tagen geerntet, um zusätzlich Aussagen über eine optimale Kultivierungszeit zu erhalten. Dabei hat sich gezeigt, dass die Auswertung der Biogasergebnisse durch die supplementierten Stoffe selbst erschwert wurde. Dies hing damit zusammen, dass diese Nährstoffe von den Mikroorganismen des Impfschlammes (der zur Biogasmessung benötigt wird) ebenfalls

zur Biogasbildung genutzt werden können. Dadurch resultierten in diesem Experiment in den Blindproben Biogasausbeuten, die im Durchschnitt um ca. 100 NmL/(goTS) höher waren als die Blindproben-Biogasmesswerte in den zuvor durchgeführten Versuchen. Dieser Umstand erschwerte die Unterscheidung, ob die gesteigerten Biogasausbeuten lediglich das Resultat der Supplementierung waren oder ob tatsächlich ligninabbau-basierte Biogasausbeute-Steigerungen erzielt wurden.

Werden die Biogasergebnisse isoliert betrachtet (unter Vernachlässigung der Tatsache, dass eine Supplementierung erfolgte), ergab sich dennoch im Falle der meisten beimpften Kulturen gegenüber der jeweiligen Blindprobe keine Steigerung der Biogasausbeute.

In den bisher geschilderten Ergebnissen wurde stets mit autoklaviertem Weizenstrohgärrest gearbeitet. Inwieweit das Autoklavieren selbst eine Steigerung der Biogasausbeute bewirkt, sollte erstmalig im nachfolgend zusammengefassten Experiment (Abschnitt 3.10), welches in Abwesenheit von Basidiomyceten durchgeführt wurde, untersucht werden. Dazu wurde sowohl der pure Weizenstrohgärrest (20 % Trockenmasse) als auch eine Weizenstrohgärrest-Suspension (6 % Trockenmasse) unterschiedlichen thermischen Vorbehandlungen ausgesetzt. Die Gärreste wurden bei Temperaturen von 60 °C bzw. 80 °C (im Ofen) und 121 °C (im Autoklaven) bei Inkubationsdauern von jeweils 20 und 60 min ausgesetzt und von diesen Gärresten die Biogasausbeuten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der Autoklaviervorgang an sich bereits eine erhebliche Steigerung der Biogasausbeute bewirkte: Während bei einer thermisch mild vorbehandelten Gärrest-Suspension (60 °C, 20 min) eine Biogasausbeute von  $233 \pm 24$  NmL/(goTS) gemessen wurde, resultierte bei einer autoklavierten Suspension (121 °C, 20 min) eine Ausbeute von  $331 \pm 14$  NmL/(goTS). Da das Arbeitsziel vorsieht, dass der Pilz allein die Steigerung der Biogasausbeute bewirken soll, wurde der Gärrest fortan keiner thermischen Vorbehandlung mehr unterzogen.

Bisher wurden lediglich im Screening-Versuch (Abschnitt 3.3) erhöhte Biogasausbeuten in den beimpften Submerskulturen (verglichen zur Blindprobe) erzielt. Seitdem konnte diese Steigerung der Biogasausbeuten in keinem der nachfolgenden Versuche mit submerser Kulturführung reproduziert werden. Daher wurde ab diesem Zeitpunkt beschlossen, die Kultivierungsstrategie zu ändern. Es wurde in den folgenden Versuchen auf submerse Kultivierungen verzichtet und stattdessen emerse Kultivierungen durchgeführt. In einer früheren emersen Kultivierung (ebenfalls Bestandteil des Screening-Versuchs) konnte auf autoklaviertem Weizenstrohgärrest mit Hilfe bestimmter Weißfäulepilze eine signifikant erhöhte Biogasausbeute erzielt werden. Ob solch ein

Erfolg auch mit nicht-autoklaviertem Weizenstrohgärrest erzielt werden kann, wurde im nächsten Experiment (Abschnitt 3.12) untersucht. Hierbei kam ein modifiziertes emerses Kultivierungsverfahren zum Einsatz, welches nachfolgend kurz beschrieben wird.

In Anlehnung an das Kompostmieten-Verfahren, in dem Basidiomyceten zum Abbau organischer Materie wie z.B. Lignocellulose oder auch Umweltschadstoffen zum Einsatz kommen und an die Festphasenfermentation (SSF engl. *solid-state fermentation*), die einer emersen Kultivierung entspricht, wurde entschieden, in allen folgenden Experimenten einen Mittelweg aus beiden Verfahren zu finden und diesen für den Abbau von Lignin in Gärresten zu nutzen. Dieser Mittelweg wurde dadurch realisiert, dass in luftbegasten Festbettreaktoren (ca. 20 cm Höhe und 12 cm Durchmesser) Weizenstrohgärrest vorgelegt und mit Pilzen beimpft wurde. Dabei erfolgte eine schwache Begasung des unsterilen beimpften Gärrestes über einen Zeitraum von 21 Tagen. Im Experiment 3.12 haben zwei Stämme (POS65 und TVE84) verglichen zur Blindprobe keine signifikante Biogasausbeute-Steigerung erbracht und im Falle von CCI324 wurde sogar eine signifikante Verringerung der Biogasausbeute festgestellt. Dies wurde mit der Wachstumsfähigkeit von CCI324 (Myzel- und Fruchtkörperbildung) auf dem Weizenstrohgärrest in Verbindung gebracht: Das Wachstum des Pilzes erfordert die Nutzung verwertbarer Kohlenstoffquellen (vor allem die Cellulose und Hemicellulose des Gärrestes), was wiederum mit einer Verringerung der Biogasausbeute einhergeht.

Im letzten Versuch dieser Arbeit (Abschnitt 3.14) wurden Reisstroh- und Grünschnittgärrest als Substrate verwendet. In ähnlicher Weise wie im zuvor beschriebenen Versuch erfolgte eine Kultivierung in luftbegasten Festbettreaktoren. Dabei kamen die Weißfäulepilze PSA69, SCO262 und CCI324 zum Einsatz. Die Auswahl dieser Pilze erfolgt deshalb, weil sie in einem zuvor beschriebenen Versuch (Abschnitt 3.3) Wachstum auf Weizenstrohgärrest in Form von Myzel zeigten.

Aus den Biogasergebnissen konnte abgeleitet werden, dass keiner der Pilzstämme signifikante Biogasausbeute-Steigerungen im Vergleich zum nicht-beimpften Gärrest bewirkte. Da hierbei der Reisstroh- und Grünschnittgärrest nicht autoklaviert wurden, konnte nicht ausgesagt werden, inwieweit die Biogasergebnisse auf Ligninabbauleistungen oder Stoffwechselaktivitäten des jeweiligen Basidiomyceten zurückzuführen waren oder lediglich auf die Stoffwechselaktivitäten der gärrest-inhärenten Mikroorganismen.

Zudem konnte in diesem Versuch nachweislich gezeigt werden, dass der Gärrest selbst eine inhibierende Wirkung auf die Mikroorganismen des Impfschlammes hat, der zur Bestimmung der

Biogasausbeute eingesetzt wird. Folglich wurde geschlussfolgert, dass der Gärrest auch eine inhibierende bzw. toxische Wirkung auf die Basidiomyceten hat.

Die Summe der Erkenntnisse hat gezeigt, dass in den verschiedenen Versuchen die Biogasausbeuten der Gärreste durch eine Nachbehandlung mit den verwendeten Weißfäulepilzen nicht gesteigert werden konnte. Zwar fielen in einzelnen Messungen die Biogasausbeuten der beimpften Kulturen höher aus als die der entsprechenden Blindproben (unbeimpfte Gärreste), jedoch konnten in der Mehrheit der Messungen in systematischen Versuchsreihen signifikante Biogasausbeute-Steigerungen nicht erzielt werden.

Die Gründe dafür werden im Folgenden diskutiert.

### Nährstoffmangel

Der Weizenstrohgärrest, der von einer Biogasanlage zur Strohvergärung bezogen wurde, ist ein Abfallprodukt der Bioethanol- und Biogasherstellung. Nach anaerober Vergärung des Getreidekorns mit Hefen wird durch Destillation Bioethanol gewonnen. Als Destillationsrückstand verbleibt die s.g. „Schlempe“, die zusammen mit kleingehäckseltem Stroh in die Biogasanlage überführt wird. Mit einer mittleren Verweilzeit von 30 Tagen entsteht durch anaerobe Fermentation der s.g. Gärrest: Ein Produkt, welches mittels Vergärung durch eine Vielzahl symbiotisch lebender Bakterien und Archaeen erhalten wurde. Nach dieser Verweilzeit in der Biogasanlage ist der Großteil der verwertbaren Kohlenstoffquellen (insbesondere Cellulose und Hemicellulose) verbraucht, wie in Tabelle 14 gezeigt. Allgemein sinkt der Gehalt verwertbarer Kohlenstoffquellen mit steigendem Vergärungsgrad.

Tabelle 14: Durchschnittliche Zusammensetzung der oTS (org. Trockensubstanz) von Weizenstroh und Weizenstrohgärrest in Massenprozent. Hierbei wurde angenommen, dass Lignin während der Fermentation nicht abgebaut wird, da der Ligninabbau ein aerober Prozess ist.

|                   | <b>Weizenstroh</b> | <b>Weizenstrohgärrest</b> |
|-------------------|--------------------|---------------------------|
| Cellulose / %     | 46                 | 29                        |
| Hemicellulose / % | 29                 | 18                        |
| Lignin / %        | 25                 | 53                        |

Zwar sind diese Daten eher ungefähre Kenngrößen bezüglich des Biomasseabbaus, dennoch zeigen sie, dass der Anteil der (für die Weißfäulepilze nutzbaren) C-Quellen im Gärrest gegenüber dem Weizenstroh geringer ist. Der verringerte Anteil an Nährstoffquellen erschwert dem Pilz die

Lebensbedingungen, sodass ein Ligninabbau, der zu einer erhöhten Biogasausbeute führen würde, ebenfalls erschwert wird.

Der Abbau von Lignin in Lignocellulose durch Weißfäulepilze in natürlichen Ökosystemen wird – im Gegensatz zu den hier durchgeführten *in-vitro*-Versuchen – zudem dadurch ermöglicht, dass der Pilz sich von Nährstoffen, die letztendlich von Pflanzen durch Fotosynthese kontinuierlich generiert werden oder auch von abgestorbener organischer Materie (z.B. totes Pflanzen- und Tiermaterial) ernähren kann. Unter den Umständen solch einer stetigen Energiezufuhr ist es über lange Zeiträume möglich, dass die Hyphen des Pilzes lignocellulosehaltiges Material wie beispielsweise Totholz durchdringen und Lignin abbauen. Zudem stellt Totholz im Gegensatz zum Gärrest wegen der höheren Kohlenhydratanteile eine brauchbarere Energiequelle dar.

#### Konkurrenz des Basidiomyceten mit anderen Mikroorganismen im Gärrest

Wird ein thermisch unvorbehandelter Gärrest mit Basidiomyceten beimpft, so gibt es eine Konkurrenz mit anderen (noch lebenden) Mikroorganismen um die verwertbaren Kohlenstoffquellen Cellulose und Hemicellulose. Die Tatsache, dass Ascomyceten und Bakterien schneller als Basidiomyceten wachsen, erschwert deren Lebensbedingungen ebenfalls.

Dieser Punkt entfällt, wenn z.B. der Gärrest im Vorfeld autoklaviert wurde.

#### Verwendung des Inokulums als Nahrungsquelle

Sofern der Gärrest vor der Animpfung nicht autoklaviert wurde, können die im Gärrest enthaltenen Mikroorganismen das frische Pellet (welches gerade aus dem Vollmedium erhalten wurde und noch Glucose und Aminosäuren gespeichert hat) selbst als Nahrungsquelle verwenden. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn der Basidiomycet auf dem Gärrest an sich ohnehin nicht wachstumsfähig ist<sup>23</sup> und nach dem Absterben durch die gärrest-inhärente Mikroflora metabolisiert wird.

#### Ausscheidungsstoffe

Bei dem Gärrest handelt es sich um ein fermentiertes Produkt, in dem sich Ausscheidungsstoffe der anaeroben Mikroflora aus der Biogasanlage akkumuliert haben. Diesen teilweise giftigen

---

<sup>23</sup> Generell kann die Wachstumsfähigkeit von Basidiomyceten auf dem Gärrest dadurch überprüft werden, dass der Gärrest autoklaviert und anschließend angeimpft wird. Anzeichen für Wachstum sind Myzelbildung, Fruchtkörperbildung, pH-Änderungen, enzymatische Aktivitäten etc.

Stoffen waren die zur Animpfung verwendeten Basidiomyceten, die zum Zweck des selektiven Ligninabbaus genutzt wurden, ausgesetzt.

Die Vermutung eines gewissen Toxizitätsgrades der verwendeten Gärreste wird durch die Ergebnisse einer Biogasmessung gestützt, in der eine Vergärung einer Probe, die Pilzbiomasse und den Gärrest enthielt eine geringere Biogasausbeute lieferte als die Biogasausbeute-Summe der separat vermessenen Pilz- und Gärrestprobe gleicher Biomassen. Anders ausgedrückt: Die Vergärung des Ganzen lieferte weniger Biogas als die Summe der separaten Vergärung der beiden einzelnen Bestandteile.

Da dieses Ergebnis belegt, dass der Gärrest auf die Mikroorganismen des Impfschlammes, der zur Messung der Biogasausbeute einer Probe im Rahmen der GB21-Versuche verwendet wird, eine toxische Wirkung hat, wurde geschlussfolgert, dass derselbe Gärrest auf die Basidiomyceten ebenfalls eine toxische Wirkung hat.

#### Stoffwechsel des Basidiomyceten in Konkurrenz zur Biogasausbeute-Steigerung

Diese beiden Aspekte stehen in einem konkurrierenden Verhältnis zueinander. Um auf dem Gärrest wachsen zu können, ist der Pilz darauf angewiesen, sich von verwertbaren Kohlenstoffquellen (vor allem Cellulose und Hemicellulose) zu ernähren. Zugleich bedeutet dieses Wachstum (Veratmung selbiger C-Quellen) gerade, dass die Biogasausbeute sinkt, da diese die Basis für die Biogasbildung darstellen. Die Lebensfähigkeit des Pilzes ist jedoch eine notwendige Voraussetzung dafür, dass er zu einem Ligninabbau in der Lage ist. Der hypothetisch optimale Basidiomycet ist demnach jener, der lediglich ligninolytische Enzyme sekretiert, ohne sich von der vorhandenen Cellulose und Hemicellulose zu ernähren (dies würde zu einem realen Biogasanstieg führen). Allerdings ist das ein Widerspruch in sich, da die Produktion und Sekretion von Enzymen mit einem Energieaufwand verbunden ist, die hauptsächlich durch die Katabolisierung verwertbarer Kohlenstoffquellen aus der Umgebung erreicht werden kann.

Das Wachstum des Pilzes auf dem Gärrest geht demnach notwendigerweise mit einer verringerten Biogasausbeute einher.

#### pH-Optima von Enzymen, die am Abbau von Lignin beteiligt sind

Am Abbau von Lignin sind Laccasen, Manganperoxidasen und Ligninperoxidasen beteiligt. Für einen möglichst effizienten Ligninabbau sollte der pH-Wert des Substrats möglichst in der Nähe der pH-Optima dieser Enzyme liegen. In der Literatur zeigt sich, dass die pH-Optima dieser drei Enzyme stets im sauren Milieu liegen (ca. 3,0-6,0).

Für die pH-Optima von Laccasen aus unterschiedlichen Weißfäulepilzen finden sich je nach Gattung und Spezies Werte von pH 3,0-6,0 (El-Batal *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2005; Kumaran *et al.*, 1997; Lisova *et al.*, 2010; Marques de Souza & Peralta, 2003; More *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 1999; Stoilova *et al.*, 2010; Zucca *et al.*, 2011). Im Falle einer Laccase des Basidiomyceten *Meripilus giganteus* wurde sogar ein pH-Optimum von 2,0 festgestellt (Schmidt *et al.*, 2012). Dass Laccasen ein pH-Optimum im sauren Bereich haben müssen, ist bereits aus der laccase-katalysierten Oxidations-Teilreaktion  $4 e^- + 4 H^+ + O_2 \rightarrow 2 H_2O$  ersichtlich, da hierbei Protonen verbraucht werden.

Für Manganperoxidasen aus unterschiedlichen Basidiomyceten wurden pH-Optima von 3,5-6,0 festgestellt (Boer *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2016; Perie *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2005; Ürek & Pazarlioğlu, 2004).

Ligninperoxidasen aus Basidiomyceten haben je nach Gattung und Spezies pH-Optima von 2,0-6,0 (Gomes *et al.*, 2009; Ollikka *et al.*, 1993; ten Have *et al.*, 1998; Tien *et al.*, 1986).

Die verwendeten Gärreste hatten dagegen stets alkalische pH-Werte (ca. 7,5-9,0). Dies schließt einen effizienten Ligninabbau aus, da die meisten ligninolytischen Enzyme – sofern diese in Gegenwart des Gärrestes überhaupt produziert werden – im alkalischen Bereich keine nennenswerte Restaktivität haben. Somit ist der Ligninabbau nur dann möglich, wenn entweder der Pilz selbst den pH-Wert des Mediums im Verlauf der Kultivierung durch die Produktion von Säuren herabsenkt (dies wurde in einigen Kultivierungen beobachtet, wobei diese pH-Senkung nur teilweise reproduzierbar war) oder wenn bereits von vornherein pH-regulierende Chemikalien eingesetzt werden. Die letztere Option steht jedoch einerseits im Widerspruch zum Arbeitsziel, Lignin mit Hilfe von Basidiomyceten bei möglichst wenig Input abzubauen. Andererseits führte in genau solch einem Experiment die Justierung des pH-Werts mittels eines  $NaH_2PO_4$ -Puffers in submersen Gärrestkulturen auf 6,0 dennoch zu keiner Steigerung der Biogasausbeute, wofür keine plausible Erklärung gefunden wurde.

#### Fehlen von Peroxidaseaktivitäten

In den meisten Kultivierungen dieser Arbeit wurden (insbesondere im Falle der *Pleurotus*-Spezies und bei *Coprinopsis cinerea*) in den Kulturüberständen Laccaseaktivitäten festgestellt. Das Vorhandensein von Laccaseaktivitäten ist zwar eine notwendige Voraussetzung für den Abbau von Lignin, jedoch nicht die einzige.

Ergebnisse in der Literatur deuten darauf hin, dass Laccasen allein nicht imstande sind, Lignin abzubauen (Munk *et al.*, 2015). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Laccasen mit 0,5-0,8 V ein

zu niedriges Redoxpotential aufweisen (Widsten & Kandelbauer, 2008), während für die oxidative Spaltung benzyllischer Alkohole und Etherbrücken, die größtenteils in Lignin vorkommen, Redoxpotentiale von  $> 1,5$  V nötig sind (Galli & Gentili, 2004). Manganperoxidasen (MnP) und Ligninperoxidasen (LiP) haben dagegen Redoxpotentiale von 1,1-1,5 V (Fakoussa & Hofrichter, 1999; Liers *et al.*, 2014) und damit auch ein größeres Oxidationsvermögen als Laccasen, um die Untereinheiten des Lignins abzubauen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass neben Laccasen die Beteiligung von MnP und LiP für den Ligninabbau unentbehrlich ist.

Die meisten Experimente in dieser Arbeit haben gezeigt, dass bei den üblicherweise verwendeten Gärrestkonzentrationen von 6-8 % Trockenmasse keine Peroxidasen sekretiert wurden. Die Bildung von Peroxidasen wurde lediglich bei weitaus niedrigeren Gärrestkonzentrationen im Bereich 0,53-2,63 % Trockenmasse festgestellt (Abbildung 26).

Angesichts dieser Befunde stellt sich die Frage, unter welchen Umständen Weißfäulepilze imstande sind, Peroxidasen zu bilden. In der Literatur wurde die Produktion von MnP und LiP meist in flüssigen Medien festgestellt, die 1-10 % (*w/v*) Glucose und unterschiedliche Konzentrationen von Stickstoffquellen (meist Hefeextrakt oder Pepton) sowie Puffern und Spurenelementen enthielten (Lankinen *et al.*, 2005; ten Have *et al.*, 1997; ten Have *et al.*, 1998; Tien & Kirk, 1988; Ürek & Pazarlioğlu, 2004). In einem Experiment dieser Arbeit, in dem den submersen Weizenstrohgärrestkulturen (mit Gärrestkonzentrationen von 4 %, 6 % und 8 % Trockenmasse) vor der Animpfung mit Pilzen 10 g/L Glucose und 2,4 g/L Ammoniumnitrat supplementiert wurden, führte dennoch zu keiner Produktion von Peroxidasen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass selbst Konzentrationen von 4 % Trockenmasse dieses Gärrestes auf den Pilz toxisch wirken.

In einer anderen Quelle konnte gezeigt werden, dass in emerser Kultivierung (SSF engl. *solid-state fermentation*) bei der Verwendung von nicht-vergorenem Weizen- und Reisstroh als Substrat verschiedene Basidiomyceten in der Lage waren, MnP und LiP zu bilden (Gomes *et al.*, 2009).

Ebenfalls wurde in der Literatur die Produktion von lignocellulose-abbauenden Enzymen (Laccasen, Cellulasen und Xylanasen) auf Gärresten mit Hilfe von Basidiomyceten untersucht (Musatti *et al.*, 2017). Allerdings sind nach gegenwärtigem Kenntnisstand keine anderen Literaturquellen bekannt, in denen bei der Kultivierung von Weißfäulepilzen auf Gärresten Aktivitäten von MnP oder LiP erreicht wurden, die für einen effizienten Ligninabbau nötig wären.

Zusammenfassend wird an dieser Stelle festgehalten, dass – basierend auf den Ergebnissen, die in dieser Arbeit erzielt wurden und den Literaturquellen – die Bildung von Peroxidasen (MnP und LiP) vermutlich nur in Medien erfolgt, die einerseits hinreichende Mengen verwertbarer Kohlen-

stoff- und Stickstoffquellen sowie Spurenelemente aufweisen. Andererseits darf auch die Gärrestkonzentration nicht zu hoch sein, da ansonsten die Produktion bzw. Sekretion von Peroxidasen nachweislich erschwert wird. Da in dieser Arbeit die Gärrest-Nachbehandlung mit Weißfäulepilzen möglichst wirtschaftlich und realitätsnah umgesetzt werden sollte, wurde in den submersen Kultivierungen mit einer Gärrest-Trockenmasse von 8 % gearbeitet. Dies stellt die Obergrenze dar, bis zu der die Gärrest-Suspension eine Pumpbarkeit aufweist. Bei dieser Konzentration wurden allerdings keine Peroxidaseaktivitäten beobachtet. In einer Gärrest-Nachbehandlung mit Weißfäulepilzen, welche wirtschaftlich betrachtet optimal wäre, wurden ebenfalls aufgrund der höheren Gärrest-Konzentration keine Peroxidasen festgestellt. Insofern kam es in beiden Kulturführungen zu keinen gesteigerten Biogasausbeuten.

#### Zeitliche Aspekte und Selektivitätsaspekte bzgl. des Ligninabbaus

Der Ligninabbau ist ein langwieriger Prozess. Fachliteratur, die den zeitlichen Verlauf des Ligninabbaus in Gärresten (unter Einsatz von Weißfäulepilzen) beschreibt, gibt es nach gegenwärtigem Kenntnisstand noch nicht. Allerdings kann hierzu eine Literaturquelle genannt werden, in dem auf die zeitliche Dauer des Ligninabbaus in Weizenstroh, einem unvergorenen Substrat, eingegangen wird. Dabei wurde der zeitliche Verlauf des Abbaus von Lignocellulose in Weizenstroh durch *Pleurotus ostreatus* var. *florida* untersucht (Ginterová & Lazarová, 1987). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 15 aufgeführt. Hierzu wurde Weizenstroh fein gemahlen und nach Zugabe von Wasser (Endfeuchtigkeitsgehalt von 80 %) autoklaviert und die Proben mit Myzel beimpft. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Proben gezogen und auf Cellulose, Hemicellulose und Lignin analysiert.

Tabelle 15: Abbau von Lignin (L), Cellulose (C) und Hemicellulose (H) in Weizenstroh als Substrat durch *Pleurotus ostreatus* var. *florida* nach (Ginterová & Lazarová, 1987).

| Parameter           | Days of growth |      |      |      |      |      |
|---------------------|----------------|------|------|------|------|------|
|                     | 0              | 11   | 19   | 26   | 32   | 41   |
| Material mass, g    | 2.93           | 2.85 | 2.75 | 2.65 | 2.50 | 2.40 |
| Relative content, % |                |      |      |      |      |      |
| C                   | 36.7           | 36.7 | 35.4 | 35.8 | 34.0 | 35.8 |
| H                   | 48.8           | 40.3 | 40.9 | 43.0 | 42.0 | 40.2 |
| L                   | 25.7           | 23.1 | 22.9 | 20.8 | 19.6 | 19.6 |
| Absolute mass, g    |                |      |      |      |      |      |
| C                   | 1.07           | 1.05 | 0.97 | 0.95 | 0.85 | 0.86 |
| H                   | 1.43           | 1.29 | 1.25 | 1.14 | 1.05 | 0.97 |
| L                   | 0.75           | 0.66 | 0.63 | 0.55 | 0.49 | 0.47 |
| Losses, %           |                |      |      |      |      |      |
| C                   | 0              | 2.4  | 9.2  | 11.6 | 20.7 | 20.0 |
| H                   | 0              | 9.5  | 21.2 | 20.2 | 26.5 | 32.3 |
| L                   | 0              | 12.4 | 16.2 | 26.6 | 34.6 | 37.4 |

So zeigen die Ergebnisse, dass nach einer Inkubationszeit von 41 Tagen in einer Probe von 2,93 g Weizenstroh-Startmaterial 0,28 g Lignin abgebaut wurden (Differenz aus 0,75 g zu t=0 d und 0,47 g zu t=41 d). Dies entspricht einem Abbau von 37 % Lignin, während Cellulose und Hemicellulose in Anteilen von 20 % und 32 % abgebaut werden. Da allerdings diese Prozentzahlen für Weizenstroh als Substrat nur eine geringfügige Abbau-Selektivität zugunsten des Lignins gegenüber Cellulose und Hemicellulose zeigen, ist zu erwarten, dass beim Weizenstrohgärrest (= vergorenes Weizenstroh) diese Zahlen umso mehr zu Ungunsten des Ligninabbaus verschoben sind.

In einer anderen Literaturquelle wurden vier unterschiedliche lignocellulosehaltige Substrate mit dem Weißfäulepilz *Phanerochaete flavido-alba* beimpft, wobei nach 21-tägiger Inkubation sowohl Lignin als auch die Kohlenhydrate abgebaut wurden (López *et al.*, 2013). Somit wurde keine erhöhte Biogasausbeute nach der Behandlung dieser Substrate mit dem genannten Weißfäulepilz festgestellt. Daher ist anzunehmen, dass wenn der Erfolg bei Strohsubstraten ausblieb, dieser Erfolg höchstwahrscheinlich auch bei Strohgarresten ausbleiben wird.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der in diesem Fazit genannten acht Gründe sagen, dass die Nachbehandlung dreier pflanzlicher Gärreste (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest) mit Basidiomyceten zu keiner gesteigerten Biogasausbeute führte und somit das Arbeitsziel nicht erreicht werden konnte.

## 5 Ausblick

Die Ergebnisse in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Lignin in den verwendeten lignocellulosehaltigen Nebenströmen der Fermentation (Weizenstroh-, Reisstroh- und Grünschnittgärrest) mit Hilfe von Weißfäulepilzen in der geforderten Zeit von 3-4 Wochen nicht abgebaut werden konnte, sodass folglich die Biogasausbeuten dieser Substrate nicht gesteigert werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass die verwendeten Weißfäulepilze in den meisten Kultivierungsversuchen Xylanasen sekretiert haben. Xylanasen sind wiederum kohlenhydratabbauende Enzyme, und der Kohlenhydratabbau in Gärresten führt allgemein zur Verringerung der Biogasausbeute dieser Substrate. Daher wäre es ein Ansatz, diese Pilze durch Gen-Knockouts so zu modifizieren, dass sie nicht mehr zur Bildung von kohlenhydratabbauenden Enzymen (Cellulasen und Xylanasen) in der Lage sind. Da solch ein Einschnitt den normalen Kohlenhydratstoffwechsel erheblich einschränkt, müsste zunächst die Lebensfähigkeit solcher Pilzmutanten sichergestellt werden. Im Erfolgsfall könnten diese Mutanten sich von den Abbauprodukten des Gärrest-Lignins ernähren. Bei vollständigem Ligninabbau würden anschließend die Cellulose und Hemicellulose freiliegen, sodass die Rücküberführung dieses nachbehandelten Gärrestes in die Biogasanlage zu gesteigerten Biogasausbeuten führen würde.

Zudem haben die meisten verwendeten Weißfäulepilze bei den üblicherweise eingesetzten Gärrestkonzentrationen von 8 % Trockenmasse meist Laccasen sekretiert, während Peroxidasen nicht sekretiert wurden. Daher wäre es ein Ansatz, die Produktion von Peroxidasen, die aufgrund ihres höheren Redoxpotentials zum Ligninabbau entscheidend beitragen, zu verstärken. Dazu könnten genetisch modifizierte Mikroorganismen verwendet werden, in die Gene von Manganperoxidase (MnP) oder Ligninperoxidase (LiP) hoher Aktivitäten aus einem ausgewählten Weißfäulepilz inkliniert wurden. Durch transkriptionsverstärkende Elemente (z.B. durch einen starken Promotor) ließe sich die Transkriptionsrate erhöhen und durch Einführung einer bestimmten DNA-Sequenz in das Genom dieser Mutante die Sekretion der entsprechenden Peroxidasen ermöglichen.

Die verstärkte Produktion und Sekretion allein reicht für einen verbesserten Ligninabbau allerdings nicht aus, da der Gärrest in der Regel einen alkalischen pH-Wert hat, während ligninabbauende Enzyme ihr Optimum bei sauren pH-Werten haben. Dafür müsste jedoch der Gärrest angesäuert werden, was allerdings mit einem unerwünschten Input von Säuren bzw. Puffern

verbunden wäre. Zudem hätte ein geänderter pH-Wert Auswirkungen auf die Mikroflora der Biogasanlage, sobald dieser nachbehandelte Gärrest in die Biogasanlage zurücküberführt werden würde.

Ein weiterer Aspekt, der im Falle dieser beiden Methoden bedacht werden müsste, ist, dass dadurch biologische Stoffströme mit genetisch veränderten Mikroorganismen behandelt werden würden. Während Substrate, die in der Biogasanlage vergoren werden, anschließend typischerweise auf Ackerflächen ausgebracht werden, dürfte der mit GVOs nachbehandelte Gärrest erst nach dem Beweis der Unbedenklichkeit der GVOs in die Biogasanlage überführt und nach diesem Gärprozess auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebracht werden.

Der Einsatz kommerzieller Enzyme (Laccasen, Manganperoxidasen, Ligninperoxidasen) zur Nachbehandlung von Gärresten wäre zwar denkbar, allerdings wäre die dafür nötige Investition zur Einstellung hinreichend hoher Enzymaktivitäten so hoch, dass sich dieser Prozess nicht rentieren würde. Zudem müsste auch in diesem Fall der pH-Wert der Gärreste so angepasst werden, dass die Enzyme überhaupt eine ausreichende Aktivität hätten.

Ebenfalls ist es möglich, Abwärmen aus großtechnischen Prozessen für eine Nachbehandlung des Gärrestes zu nutzen, um die Lignocellulose-Struktur auf thermischem Wege partiell zu zerstören, um eine bessere Zugänglichkeit zur Cellulose- und Hemicellulose zu ermöglichen. Da dafür der Gärrest allerdings aus der Biogasanlage an einen anderen Ort gebracht werden müsste, an dem nutzbare Abwärmen zur Verfügung stehen und anschließend zurück in die Biogasanlage transportiert werden müsste, wäre dies mit einem logistischen Aufwand verbunden. Die wirtschaftliche Rentabilität eines solchen Prozesses hängt unter anderem von der Temperatur, die durch die Abwärme erzeugt werden kann und der Einwirkungsdauer auf den Gärrest ab.

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Biogausbeute bei der Nachbehandlung von Gärresten ist der Einsatz von nicht-biologischen Katalysatoren. Grundsätzlich ist bei solch einem katalytischen Abbau von organischer Materie nicht der bloße Abbau entscheidend, sondern auch, welche Abbauprodukte dabei entstehen. Erste Ansätze zum katalytischen Ligninabbau wurden in der Literatur schon erprobt (Wu *et al.*, 2017). Allerdings wurde in diesem Fall von kommerziellem Lignin ausgegangen, das in wässrigen Alkalien löslich ist (vermutlich s.g. „alkali-lösliches Lignin“) und mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  und eines  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ -Katalysators zu  $\text{CO}_2$  oxidiert wurde. Da das Endprodukt

dieser katalytischen Zersetzung CO<sub>2</sub> war, stellt dies jedoch nicht das Optimum im Sinne eines Biogaszugewinns dar. Zudem kann an dieser Stelle nicht ausgesagt werden, ob der in der Literatur erzielte erfolgreiche Abbau von alkali-löslichem Lignin auch auf das feste Lignin in der Lignocellulose-Struktur in Gärresten anwendbar ist. Optimal wäre es, einen oder mehrere Katalysatoren zu finden oder gar erst zu synthetisieren, die auf schonende Weise (d.h. ohne den Einsatz extremer pH-Werte oder extremer Temperaturen) eine vollständige Depolymerisation des Lignins in die Monolignole ermöglichen. Dabei müssen diese Katalysatoren keine Selektivität gegenüber Lignin allein aufweisen, denn eine komplette Depolymerisation der gesamten Lignocellulose in die jeweiligen Monomere würde ebenfalls einen Erfolg hinsichtlich der Maximierung der Biogausbeute darstellen. Optimal wäre ein Katalysator, der so beschaffen ist, dass er über Redoxreaktionen das Lignin in die Monolignole und über hydrolytische Spaltungsreaktionen die Kohlenhydrate in die jeweiligen Zuckereinheiten zerlegen kann. Als besonders vorteilhaft würde sich in diesem Fall derjenige Katalysator erweisen, der für die oxidative Spaltung von Lignin Substrate nutzt, die nicht mit finanziellem Input verbunden sind. Denkbar wären hierfür Sauerstoff aus der Luft oder die Nutzung von Sonnenlicht (Photokatalyse) zur Aktivierung bzw. Regeneration des Katalysators.

Festzuhalten bleibt, dass es trotz jahrzehntelanger Forschungsbemühungen in der Reststoffverwertung nach wie vor keine zufriedenstellende Methode für den Abbau von Lignin in lignocellulosehaltigen Abfällen gibt, sodass die in diesem Ausblick beschriebenen Verfahren zukünftig erprobt werden können.

## 6 Anhang

### 6.1 Thermodynamische Daten

Tabelle 16: Standardbildungsenthalpien  $\Delta_f H^0$  und Standardentropien  $\Delta S^0$  ausgewählter Stoffe, die im Zuge der Biogasbildung entstehen bzw. verbraucht werden.

| Substanz          | Strukturformel                                | $\Delta_f H^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $\Delta S^0 / \text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ |
|-------------------|---|--|---|
| Kohlenstoffdioxid | CO <sub>2</sub>                               | -393,5   | 213,8   |
| Wasser            | H <sub>2</sub> O                              | -241,8   | 188,8   |
| Wasserstoff       | H <sub>2</sub>                                | 0  | 130,7   |
| Methan            | CH <sub>4</sub>                               | -74,9  | 186,3   |
| Ethanol           | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH            | -1367,6  | 159,9   |
| Essigsäure        | CH <sub>3</sub> COOH                          | -483,5   | 193,7   |
| Propansäure       | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH          | -510,8   | 191,0   |
| Milchsäure        | CH <sub>3</sub> CH(OH)COOH                    | -673,6   | 192,1   |
| Glucose           | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | -1273,3  | 209,0   |

### 6.2 Inokulummassen der submersen Kultivierung in 3.3.1

Tabelle 17: Übersicht der Pilz-Inokulummassen, die in Abschnitt 3.3.1 in den submersen Kulturen A und B (Doppelbestimmung) gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 28 verwendet wurden. Eine Übersicht der hier abgekürzten Pilzstämme findet sich in Tabelle 7.

| Stamm   | Inokulummasse / g |          |
|---------|-------------------|----------|
|         | Kultur A          | Kultur B |
| PER60   | 25,3              | 25,0     |
| PPU61   | 21,1              | 20,5     |
| PLA64   | 26,2              | 26,6     |
| POS65   | 13,0              | 12,9     |
| PSA69   | 19,5              | 19,8     |
| TVE84   | 24,4              | 24,7     |
| POS216  | 20,5              | 20,6     |
| PSA224  | 21,6              | 20,9     |
| PSA224* | 26,0              | 26,3     |
| PDR252  | 19,0              | 19,0     |
| PFL256  | 29,8              | 29,6     |
| HAI274  | 20,0              | 19,6     |
| FTR276  | 19,4              | 19,7     |
| PSAJ284 | 28,5              | 29,2     |
| ABI295  | 6,3               | 5,4      |
| PDR301  | 13,9              | 14,0     |
| POS302  | 14,9              | 14,6     |

### 6.3 Laccase- und Peroxidaseaktivitäten zu 3.2.2.1

Sofern im Falle bestimmter Stämme keine Enzymaktivitäten gemessen wurden, wurden die entsprechenden Datenreihen in den nachfolgenden Diagrammen nicht gezeigt.

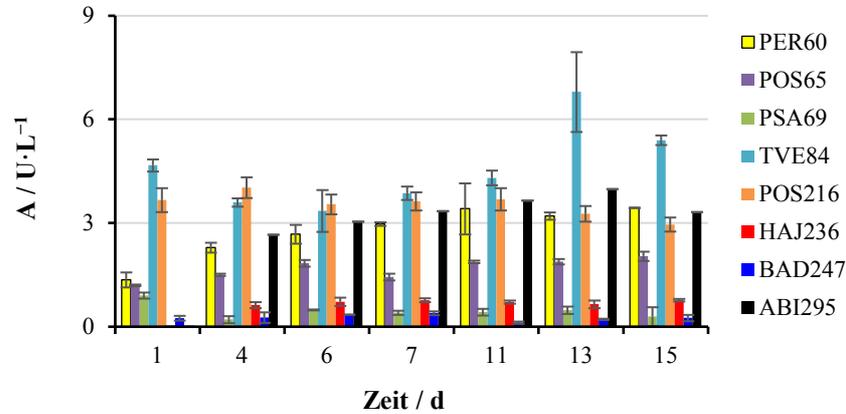


Abbildung 102: Laccaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 0,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

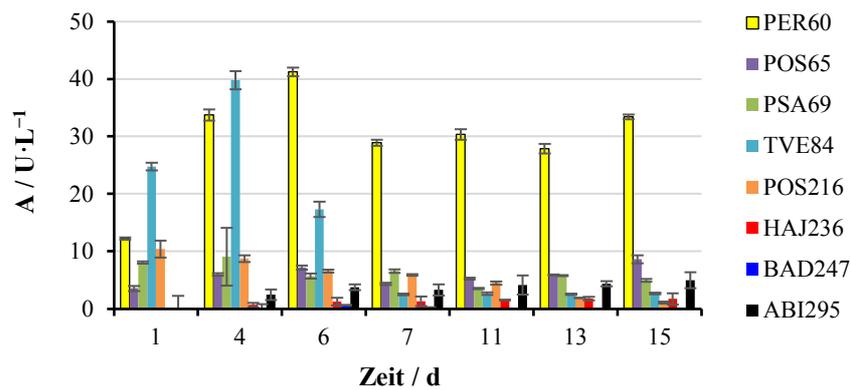


Abbildung 103: Laccaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 2,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

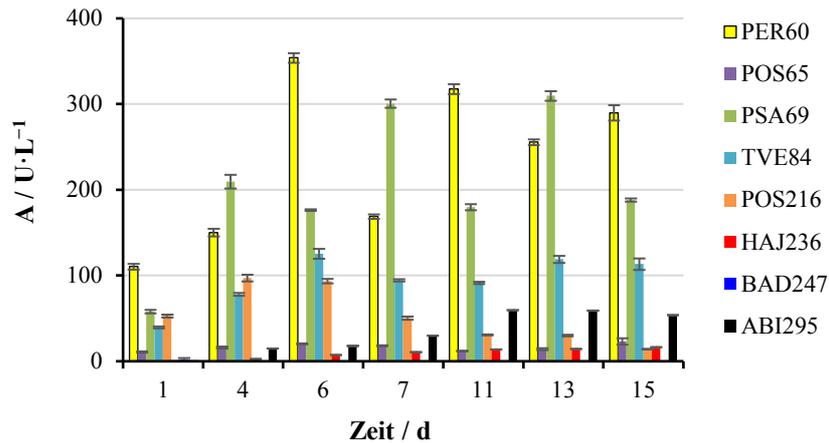


Abbildung 104: Laccaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 12,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

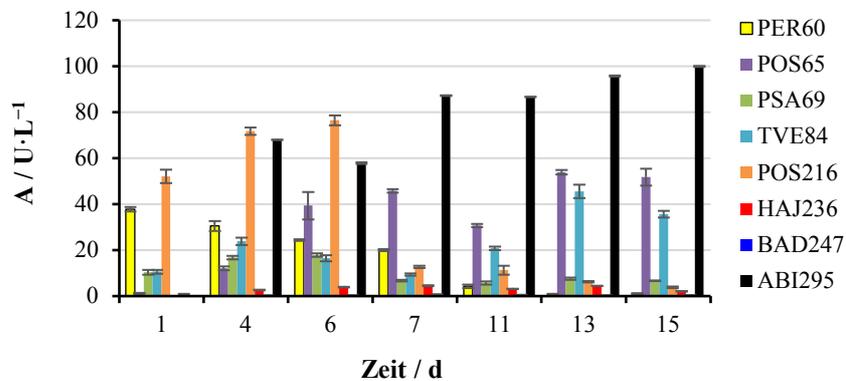


Abbildung 105: Laccaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in der SNL-Hauptkultur (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

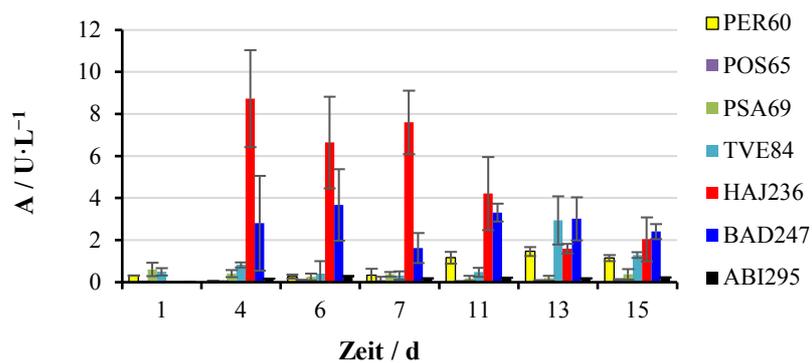


Abbildung 106: Peroxidaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 0,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

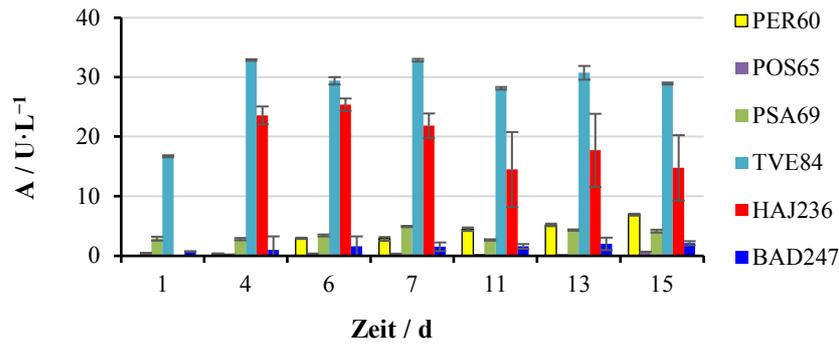


Abbildung 107: Peroxidaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 2,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

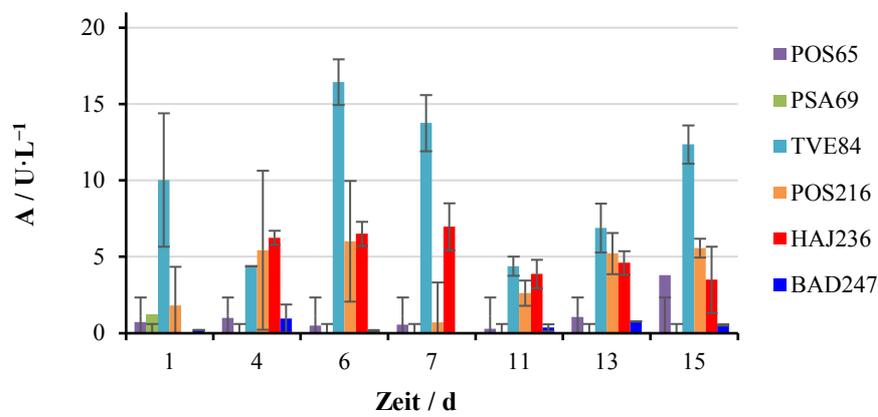


Abbildung 108: Peroxidaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in 12,5 % Weizenstrohgärrest (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

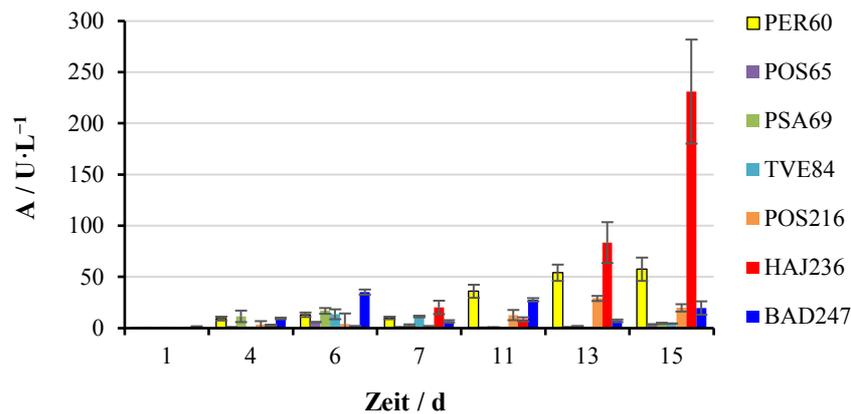


Abbildung 109: Peroxidaseaktivitäten in den Kulturüberständen verschiedener Basidiomyceten in der SNL-Hauptkultur (Kultivierungsschema: Abbildung 22).

## 6.4 Biogasausbeuten zu 3.6.1

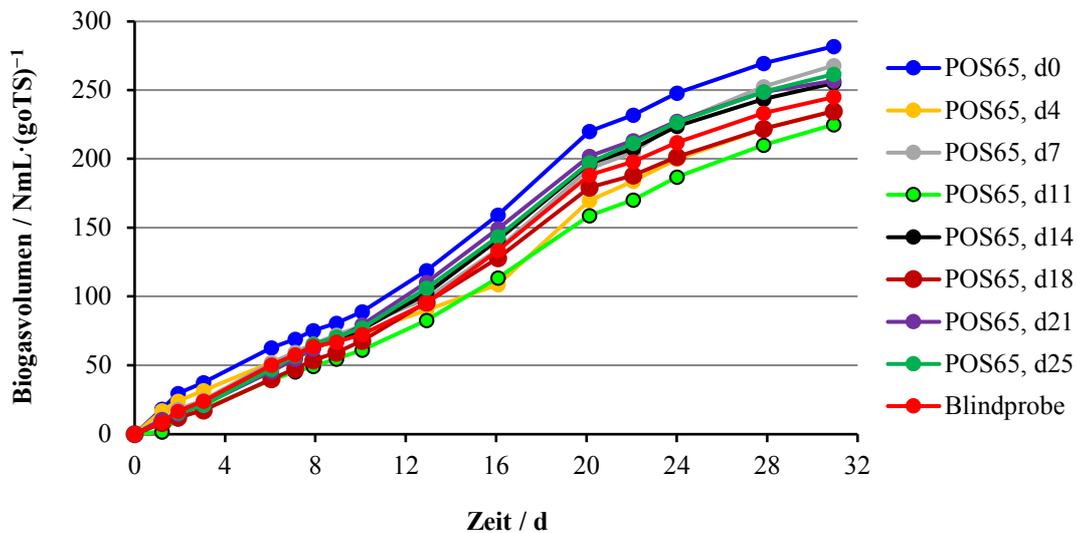


Abbildung 110: Biogasdaten der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) bei nativem pH-Wert des Weizenstrohgärrestes gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 58. Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension mit nativem pH-Wert verwendet. Die Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden der Übersicht halber nicht eingezeichnet. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag.

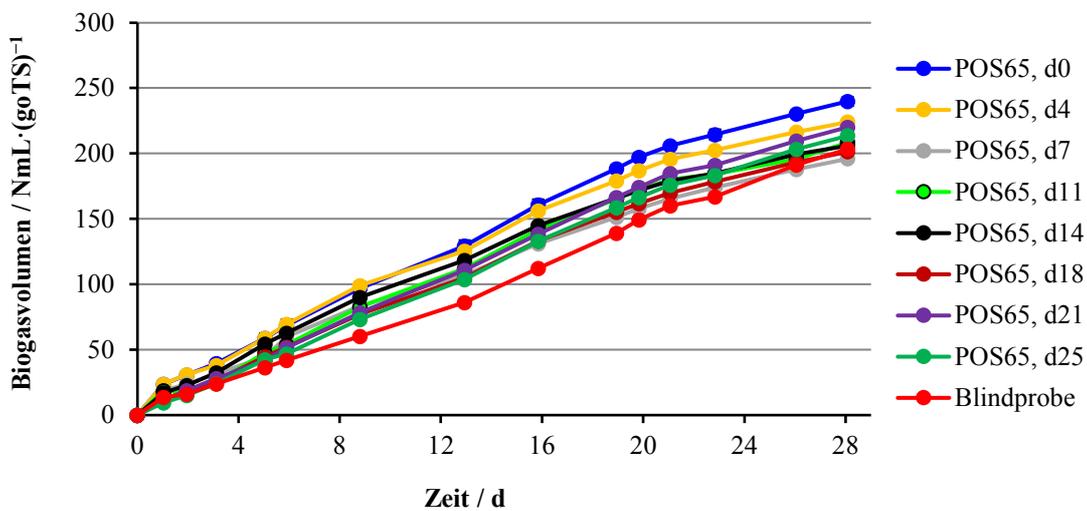


Abbildung 111: Biogasdaten der submersen Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* 65 (POS65) bei auf 6,0 voreingestelltem pH-Wert des Weizenstrohgärrestes gemäß des Kultivierungsschemas in Abbildung 58. Als Blindprobe wurde eine nicht beimpfte Weizenstrohgärrest-Suspension mit einem auf 6,0 voreingestellten pH-Wert verwendet. Die Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden der Übersicht halber nicht eingezeichnet. Die Zahl hinter „d“ bezeichnet den jeweiligen Erntetag.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Hamid A. M., Solbiati J. O., Cann I. K. O. (2013): Chapter 1 - Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications, *Advances in Applied Microbiology* (Volume 82), Academic Press, p. 1-28.
2. Adebayo E., Martínez-Carrera D. (2015): Oyster Mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass, *African Journal of Biotechnology*, 14(1), p. 52-67.
3. Aitken M. D., Heck P. E. (1998): Turnover capacity of *Coprinus cinereus* peroxidase for phenol and monosubstituted phenols, *Biotechnology progress*, 14(3), p. 487-492.
4. Ambrus G., Jekkel A., Ilkoy E., Horvath G., Bocskei Z. (1995): Novel 26-oxygenated products in microbial degradation of ergosterol, *Steroids*, 60(9), p. 626-629.
5. Anderson W. F., Akin D. E. (2008): Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), p. 355-366.
6. ARCHEA Service GmbH (2017), Gaserträge und Nährstoffgehalte - NaWaRo, [http://www.archea-biogas.de/\\_mediafiles/10-substrate.pdf](http://www.archea-biogas.de/_mediafiles/10-substrate.pdf).
7. Attard E. (2013): A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols, *Central European Journal of Biology*, 8(1), p. 48-53.
8. Baciocchi E., *et al.* (2001): Isotope-Effect Profiles in the Oxidative N-Demethylation of N,N-Dimethylanilines Catalysed by Lignin Peroxidase and a Chemical Model, *European Journal of Organic Chemistry*, 2001(12), p. 2305-2310.
9. Bartholomew K., Dos Santos G., Dumonceaux T., Charles T., Archibald F. (2001): Genetic transformation of *Trametes versicolor* to phleomycin resistance with the dominant selectable marker *shble*, *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), p. 201-204.
10. Ben Hamman O., de la Rubia T., Martínez J. (1999): The effect of manganese on the production of *Phanerochaete flavido-alba* ligninolytic peroxidases in nitrogen limited cultures, *FEMS Microbiology Letters*, 177(1), p. 137-142.

11. Berker K. I., Ozdemir Olgun F. A., Ozyurt D., Demirata B., Apak R. (2013): Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(20), p. 4783-4791.
12. Bertrand B., *et al.* (2013): Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts, *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(1), p. 135-142.
13. Bi R., Oinonen P., Wang Y., Henriksson G. (2016): A Method for Studying Effects on Lignin-Polysaccharide Networks during Biological Degradation and Technical Processes of Wood, *Bioresources*, 11(1), p. 1307-1318.
14. Blainski A., Lopes G. C., de Mello J. C. (2013): Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L., *Molecules* (Basel, Switzerland), 18(6), p. 6852-6865.
15. Boer C. G., Obici L., de Souza C. G. M., Peralta R. M. (2006): Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*, *Process Biochemistry*, 41(5), p. 1203-1207.
16. Boyle W. C. (1977): Energy Recovery from sanitary Landfills - A Review, *Microbial Energy Conversion*, Pergamon, p. 124-128.
17. Buswell A. M., Mueller H. F. (1952): Mechanism of Methane Fermentation, *Industrial & Engineering Chemistry*, 44(3), p. 550-552.
18. Campos A. M., López-Alacrón C., Lissi E. (2013): Evaluation of the total amount of phenol groups in complete mixtures by Folin's and Orac-Fluorescein Methodologies, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58, p. 2144-2147.
19. Chovanec P., *et al.* (2005): Study of *Trichoderma viride* metabolism under conditions of the restriction of oxidative processes, *Canadian journal of microbiology*, 51(10), p. 853-862.
20. Clifford C. B. (2017), *Alternative Fuels from Biomass Sources*, *Anaerobic Digestion*, <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/727>.
21. Collins P. J., Dobson A. D. W., Field J. A. (1998): Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese, *Applied and environmental microbiology*, 64(6), p. 2026-2031.

22. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. (2010): Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin, *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), p. 36-50.
23. Davis M. W., Lamar R. T. (1992): Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass, *Soil Biology and Biochemistry*, 24(3), p. 189-198.
24. Desai S. S., Nityanand C. (2011): Microbial Laccases and their Applications: A Review, *Asian Journal of Biotechnology*, 3, p. 98-124.
25. Díaz R., *et al.* (2013): Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and expression profiles of laccases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation, 16(4), p. 1-13.
26. Djajakirana G., Joergensen R. G., Meyer B. (1996): Ergosterol and microbial biomass relationship in soil, *Biology and Fertility of Soils*, 22(4), p. 299-304.
27. Dovbnya D. V., Egorova O. V., Donova M. V. (2010): Microbial side-chain degradation of ergosterol and its 3-substituted derivatives: a new route for obtaining of deltanoids, *Steroids*, 75(10), p. 653-658.
28. Dutt D., *et al.* (2013): Isolation and biochemical characterization of crude xylanase from *Coprinus cinereus* AT-1 MTCC 9695 and its effectiveness in biodeinking of SOP, *Cellulose Chemistry and Technology*, 47, p. 203-217.
29. El-Batal A. I., ElKenawy N. M., Yassin A. S., Amin M. A. (2015): Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles, *Biotechnology Reports*, 5(Supplement C), p. 31-39.
30. Elisashvili V., *et al.* (2008): *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition, *Bioresource Technology*, 99(3), p. 457-462.
31. Everette J. D., *et al.* (2010): Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), p. 8139-8144.
32. Fakoussa R. M., Hofrichter M. (1999): Biotechnology and microbiology of coal degradation, *Applied microbiology and biotechnology*, 52(1), p. 25-40.

33. Falade A. O., *et al.* (2017): Lignin peroxidase functionalities and prospective applications, *MicrobiologyOpen*, 6(1), p. 1-14.
34. Falkoski D. L., Monteze Guimarães V., Couto Alfenas A., Nicolau de Almeida M., Tavares de Rezende S. (2011): Production and characterization of enzymes for use in a biorefinery by Basidiomycetes and plant pathogenic fungi, 5th International Colloquium on Eucalyptus Pulp, [http://www.eucalyptus.com.br/artigos/outros/13\\_Basidiomycetes\\_enzymes.pdf](http://www.eucalyptus.com.br/artigos/outros/13_Basidiomycetes_enzymes.pdf), p. 1-10.
35. Ferry J. G. (2011): Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), p. 351-357.
36. FNR (2013): Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung, Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), 6. Auflage, Gülzow-Prüzen, p. 1-244.
37. Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B., Haltrich D. (2002): Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), p. 529-536.
38. Galli C., Gentili P. (2004): Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 17(11), p. 973-977.
39. Gawande P. V., Kamat M. Y. (1999): Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application, *Journal of applied microbiology*, 87(4), p. 511-519.
40. Ghaffar S. H., Fan M. (2013): Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw, *Biomass and Bioenergy*, 57, p. 264-279.
41. Ghoshal G., Banerjee U. C., Shivhare U. S. (2015): Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation, *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), p. 1013-1024.
42. Ginova A., Tsvetkov I., Kondakova V. (2012): *Rosa damascena* Mill. - An overview for evaluation of propagation methods, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18, p. 545-556.
43. Ginterová A., Lazarová A. (1987): Degradation dynamics of lignocellulose materials by wood-rotting *Pleurotus* fungi, *Folia Microbiologica*, 32, p. 434-437.

44. Gomes E., *et al.* (2009): Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes, *Brazilian journal of microbiology*, 40(1), p. 31-39.
45. Gomez X., Cuetos M. J., Garcia A. I., Moran A. (2007): An evaluation of stability by thermogravimetric analysis of digestate obtained from different biowastes, *Journal of hazardous materials*, 149(1), p. 97-105.
46. Goyal M., Kalra K. L., Sareen V. K., Soni G. (2008): Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*, *Brazilian journal of microbiology*, 39(3), p. 535-541.
47. Han M. J., Choi H. T., Song H. G. (2005): Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *Journal of microbiology*, 43(6), p. 555-560.
48. Hatakka A. (1994): Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation, *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2), p. 125-135.
49. Hatfield R., Fukushima R. S. (2005): Can Lignin be accurately measured?, *Crop Science*, 45(3), p. 832-839.
50. Hofrichter M. (2002): Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP), *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), p. 454-466.
51. Holick M. F., Chen T. C., Lu Z., Sauter E. (2007): Vitamin D and Skin Physiology: A D-Lightful Story, *Journal of bone and mineral research*, 22 Supplement 2, p. 28-33.
52. Huang X. F., *et al.* (2013): Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils, *Biotechnology and bioengineering*, 110(6), p. 1616-1626.
53. Kang S. W., Park Y. S., Lee J. S., Hong S. I., Kim S. W. (2004): Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 91(2), p. 153-156.
54. Karigar C. S., Rao S. S. (2011): Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review, *Enzyme research*, 2011, p. 1-11.

55. Kelly J. M., Drysdale M. R., Sealy-Lewis H. M., Gwyn Jones I., Lockington R. A. (1990): Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated, *Molecular and General Genetics MGG*, 222(2), p. 323-328.
56. Kenzom T., Srivastava P., Mishra S. (2014): Structural Insights into 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) (ABTS)-Mediated Degradation of Reactive Blue 21 by Engineered *Cyathus bulleri* Laccase and Characterization of Degradation Products, *Applied and environmental microbiology*, 80(24), p. 7484-7495.
57. Khairudin N. B., Mazlan N. S. (2013): Molecular docking study of Beta-glucosidase with cellobiose, cellotetraose and cellotriose, *Bioinformation*, 9(16), p. 813-817.
58. Khalil D., Mahmudul Hoque M., Ahmed Basunia M., Alam N., Khan M. A. (2011): Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35, p. 333-341.
59. Khan T., Mubeen U. (2012): Wheat Straw: A pragmatic overview, *Current Research Journal of Biological Sciences*, 4(6), p. 673-675.
60. Kjalke M., *et al.* (1992): Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120(3), p. 248-256.
61. Kobakhidze A., Asatiani M., Kachlishvili E., Elisashvili V. (2016): Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes, *Annals of Agrarian Science*, 14(3), p. 169-176.
62. Kong W., *et al.* (2016): Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds, *Process Biochemistry*, 51(11), p. 1776-1783.
63. Krings U., Berger R. G. (2014): Dynamics of sterols and fatty acids during UV-B treatment of oyster mushroom, *Food chemistry*, 149, p. 10-14.
64. Krstanovic V., Klapac T., Velic N., Milakovic Z. (2005): Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001-2003 in eastern Croatia, *Microbiological research*, 160(4), p. 353-359.

65. Kuhad R. C., Gupta R., Singh A. (2011): Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme research*, 2011, p. 1-10.
66. Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009): Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), p. 3713-3729.
67. Kumaran S., Sastry C. A., Vikineswary S. (1997): Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), p. 43-49.
68. Kunamneni A., Plou F. J., Ballesteros A., Alcalde M. (2008): Laccases and their applications: a patent review, *Recent patents on biotechnology*, 2(1), p. 10-24.
69. Kurakov A. V., Lavrent'ev R. B., Nechitailo T. Y., Golyshin P. N., Zvyagintsev D. G. (2008): Diversity of facultatively anaerobic microscopic mycelial fungi in soils, *Microbiology*, 77(1), p. 90-98.
70. Ladisch M. R., Hong J., Voloch M., Tsao G. T. (1981): Cellulase Kinetics, *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*, Springer US, Boston (Massachusetts), p. 55-57.
71. Lal M., Dutt D., Kumar A., Gautam A. (2015): Optimization of submerged fermentation conditions for 2 xylanase producers *Coprinellus disseminatus* MLK-01NTCC and MLK-07NTCC-1181 and their biochemical characterization, *Cellulose Chemistry and Technology*, 49(5-6), p. 471-483.
72. Lang E., Nerud F., Zadrazil F. (1998): Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), p. 239-244.
73. Lankinen P., Hilden K., Aro N., Salkinoja-Salonen M., Hatakka A. (2005): Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization, *Applied microbiology and biotechnology*, 66(4), p. 401-407.
74. Legerská B., Chmelová D., Ondrejovič M. (2016): Degradation of Synthetic Dyes by Laccases – A Mini-Review, *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(1), p. 90-106.
75. Leonowicz A., *et al.* (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin, *Journal of basic microbiology*, 41(3-4), p. 185-227.

- 
76. Levasseur A., *et al.* (2010): Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study, *BMC Biochemistry*, 11(1), p. 32.
  77. Levin L., Herrmann C., Papinutti V. L. (2008): Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), p. 207-214.
  78. Liers C., *et al.* (2014): Phenol oxidation by DyP-type peroxidases in comparison to fungal and plant peroxidases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 103, p. 41-46.
  79. Lisova Z. A., Lisov A. V., Leontievsky A. A. (2010): Two laccase isoforms of the basidiomycete *Cerrena unicolor* VKMF-3196. Induction, isolation and properties, *Journal of basic microbiology*, 50(1), p. 72-82.
  80. Lockington R., Borlace G., M Kelly J. (1997): Pyruvate decarboxylase and anaerobic survival in *Aspergillus nidulans*, *Gene*, 191(1), p. 61-67.
  81. López M. J., *et al.* (2013): Biodelignification of agricultural and forest wastes: Effect on anaerobic digestion, *Biomass and Bioenergy*, 58, p. 343-349.
  82. Manyi-Loh C., *et al.* (2015): Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, p. 4390–4417.
  83. Marques de Souza C. G., Peralta R. M. (2003): Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium, *Journal of basic microbiology*, 43(4), p. 278-286.
  84. Marques de Souza C. G., Tychanowicz G. K., de Souza D. F., Peralta R. M. (2004): Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds, *Journal of basic microbiology*, 44(2), p. 129-136.
  85. Martínez A. T. (2002): Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), p. 425-444.

86. Martinez M. J., Ruiz-Dueñas F. J., Guillen F., Martinez A. T. (1996): Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, European journal of biochemistry, 237(2), p. 424-432.
87. Membrillo I., Sánchez C., Meneses M., Favela E., Loera O. (2011): Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse, Bioresource Technology, 102(2), p. 1581-1586.
88. Michels J., Track T., Gehrke U., Sell D. (2001): Leitfaden biologische Verfahren zur Bodensanierung, Umweltbundesamt (Fachgebiet III 3.6) Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung, Berlin, p. 130-135.
89. Mille-Lindblom C., von Wachenfeldt E., Tranvik L. J. (2004): Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death, Journal of microbiological methods, 59(2), p. 253-262.
90. More S. S., et al. (2011): Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp., Enzyme research, 2011, p. 1-7.
91. Morozova O. V., Shumakovich G. P., Gorbacheva M. A., Shleev S. V., Yaropolov A. I. (2007): "Blue" laccases, Biochemistry (Moscow), 72(10), p. 1136-1150.
92. Motta F. L., Andrade C. C. P., Santana M. H. A. (2013): Chapter 10 - A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, InTech, Rijeka, p. 263-264.
93. Moutaouakkil A., Blaghen M. (2011): Decolorization of the anthraquinone dye Cibacron Blue 3G-A with immobilized *Coprinus cinereus* in fluidized bed bioreactor, Applied Biochemistry and Microbiology, 47(1), p. 59-65.
94. Munk L., Sitarz A. K., Kalyani D. C., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. (2015): Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?, Biotechnology Advances, 33(1), p. 13-24.
95. Muñoz C., Guillen F., Martinez A. T., Martinez M. J. (1997): Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*, Current microbiology, 34(1), p. 1-5.

96. Muraguchi H., *et al.* (2008): The *exp1* gene essential for pileus expansion and autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein, *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), p. 890-896.
97. Musatti A., Ficara E., Mapelli C., Sambusiti C., Rollini M. (2017): Use of solid digestate for lignocellulolytic enzymes production through submerged fungal fermentation, *Journal of environmental management*, 199, p. 1-6.
98. Newell S. Y., Arsuffi T. L., Fallon R. D. (1988): Fundamental Procedures for Determining Ergosterol Content of Decaying Plant Material by Liquid Chromatography, *Applied and environmental microbiology*, 54(7), p. 1876-1879.
99. Ng H. E., Raj S. S., Wong S. H., Tey D., Tan H. M. (2008): Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: a rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds, *Letters in applied microbiology*, 46(1), p. 113-118.
100. Nicholson D. J., Leavitt A. T., Francis R. C. (2014): A three-stage klason method for more accurate determinations of hardwood lignin content, *Cellulose Chemistry and Technology*, 48(1-2), p. 53-59.
101. Nongthombam G. D., Labala R. K., Das S., Handique P. J., Talukdar N. C. (2017): Evaluation and Selection of Potential Biomass Sources of North-East India towards Sustainable Bioethanol Production, *Frontiers in Energy Research*, 5(16), p. 1-13.
102. Ollikka P., *et al.* (1993): Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and environmental microbiology*, 59(12), p. 4010-4016.
103. Pal A., Khanum F. (2010): Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation, *Bioresource technology*, 101(19), p. 7563-7569.
104. Parsi Z., Gorecki T. (2006): Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis, *Journal of chromatography. A*, 1130(1), p. 145-150.
105. Paul K., Nonoh J. O., Mikulski L., Brune A. (2012): "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens, *Applied and environmental microbiology*, 78(23), p. 8245-8253.

106. Peralta R. M., *et al.* (2017): Chapter 5 - Enzymes from Basidiomycetes - Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology, *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Academic Press, p. 134-135.
107. Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. (2002): Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *International Microbiology*, 5(2), p. 53-63.
108. Perie F. H., Sheng D., Gold M. H. (1996): Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*, *Biochimica et biophysica acta*, 1297(2), p. 139-148.
109. Perkowski J., *et al.* (2008): Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals, *Biologia*, 63(4), p. 542-547.
110. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. (2002): Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, *The Journal of biological chemistry*, 277(40), p. 37663-37669.
111. Piscitelli A., *et al.* (2011): Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi, *Current Genomics*, 12(2), p. 104-112.
112. Pognani M., D'Imporzano G., Scaglia B., Adani F. (2009): Substituting energy crops with organic fraction of municipal solid waste for biogas production at farm level: A full-scale plant study, *Process Biochemistry*, 44(8), p. 817-821.
113. Prieur B., *et al.* (2017): Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition, *RSC Advances*, 7(27), p. 16866-16877.
114. Raimbault M. (1998): General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), p. 26-27.
115. Raymond P., Mshandete A. M., Kajumulo Kivaisi A. (2015): Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes by *Coprinus cinereus* (Schaeff.) Gray from Sisal Wastes Supplemented with Cow Dung Manure, *Biotechnology Research International*, 2015, p. 1-9.
116. Rigas F., Dritsa V. (2006): Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), p. 120-124.

117. Rodriguez-Couto S. (2017): Industrial and environmental applications of white-rot fungi, *Mycosphere Journal of Fungal Biology*, 8(3), p. 456-466.
118. Ruiz-Dueñas F. J., Martinez A. T. (2009): Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this, *Microbial biotechnology*, 2(2), p. 164-177.
119. Ruiz-Dueñas F. J., Martinez M. J., Martinez A. T. (1999): Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Molecular microbiology*, 31(1), p. 223-235.
120. Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T. (2000): The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 32(7), p. 989-1005.
121. Sanchez-Rangel J. C., Benavides J., Heredia J. B., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velazquez D. A. (2013): The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination, *Analytical Methods*, 5(21), p. 5990-5999.
122. Santi G., *et al.* (2015): Mycelial growth and enzymatic activities of white-rot fungi on anaerobic digestates from industrial biogas plants, *Environmental engineering and management*, 14(7), p. 1713-1719.
123. Sauberer N., Berg H. M., Grabherr G., Moser D. (2008): Biodiversität in Österreich: räumliche Muster und Indikatoren der Arten- und Lebensraumvielfalt, Haupt Verlag, 1. Auflage, p. 150-151.
124. Savary S., Ficke A., Aubertot J.-N., Hollier C. (2012): Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security, *Food Security*, 4(4), p. 519-537.
125. Schmidt G., Krings U., Nimtz M., Berger R. G. (2012): A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), p. 1623-1632.
126. Schneider P., *et al.* (1999): Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(6), p. 502-508.
127. Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. (2001): Analysis of condensed tannins: a review, *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), p. 21-40.

128. Seitz L. M., Mohr H. E., Borroughs R., Sauer D. B. (1977): Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains, *Cereal Chemistry*, 54, p. 1207-1217.
129. Seitz L. M., Sauer D. B., Borroughs R., Mohr H. E., Hubbard J. D. (1979): Ergosterol as a measure of fungal growth, *Phytopathology*, 69, p. 1202-1203.
130. Sharrock K. R. (1988): Cellulase assay methods: a review, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 17(2), p. 81-105.
131. Shin K. S., Kim Y. H., Lim J. S. (2005): Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, *Journal of microbiology*, 43(6), p. 503-509.
132. Singh D., Chen S. (2008): The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes, *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), p. 399-417.
133. Singh M. P., Pandey V. K., Srivastava A. K., Viswakarma S. K. (2011): Biodegradation of brassica haulms by white rot fungus *Pleurotus eryngii*, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 57(1), p. 47-55.
134. Singh S., Harms H., Schlosser D. (2014): Screening of ecologically diverse fungi for their potential to pretreat lignocellulosic bioenergy feedstock, *Applied microbiology and biotechnology*, 98(7), p. 3355-3370.
135. Solomon E. I., Augustine A. J., Yoon J. (2008): O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases, *Dalton Transactions*, 30(30), p. 3921-3932.
136. Sprecher E. (1959): Über die Guttation bei Pilzen, *Planta*, 53(6), p. 565-574.
137. Srebotnik E., Jensen K. A., Kawai S., Hammel K. E. (1997): Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades Nonphenolic Lignin Structures by a One-Electron-Oxidation Mechanism, *Applied and environmental microbiology*, 63(11), p. 4435-4440.
138. Statista – Das Statistik-Portal (2018): Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 1992 bis 2017, <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/167671/umfrage/anzahl-der-biogasanlagen-in-deutschland-seit-1992/>, abgerufen am 06.03.2018.

- 
139. Statista – Das Statistik-Portal (2018): Substratanteile in Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 2010 bis 2015, <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/198554/umfrage/anteil-des-substrateinsatzes-in-biogasanlagen/>, abgerufen am 06.03.2018.
  140. Steudler S., Bley T. (2015): Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches, *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(7), p. 1313-1323.
  141. Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V. (2010): Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1(3), p. 208-215.
  142. Stottmeister U. (2003): *Biotechnologie zur Umweltentlastung*, B. G. Teubner Verlag, 1. Auflage, Wiesbaden, p. 262-264.
  143. Sutter U. (1996): *Mikrobiologische Verfahren bei der Altlastensanierung*, Landesanstalt für Umweltschutz, Baden-Württemberg, Karlsruhe, p. 3.
  144. Tamayo Ramos J. A., Barends S., Verhaert R. M., de Graaff L. H. (2011): The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes, *Microbial Cell Factories*, 10:78, p. 1-11.
  145. ten Have R., Hartmans S., Field J. A. (1997): Interference of peptone and tyrosine with the lignin peroxidase assay, *Applied and environmental microbiology*, 63(8), p. 3301-3303.
  146. ten Have R., Hartmans S., Teunissen P. J. M., Field J. A. (1998): Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *FEBS Letters*, 422(3), p. 391-394.
  147. Tenkanen M., Puls J., Poutanen K. (1992): Two major xylanases of *Trichoderma reesei*, *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), p. 566-574.
  148. Thurston C. F. (1994): The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 140(1), p. 19-26.
  149. Tien M., Kirk T. K. (1988): Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods in Enzymology*, 161, p. 238-249.

150. Tien M., Kirk T. K., Bull C., Fee J. A. (1986): Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds, The Journal of biological chemistry, 261(4), p. 1687-1693.
151. Tripathi A., Upadhyay R. C., Singh S. (2012): Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*, Indian Journal of Microbiology, 52(3), p. 381-387.
152. Trude E. (1990): Bodensanierung mit Weißfäulepilzen, Altlastensanierung '90, Springer US, Boston (Massachusetts), p. 1097-1098.
153. Tuor U., Wariishi H., Schoemaker H. E., Gold M. H. (1992): Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model compound, Biochemistry, 31(21), p. 4986-4995.
154. Ulbricht H. (2002): Untersuchungen zur gesteuerten Rotte von mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) kontaminiertem Altholz (Dissertation), Technische Universität Dresden, p. 31-32.
155. Urban W., Girod K., Lohmann H., Dachs G., Zach C. (2008): Technologien und Kosten der Biogasaufbereitung und Einspeisung in das Erdgasnetz: Ergebnisse der Markterhebung 2007-2008, Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheitsund Energietechnik (Fraunhofer UMSICHT), Version 4.15, Oberhausen, p. 35-38.
156. Ürek R. Ö., Pazarlioğlu N. K. (2004): Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, Process Biochemistry, 39(12), p. 2061-2068.
157. Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. (2010): Lignin Biosynthesis and Structure, Plant Physiology, 153(3), p. 895-905.
158. VDI 4630 (2006): Vergärung organischer Stoffe, Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
159. Wang J., et al. (2015): Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement, Biotechnology for biofuels, 8:145, p. 1-11.

- 
160. Weißbach F. (2009): Neue Methode zur Bewertung von Substraten für die Biogasgewinnung: Wie viel Biogas liefern nachwachsende Rohstoffe?, *Neue Landwirtschaft*, 11/2009, p. 107–112.
161. Widsten P., Kandelbauer A. (2008): Laccase applications in the forest products industry: A review, *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), p. 293-307.
162. Wittig M., Krings U., Berger R. G. (2013): Single-run analysis of vitamin D photoproducts in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) after UV-B treatment, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), p. 266-274.
163. Wong K., Saddler J. (1992): *Trichoderma* Xylanases, Their Properties and Application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(5-6), p. 413-435.
164. Wongnate T., *et al.* (2016): The radical mechanism of biological methane synthesis by methyl-coenzyme M reductase, *Science*, 352(6288), p. 953-958.
165. Wörmeyer K., Ingram T., Saake B., Brunner G., Smirnova I. (2011): Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: Influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin, *Bioresource Technology*, 102(5), p. 4157-4164.
166. Wu D., *et al.* (2017): Remarkable lignin degradation in paper wastewaters over Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/[gamma]-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts using the catalytic wet peroxide oxidation method, *RSC Advances*, 7(60), p. 37487-37494.
167. Xiao Z., Storms R., Tsang A. (2004): Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity, *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), p. 832-837.
168. Yang J., Yuan H., Wang H., Chen W. (2005): Purification and characterization of lignin peroxidases from *Penicillium decumbens* P6, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), p. 435-440.
169. Zakzeski J., Bruijninx P. C., Jongerius A. L., Weckhuysen B. M. (2010): The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals, *Chemical reviews*, 110(6), p. 3552-3599.
170. Zakzeski J., Jongerius A. L., Bruijninx P. C., Weckhuysen B. M. (2012): Catalytic lignin valorization process for the production of aromatic chemicals and hydrogen, *ChemSusChem*, 5(8), p. 1602-1609.

171. Zolan M. E., Pukkila P. J. (2009): Meiosis: Volume 2, Cytological Methods, Chapter 8: Meiotic Cytogenetics in *Coprinus cinereus*, Humana Press, New York, p. 115-127.
172. Zucca P., *et al.* (2011): Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), p. 216-222.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname                      Golubzow, Waldemar

### Schulausbildung

Sept. 2001 – Juni 2008              Abitur, Gymnasium Lutherschule (Hannover)

### Studium

Okt. 2008 – Okt. 2012              Studium, Chemie B. Sc., Leibniz Universität Hannover (LUH)

Bachelorarbeit am Institut für Analytische Chemie der LUH  
Thema: „Spezies-Analytik von Berylliumkomplexen mittels Chromatografie und ICP-Spektroskopie“

Okt. 2012 – Nov. 2014              Master Analytik M. Sc., Leibniz Universität Hannover (LUH)

Masterarbeit am Institut für Organische Chemie der LUH  
Thema: „Untersuchung des Metabolitenprofils der Doppelblockmutante *Actinosynnema pretiosum*  $\Delta$ 12/21pHGF9029 in Mutasynthese“

### Studienbegleitende Tätigkeiten

Apr. 2013 – Juli 2013              Studentische Hilfskraft zur Leitung der Übungsgruppe „Physikalische Chemie 1“

Apr. 2014 – Juli 2014              Studentische Hilfskraft zur Leitung der Übungsgruppe „Physikalische Chemie 1“

### Weiterer Werdegang

Jan. 2015 – Juni 2015              Wissenschaftliche Hilfskraft  
am Institut für Lebensmittelchemie der LUH

Juli 2015 – Dez. 2017              Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
am Institut für Lebensmittelchemie der LUH