

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Einsatz von neu isolierten Mikroorganismen
bei der Optimierung der Bioethanol-
und Biogas-Produktion**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Jana Kreubel
Geboren in Aachen

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2017

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2013 bis November 2016 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht oder sind zur Publikation eingereicht:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Globale Energielage und Erneuerbare Energien (EE)	1
1.2 Bioethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse	4
1.3 Power-to-Gas	9
1.4 Biogasanlagen	11
1.5 Methanogene Archaea	19
1.6 Termiten	21
1.7 Ziele der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Chemikalien und Gase	31
2.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits	33
2.3 Geräte und Hilfsmittel	34
2.4 Verbrauchsmaterialien	35
2.5 Untersuchte Biogasanlage (BGA)	36
2.6 Präparation von Termitendärmen zur Isolierung methanogener Archaea	37
2.7 Proteinbiochemische Methoden	37
2.7.1 Azo-Carboxymethyl-Cellulose-Test (Azo-CMC-Test)	37
2.7.2 Bestimmung des Proteingehaltes	38
2.7.3 Ammoniumsulfatfällung	39
2.7.4 Dialyse	39
2.7.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	39
2.7.6 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	40
2.7.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.7.8 Fixierung und Färbung der SDS-Gele	42
2.7.9 Identifizierung des neu isolierten Enzyms	42
2.7.10 3D-Homologiemodellierung des neu isolierten Enzyms	42
2.8 Mikrobiologische Methoden	42
2.8.1 Organismen	43
2.8.2 Nährmedien zur Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen	45
2.8.3 Anreicherung und Isolierung von methanogenen Archaea	49

2.9 Analyse von Gasen und Überprüfung der Methanproduktion	52
2.10 Molekularbiologische Methoden.....	53
2.10.1 DNA-Isolierung aus Kulturen und Termitendärmen.....	53
2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese	54
2.10.3 PCR-Methoden	54
2.10.4 ARDRA methanogener Archaea	57
2.10.5 Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA-Sequenz	58
2.10.6 Diversitätsanalyse methanogener Archaea in <i>Mastotermes darwiniensis</i>	59
3. Ergebnisse	62
3.1 Mikroorganismen aus Termiten als neuartige Enzymquelle zur Bioethanol- Herstellung der zweiten Generation	62
3.1.1 Auswahl eines geeigneten Cellulase-Produzenten	62
3.1.2 Aufreinigung und Identifizierung der Cellulase Cel1	64
3.1.3 Charakterisierung der Cellulase Cel1 aus der Hefe <i>Saitozyma flava</i> OO2.....	67
3.2 Einsatz eines methanogenen Neuisolates in einer Power-to-Gas Anlage	69
3.2.1 Biodiversität methanogener Archaea in <i>Mastotermes darwiniensis</i>	70
3.2.2 Charakterisierung der Isolate aus Termiten und einer thermophilen BGA	71
3.2.3 SAPD-PCR der Gattung <i>Methanothermobacter</i> und des Isolates SIV6	77
3.2.4 Methanproduktion methanogener Typstämme und des Isolates SIV6	78
4. Diskussion	83
4.1 Bioethanol-Herstellung aus Stroh durch den kombinierten Einsatz von Thermodruckhydrolyse (TDH) und neuartigen Enzymquellen.....	83
4.1.1 Hefeisolat <i>Saitozyma flava</i> OO2 aus niederen Termiten als Cellulase- Produzent.....	83
4.1.2 Eigenschaften der isolierten Cellulase Cel1	85
4.2 Reduzierung von Biogas-CO ₂ zu CH ₄ unter Nutzung von elektrolytischem Wasserstoff regenerativer Energiequellen durch methanogene Archaea	91
4.2.1 Diversitätsanalyse methanogener Archaea in <i>Mastotermes darwiniensis</i>	92
4.2.2 Archaeelle Isolate aus niederen Termiten und der thermophilen BGA.....	94
4.2.3 Charakterisierung der Gattung <i>Methanothermobacter</i> und Einordnung des Isolates SIV6 mittels SAPD-PCR	98
4.2.4 Einsatz methanogener Archaea in einem Hochleistungs-Methanreaktor.....	100

4.3 Ausblick	103
5. Zusammenfassung	106
6. Literaturhinweise	109
7. Anhang	131
8. Eidesstattliche Erklärung	137
9. Danksagung	138
10. Lebenslauf	140

Abkürzungsverzeichnis

A	Arbeiter
AAI	Average Amino Acid Identity
ANI	Nucleotide Identity
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	Restriktionsanalyse amplifizierter rRNA-Genfragmente (engl. amplified rDNA restriction analysis)
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung
BGA	Biogasanlage(n)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CBP	Consolidated Bioprocessing
°C	Grad Celsius
CMC	Carboxymethylcellulose
ca.	Circa
CBH	Cellobiohydrolase
CeBiTec	Center for Biotechnology
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOPE	Discrete Optimized Protein Energy
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EE	Erneuerbare Energien
EEG	Erneuerbare Energien-Gesetz
EG	β-1,4-Endoglucanasen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
F	Phenylalanin
FM	Frischmasse
GHF	Glykosidhydrolase-Familie
E	Glutaminsäure
eH ₂ O	Entionisiertes Wasser
h	Stunde
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
K1 bzw. K2	Kultur 1 bzw. Kultur 2
kDa	Kilodalton
M	Molar

<i>M'</i>	<i>Methano</i>
min	Minute
N	Asparagin
NI	Normliter
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDB	Proteindatenbank
PFI	Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens
PV	Photovoltaik
RBB	Remazolbrilliant Blau R
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
S	Soldaten
SAPD	Specifically Amplified Polymorphic DNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Abkürzung für engl. S odium D odecyl S ulfate P olyacrylamide G el E lectrophoresis)
sp.	Spezies
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TDH	Thermodruckhydrolyse
Tm	Schmelztemperatur
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
vgl.	Vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Einheit der Erdbeschleunigung

1. Einleitung

In Zukunft sollen regenerative Energien die Menschheit von fossilen Energieträgern unabhängig machen. Zu den erneuerbaren Energiequellen zählen neben der Nutzung von Wind-, Wasser- und Solarenergie auch die Geothermie sowie die Nutzung von nachwachsender Biomasse. In dieser Arbeit wird der Fokus auf nachwachsende Rohstoffe gesetzt. Zunächst wird allgemein in die Thematik der Erneuerbaren Energien eingeführt. Im Anschluss untergliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei Teile. Der Schwerpunkt wird zum einen auf die Bioethanol-Herstellung aus erneuerbaren Rohstoffen gelegt und zum anderen auf das Power-to-Gas Verfahren, welches Biogasanlagen nachgeschaltet werden kann. Biogasanlagen werden ebenfalls mit nachwachsender Biomasse betrieben. Durch das nachgeschaltete Verfahren kann der Methanertrag gesteigert werden.

Neben der nachwachsenden Biomasse und der Erneuerbaren Energien liefern Termiten einen weiteren Überschneidungspunkt beider Schwerpunkte. Für das Power-to-Gas Verfahren sind methanogene Archaea, die unter anderem den Termitendarm besiedeln, von großer Bedeutung. Des Weiteren stellen Termiten und die den Darm besiedelnden Mikroorganismen eine Quelle für neuartige Enzyme zur Bioethanol-Herstellung dar.

1.1 Globale Energielage und Erneuerbare Energien (EE)

Momentan leben 7 Milliarden Menschen auf der Erde. Bei einem anhaltenden Wachstum von derzeit 1,2 % pro Jahr würde die Menschheit alle 12 Jahre um eine weitere Milliarde anwachsen (B-IBE, 2016), sodass im Jahr 2050 über 9 Milliarden Menschen auf der Erde leben würden. Dadurch steigt nicht nur die Nachfrage nach Lebensmitteln, sondern es kommt auch zum Anstieg des globalen Energieverbrauchs. Dabei steigt der Energieverbrauch rascher als die Weltbevölkerung. Während die Weltbevölkerung von 1870 bis 2011 auf das Vierfache gestiegen ist, wuchs der weltweite Verbrauch an fossilen Rohstoffen um das Sechzigfache und somit der pro Kopf-Verbrauch an Energie durchschnittlich um das 16fache (BMU, 2011). Der Energieverbrauch Deutschlands und der Welt wird primär durch fossile Energieträger gedeckt (BGR, 2015). Fossile Rohstoffe sind Produkte der vor Millionen Jahren durch Pflanzen einsetzenden Photosynthese, bei der Kohlenstoffdioxid (CO_2) zu energiereichen Verbindungen reduziert und fixiert wurde (Reineke & Schlömann, 2015).

1. EINLEITUNG

Im Jahr 2015 bezog Deutschland seinen Primärenergiebedarf aus Mineralöl (33,9 %), Kohle (24,6 %), Erdgas (21,0 %), Kernenergie (7,5 %), Erneuerbaren Energien (12,6 %) und zu 0,5 % aus anderen Quellen (BMWi, 2016 a). Berechnungen zufolge beträgt die statische Reichweite der Erdölreserven etwa 40 Jahre und die von Erdgas 60 Jahre (Abbildung 1.1). Die statische Reichweite beschreibt die Zeitdauer, in der die Reserven unter Annahme der gegenwärtigen Verbrauchslage vollständig erschöpft sein werden (BMU, 2011).

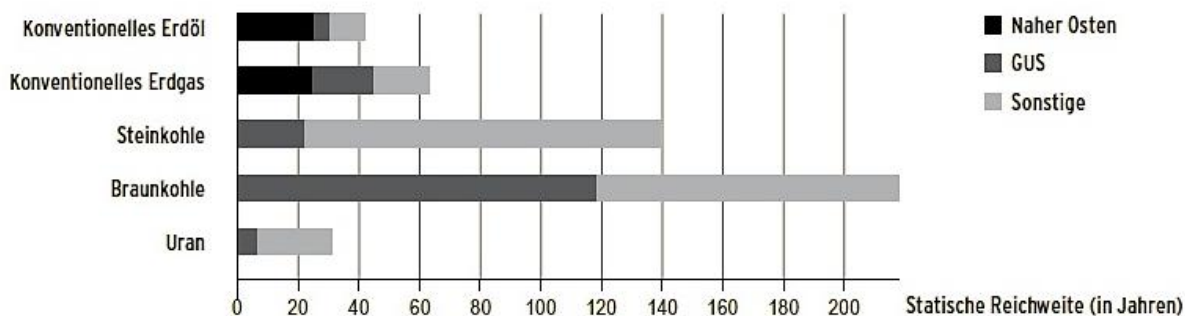


Abbildung 1.1: Statische Reichweite weltweiter Energiereserven. Nach BMU 2011.

Bei Reserven handelt es sich um sicher nachgewiesene Mengen, die nach derzeitigem technischem Stand wirtschaftlich zu erschließen sind. Ressourcen hingegen werden als solche Energiemengen definiert, die geologisch nachgewiesen wurden, jedoch nicht wirtschaftlich förderbar sind. Des Weiteren umfassen Ressourcen solche Mengen, die nicht nachgewiesen wurden, aber aus geologischer Sicht erwartet werden. Aufgrund des Endlichkeitscharakters der fossilen und nuklearen Energieträger ist es ein langfristiges Ziel, diese zu substituieren und regenerative Alternativen zu finden. Abgesehen von der Endlichkeit fossiler Rohstoffe, spielen politische, ökologische und ökonomische Gründe sowie soziale Aspekte bei der Suche nach alternativen Energien eine Rolle. Erneuerbare Energien (EE) sind somit für die globale Energieversorgung von großer Bedeutung. Derzeit wird der größte Anteil der Bruttostromerzeugung durch fossile Energieträger gedeckt (Abbildung 1.2 A). Der Anteil der Bruttostromerzeugung (Abbildung 1.2 B) an EE betrug in Deutschland 2016 bereits 29,5 % (BMWi, 2016 b), wobei der größte Teil durch Windenergie, Photovoltaik (PV) und Biomasse geleistet wurde. Dieser soll im Rahmen des EE-Gesetzes (EEG) kontinuierlich gesteigert werden, sodass im Jahr 2050 der Stromverbrauch in Deutschland zu 80 % abgedeckt wird.

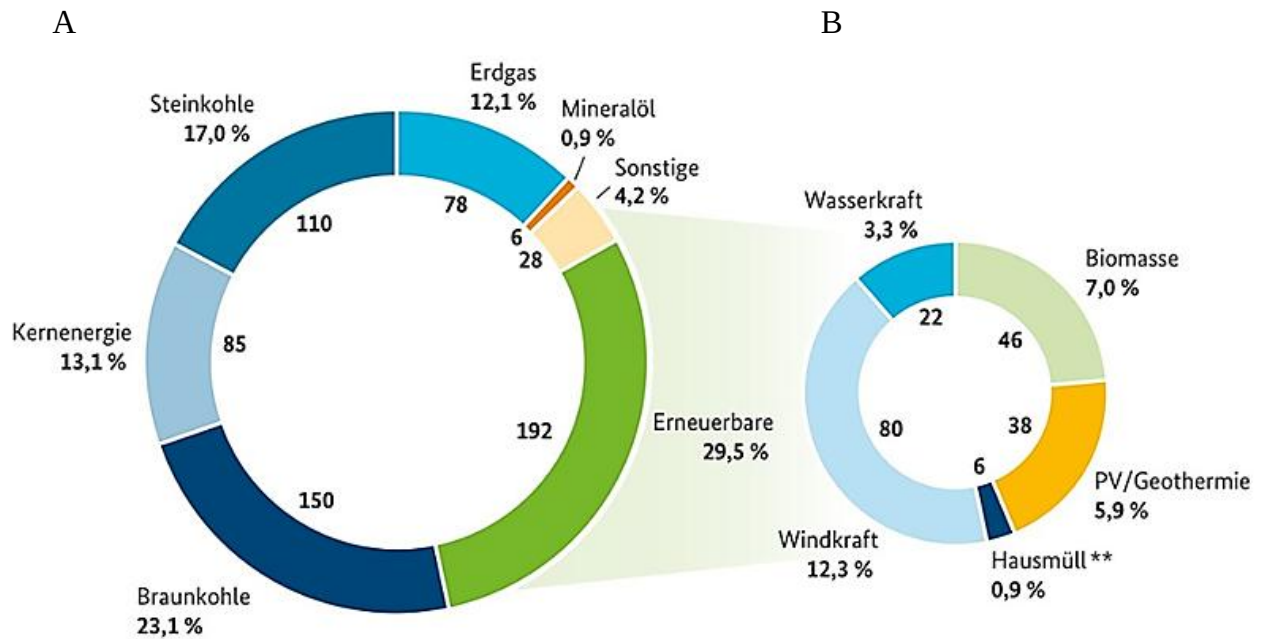


Abbildung 1.2: Bruttostromerzeugung in Deutschland 2016 in TWh (Stand Dezember 2016). A: Bruttostromerzeugung gesamt, B: Erneuerbare Energien aufgeschlüsselt in Wasser- und Windkraft, Hausmüll, Photovoltaik (PV)/Geothermie und Biomasse.

Vorläufige Zahlen, z. T. geschätzt. ** regenerativer Anteil. Nach BMWi, 2016 b.

Die Nutzung von Biomasse zur Substitution fossiler Energieträger hat in Deutschland in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Aktuell sind 8861 Biogasanlagen (BGA) in Deutschland in Betrieb (FvB, 2016), in welchen nachwachsendes Biomaterial durch eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft stufenweise zu Biogas umgesetzt wird. Deutschland ist somit das größte Biogas produzierende Land der Welt geworden (Weiland, 2010). Biogas kann fossile Energieträger bei der Strom- und Wärmeproduktion ersetzen sowie als gasförmiger Kraftstoff in der Automobilindustrie eingesetzt werden.

Die Produktion von Bioethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse stellt eine weitere Möglichkeit dar, fossile Energieträger zu ersetzen. Im Jahr 2014 stellen die EE 5,6 % des Kraftstoffverbrauchs in Deutschland (BMWi, 2016 c). Neben Bioethanol zählen auch Biodiesel sowie Biogas zu den Biokraftstoffen für Autos, Lastwagen, Züge, Schiffe und Flugzeuge. Neben der Elektromobilität, welche die Stromerzeugung aus erneuerbaren Energiequellen mit dem Verkehrssektor verbindet, leisten die Biokraftstoffe im Verkehrssektor ebenfalls einen Beitrag zum Klimaschutz und zur Energieversorgung (BMWi, 2016 c).

Bei der Nutzung von lignocellulosehaltigem Biomaterial handelt sich um eine Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation. Im Unterschied zur Produktion von

Bioethanol der ersten Generation, bei der Zuckerrohr, Mais oder Getreide verwendet werden, besteht keine Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelherstellung.

1.2 Bioethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse

Derzeit wird Bioethanol hauptsächlich aus Zucker und Stärke gewonnen. In Brasilien erfolgt die Herstellung aus Zuckerrohr, während in den USA hauptsächlich Mais, aber auch Getreide verwendet wird. Zusammen sind beide Länder für 89 % der derzeitigen globalen Bioethanol-Produktion verantwortlich (Lamayema & Rieke, 2012). In Europa ist Zuckerrübensirup das am meisten verwendete Ausgangsmaterial (Cardona & Sanchez, 2007). Um die Konkurrenz zur Lebens- und Futtermittelherstellung zu vermeiden, wird der Fokus verstärkt auf lignocellulosehaltige Biomasse (Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation), aber auch auf Biomaterial aus Algen gesetzt (Bioethanol-Herstellung der dritten Generation). Derzeit sind die vielversprechendsten und am meisten vorkommenden cellulosehaltigen Rohstoffe in den Vereinigten Staaten, Südamerika, Asien und Europa in Form von Maisstroh, Zuckerrohr-Bagasse sowie Reis- und Weizenstroh (Lamayema & Rieke, 2012) vorzufinden.

In der vorliegenden Arbeit diente Weizenstroh als Ausgangsmaterial für die Bioethanol-Produktion.

Die pflanzliche Trockensubstanz besteht zu etwa 80 % aus Lignocellulose (Reineke & Schlömann, 2015). Lignocellulose ist der am häufigsten vorkommende nachwachsende Rohstoff auf der Erde und besteht zu 40-50 % aus Cellulose und zu je 20-30 % aus Hemicellulose und Lignin. Ihre Anteile sind je nach Pflanzenart und Alter verschieden (Reineke & Schlömann, 2015). Gräser und Stroh sind beispielsweise reicher an Cellulose und Hemicellulose als verholzte Pflanzen.

Aufbau und enzymatischer Abbau von Lignocellulose

Cellulose ist ein lineares Polymer aus β -1,4 verknüpften Glucoseeinheiten (Abbildung 1.3). Über Wasserstoffbrückenbindungen oder über van-der-Waals Kräfte bilden die Cellulose-Ketten Mikrofibrillen aus, die teilweise kristallin vorliegen. Aufgrund dieser mikrokristallinen Bereiche ist Cellulose enzymatisch schwer zugänglich.

Hemicellulose ist ein Heteropolysaccharid aus Hexosen (Glucose, Mannose und Galaktose), Pentosen (Xylose und Arabinose) und Glucuronsäure. Hemicellulosen bilden einen Teil der Stütz- und Gerüstsubstanz von Zellwänden und machen 1/4 bis 1/3 der Pflanzenmasse aus. Neben Mannan und Xyloglucan ist Xylan eine weit verbreitete Hemicellulose, die in Gräsern und Holz vorkommt und damit in der Natur das zweithäufigste Polysaccharid darstellt. Hemicellulose ist aufgrund der amorphen Struktur leichter enzymatisch zugänglich als Cellulose. Wegen komplexer Verzweigungen und Acetylierungsmuster von oligomeren Strukturen kann Hemicellulose jedoch zur schweren enzymatischen Zugänglichkeit beitragen (Horn *et al.*, 2012). In der Industrie werden häufig Xylanasen zur enzymatischen Behandlung beim Abbau von Lignocellulose eingesetzt. Die Hydrolyse von Hemicellulose wurde durch einen anderen Projektpartner bearbeitet, sodass in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

Lignin ist ein komplexes aromatisches Heteropolymer (Abbildung 1.3). Obwohl der Abbau aromatischer Komponenten von Lignin durch Mikroorganismen stattfindet (Fuchs *et al.*, 2011), gibt es gegenwärtig kein gängiges industrielles Verfahren zum Ligninabbau.

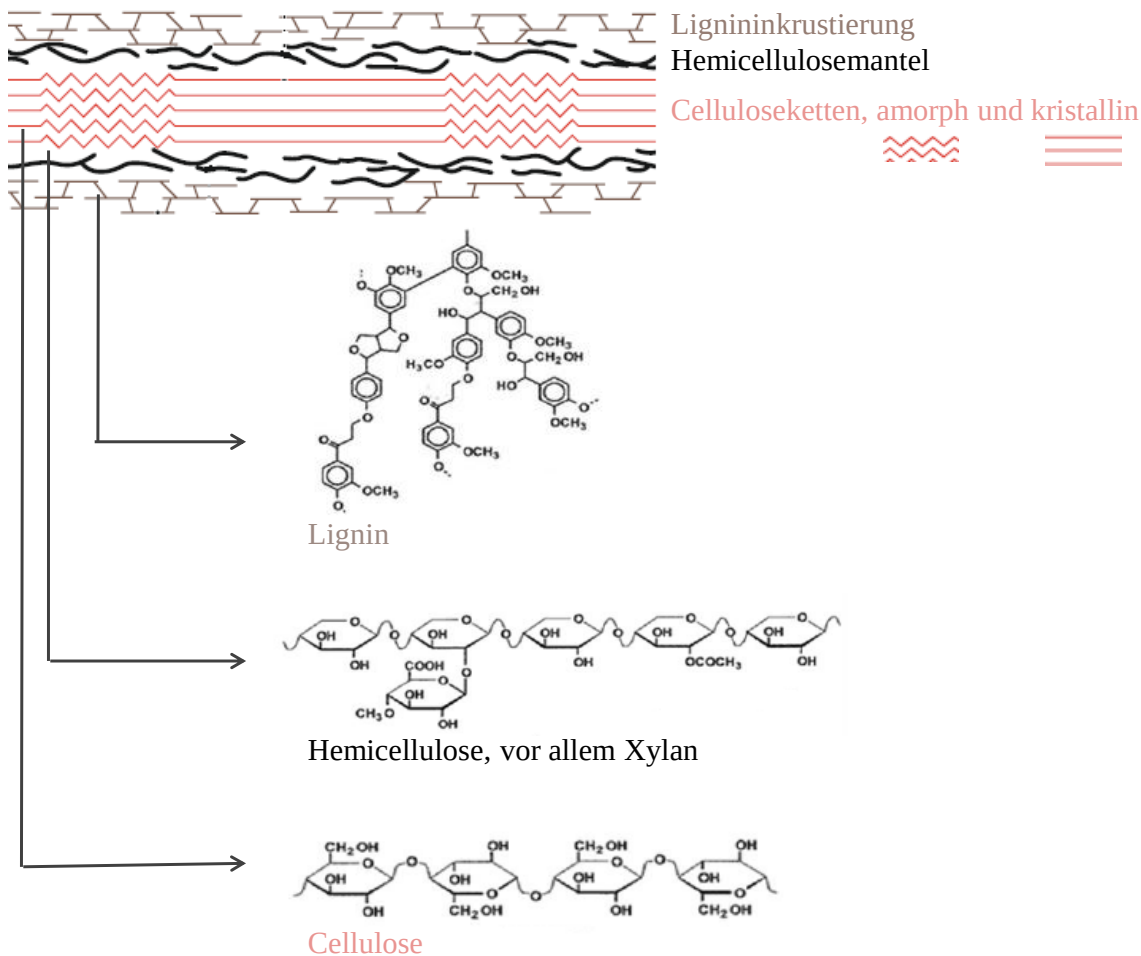


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Lignocellulosestruktur. Bereiche amorpher und kristalliner Cellulosefibrillen sind ummantelt von Hemicellulose und Lignin. Verändert nach Fuchs (2014) und Reineke & Schlömann (2015).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf Enzyme gelegt, die Cellulose abbauen. Aufgrund dessen soll im Folgenden auf die drei Typen von Cellulasen (Abbildung 1.4) eingegangen werden, die synergistisch eine Hydrolyse von Cellulose bewirken.

β -1,4-Endoglucanasen (Endocellulasen, Endoglucanasen) (EG) sind für die hydrolytische Spaltung amorpher Bereiche innerhalb der Cellulose-Ketten zuständig und generieren somit freie Kettenenden.

Die β -1,4-Exoglucanasen [Exocellulasen, Exoglucanasen, Cellobiohydrolasen (CBH)] agieren am reduzierenden oder nicht-reduzierenden Kettenende. Cellobiohydrolasen setzen Cellobiose frei und durch Glucohydrolasen wird Glucose freigesetzt. Cellobiohydrolasen sind die am meisten verbreitete Komponente in natürlichen und

kommerziellen Cellulase-Mixturen und ein Thema intensiver Studien (Horn *et al.*, 2012).

Als letzter Typ sind β -Glucosidasen zu erwähnen, die Cellobiose, welche hauptsächlich durch die beiden anderen Typen von Cellulasen entsteht, vom nicht-reduzierenden Kettenende zu Glucose hydrolysieren.

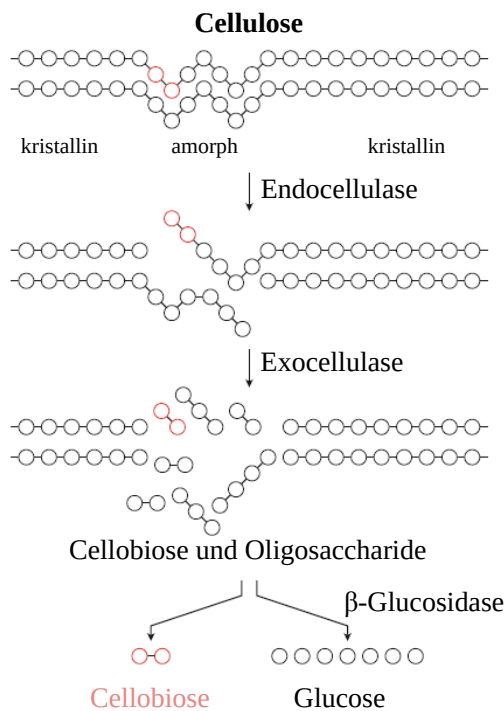


Abbildung 1.4: Abbau einer Cellulosefibrille. Endocellulasen greifen zunächst amorphe Bereiche an. Exocellulasen spalten daraufhin von den freigesetzten nichtreduzierenden Kettenenden Di- und Oligosaccharide ab. β -Glucosidasen spalten Cellobiose zu Glucose. Verändert nach Fuchs (2014).

Herstellung von Bioethanol der zweiten Generation

Die industrielle Produktion von Bioethanol der zweiten Generation erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst ist eine Vorbehandlung der Lignocellulose nötig, um die kristallinen Bereiche der Cellulose und die Matrix aus Hemicellulose und Lignin aufzulösen, sodass die Oberfläche vergrößert und der Zugang der Mikroorganismen erleichtert wird (Mood *et al.*, 2013). Es stehen dazu verschiedene physikalische (Mahlen, Mikrowellenstrahlung), chemische (Säuren, Laugen, Ozonolyse), physikalisch-chemische (Dampfexplosion, Nassoxidation) und biologische Methoden (Einsatz von Pilzen, vor allem Weißfäulepilzen) zur Verfügung (Mood *et al.*, 2013). Jede Methode bringt diverse Nachteile mit sich, sodass die Verfahren einer ständigen Optimierung unterliegen. So können während der Vorbehandlung Inhibitoren

entstehen, welche die zur enzymatischen Hydrolyse nötigen Mikroorganismen negativ beeinflussen. Die Inhibitoren werden in drei Gruppen klassifiziert: (1) schwache Säuren wie Lävulin-, Ameisen- und Essigsäure, (2) Furanderivate wie 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural sowie (3) phenolische Komponenten (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Mood *et al.*, 2013). Die Auswahl einer geeigneten Methode zur Vorbehandlung erfolgt je nach Zusammensetzung der Lignocellulose, die zur Verfügung steht. Die Zusammensetzung variiert nicht nur zwischen unterschiedlichen Pflanzenarten, sondern hängt auch von dem Reifegrad ab (Lee *et al.*, 2007). Verschiedene strukturelle Eigenschaften wie Grad der Kristallinität der Cellulose, Zugang zur Oberfläche, Grad der Cellulose-Polymerisation, Anwesenheit von Lignin und Hemicellulose sowie der Grad der Acetylierung von Hemicellulose haben eine Auswirkung auf die biologische Abbaubarkeit der Lignocellulose (Zheng *et al.*, 2014). Ökonomische Analysen ergaben, dass nahezu 40 % der prognostizierten Verfahrenskosten mit der Freisetzung der Zucker aus Hemicellulose und Cellulose über den kombinierten Einsatz von Vorbehandlung, Enzymproduktion und enzymatischer Hydrolyse verbunden sind, wobei die Vorbehandlung für die Hälfte davon verantwortlich ist (Yang & Wyman, 2008). Obwohl die Kosten für die Enzymproduktion um das 20-fache reduziert wurde, sind die Kosten für Cellulasen im Vergleich zu Amylasen um das 3 bis 10-fache höher (Schubert, 2006).

Nach der Vorbehandlung erfolgt die enzymatische Hydrolyse oder auch enzymatische Saccharifikation genannt. Die Enzyme der Mikroorganismen können in diesem zweiten Schritt die Cellulose und Hemicellulose aufgrund der Vorbehandlung besser angreifen und in Zuckermonomere überführen, die im nächsten Schritt zu Ethanol fermentiert werden. Den letzten Schritt in der Bioethanol-Produktion stellt die Destillation dar.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Vorbehandlung des Getreidestrohs durch eine Thermodruckhydrolyse (TDH), welche am Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (PFI) durchgeführt wurde. Dabei wird das Stroh für mindestens 30 min bei einer Temperatur von 150 °C und unter Zusatz von 0,32 % Salpetersäure inkubiert. Final wird durch eine plötzliche Expansion bei einem Druck von 2 bar eine Trennung in eine flüssige und eine feste Phase erreicht. Je nach Reaktortyp (100 l Reaktor bzw. 425 l Reaktor) und Form des Substrates (loses Stroh oder Strohhallen) konnte etwa 50 % bzw. 30 % der theoretisch enthaltenen Xylose und etwa 10 % bzw. 5 % der theoretisch enthaltenen Cellulose durch TDH hydrolysiert werden (Ballmann *et al.*, 2013). Zur

Entfernung hemmender Substanzen wie HMF und Furfural, die beim Abbau von Zuckern entstehen können, wird die flüssige Phase mit Aktivkohle behandelt (Gasser *et al.*, 2014). Die feste Phase kann vor der enzymatischen Saccharifikation gewaschen und ebenso wie die flüssige Phase umgepuffert werden. Die kombinierte Anwendung von TDH und enzymatischer Saccharifikation setzt 81 % bzw. 67-68 % der theoretisch möglichen Zuckermenge frei. Xylose kann dabei zu 74 % bzw. 50-58 % und die Cellulose zu 74 % bzw. 79-74 % gespalten werden (Ballmann *et al.*, 2013).

1.3 Power-to-Gas

Die sich am schnellsten entwickelnden und sich am meisten verbreitenden Technologien zur Gewinnung regenerativer Energien auf der Welt beinhalten die Umsetzung von Windenergie und die direkte Umsetzung solarer Energie (Photovoltaik) in Elektrizität (Szuhaj *et al.*, 2016). Solar- und Windenergie sind jedoch tages- und jahreszeitlichen Schwankungen unterlegen, sodass wegen fehlender Netzkapazitäten und unzureichender Speichermöglichkeiten von Elektrizität Anlagen zwangsweise abgeschaltet werden müssen. Um den Verlust an Energie zu vermeiden, kann dieser Überschussstrom genutzt werden, um die Elektrolyse von Wasser zu betreiben, welches ein gut bekannter und effizienter Prozess ist (Bessarabov *et al.*, 2015; Szuhaj *et al.*, 2016). Der dabei entstehende Wasserstoff (H_2) soll mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) aus BGA oder der Industrie zusammengebracht werden, um in einem Hochleistungs-Methanreaktor energiereiches Methan (CH_4) mit Hilfe methanogener Archaea zu produzieren (Abbildung 1.5). Ein Gemisch aus Wasserstoff (H_2) und Sauerstoff (O_2) im Verhältnis 2:1 ist bereits in geringen Mengen explosiv. Methan (CH_4) ist in Anwesenheit von Sauerstoff (O_2) im Gegensatz zu Wasserstoff (H_2) nicht explosiv und damit leichter zu handhaben. Technisch erfolgt die Methansynthese bereits über den sogenannten Sabatier-Prozess. Dieses katalysatorabhängige Verfahren erfordert jedoch eine hohe Reinheit der Ausgangsgase und eine dementsprechend aufwändige vorgeschaltete Gasaufreinigung. Die Katalysatoren sind gegenüber Schwefelwasserstoff (H_2S) empfindlich und können beschädigt werden, der biologische Prozess hingegen erfährt dadurch keine Beeinträchtigung und auf eine Aufreinigung der Ausgangsgase kann verzichtet werden.

1. EINLEITUNG

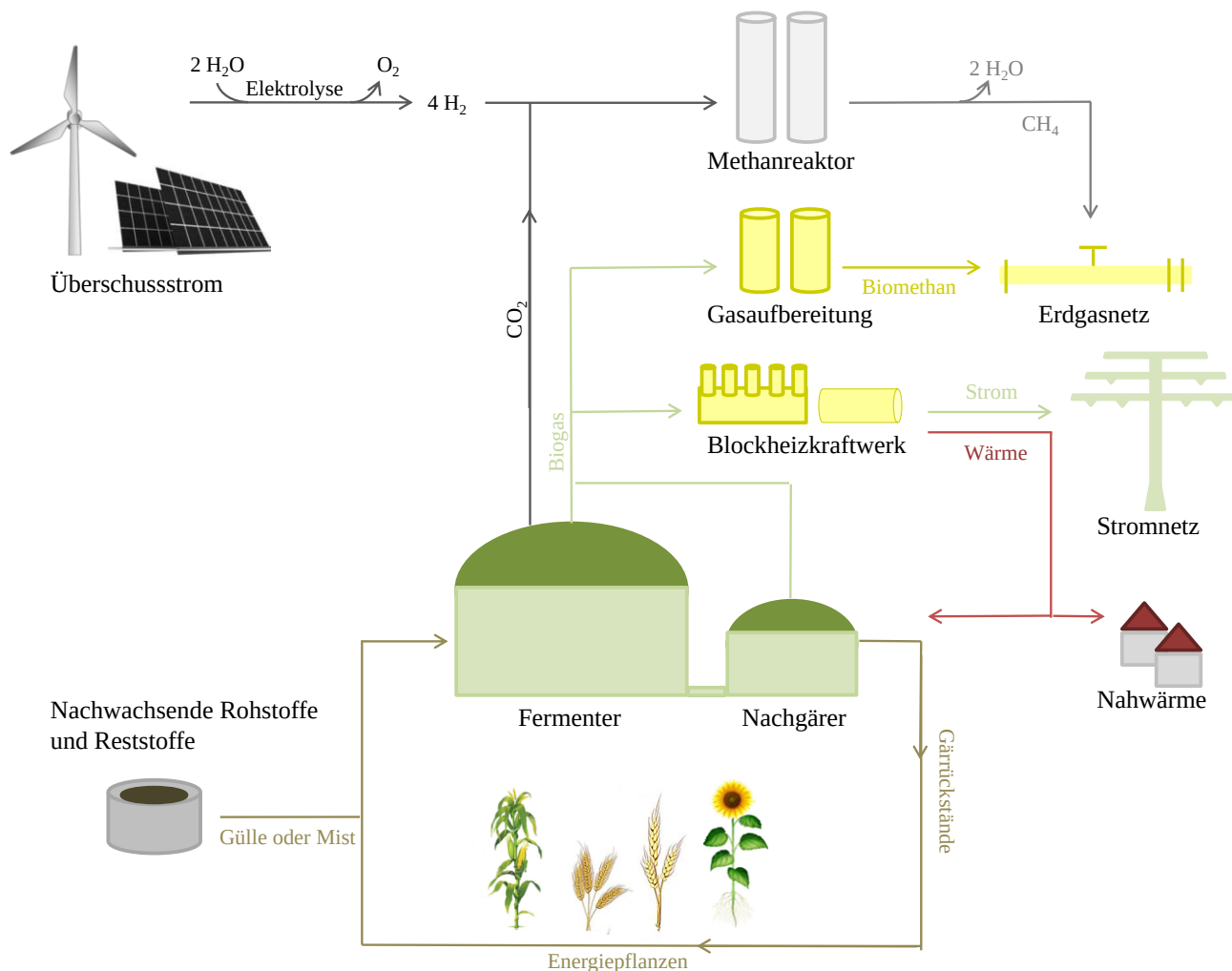


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung einer Biogasanlage (BGA) mit nachgeschaltetem Power-to-Gas Verfahren. Wirtschaftsdünger, Reststoffe und nachwachsende Rohstoffe werden in die BGA eingebracht. Die Substrate werden anaerob in einem komplexen, stufenweisen Prozess im Hauptfermenter und Nachgärer zu Biogas mit der energietragenden Komponente Methan (CH_4) umgesetzt. Gärrückstände werden als Düngemittel im Pflanzenanbau eingesetzt. Das gewonnene Biogas kann nach Aufarbeitung ins Erdgasnetz eingespeist werden oder in Blockheizkraftwerken zur Gewinnung von Wärme und Strom genutzt werden. Überschussstrom aus Wind- und Solarenergie wird verwendet, um Elektrolyse zu betreiben. Der entstehende Wasserstoff (H_2) wird mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) beispielsweise aus BGA zusammengebracht und in einem Hochleistungs-Methanreaktor zu Methan (CH_4) umgesetzt, welches in das Erdgasnetz, das in Deutschland gut ausgebaut ist (Fischer *et al.*, 2013), eingespeist werden kann. Durch diesen Prozess kann die zwangsweise stattfindende Abschaltung von Wind- und Solaranlagen entfallen und der Methanertrag in BGA gesteigert werden. Verändert nach FNR (2011).

Das gasförmige Methan ist im Vergleich zu Strom besser speicherbar und kann ins Erdgasnetz eingespeist werden, welches in Deutschland gut ausgebaut ist. Solange die Technologie für die Speicherung und den Transport von Wasserstoff nicht ausgereift ist, stellt dieses Power-to-Gas Verfahren eine sinnvolle Alternative dar, um den

Verlust an Energie zu vermeiden und gleichzeitig den Methanertrag von BGA zu steigern.

1.4 Biogasanlagen

Die Entstehung von Methan ist ein natürlich vorkommender Prozess, der beim Abbau organischer Substanz unter Limitierung von Sauerstoff sowie anderer terminaler Elektronenakzeptoren wie Nitrat und Sulfat stattfindet. Durch kontrollierte Fermentationsprozesse lässt sich die Methanentstehung technisch nutzen, wie es in Kläranlagen, Deponien und Biogasanlagen (BGA) geschieht (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Wirtschaftsdünger (Rinder- und Schweinegülle) und Reststoffe aus der Landwirtschaft sowie nachwachsende Rohstoffe wie Mais, Getreide-Ganzpflanzensilage, Grassilage oder Rüben werden in BGA als Substrate eingebracht (Friehe *et al.*, 2013 b) (Abbildung 1.5). Dort setzt eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft organisches Material unter anaeroben Bedingungen stufenweise zu Methan um, welches die energietragende Komponente und Hauptbestandteil von Biogas ist. Die Reaktionen der individuellen Stufen werden von verschiedenen Konsortien von Mikroorganismen katalysiert, die teilweise in syntropher Beziehung zueinander stehen und unterschiedliche Ansprüche an ihre Umgebung stellen (Weiland, 2010; Klocke *et al.* 2017).

Es werden verschiedene Anlagentypen von BGA unterschieden. Bei der Nutzung von Energiepflanzen in Deutschland sind zweistufige Anlagen, bestehend aus einem Hauptfermenter und einem Nachgärer, weiter verbreitet. Hydrolyse und Methanogenese finden in beiden Reaktoren statt, während sie in zweiphasigen Anlagen getrennt ablaufen. Dies kann von Vorteil sein, da der ideale pH-Wert für die Hydrolyse leicht im Sauren liegt (5,5-6,5) und der für die Methanogenese im neutralen Bereich (6,8-7,2) (Weiland, 2010). Der zweiphasige Anlagentyp wird bevorzugt bei kommunalen und industriellen organischen Abfällen und festem Mist verwendet. Unterschieden wird außerdem zwischen Nass- und Feststofffermentation. Die Feststoff- oder auch Trockenfermentation genannt, mit vertikalen Rührwerken, dominiert in der Anwendung. Eine Durchmischung des Gärbehälters dient primär der erleichterten Freisetzung des Biogases in den Auffangbereich. Sie stellt zudem den Kontakt zwischen Mikroorganismen und Substrat sicher, sodass eine hohe Produktion an Biogas gewährleistet werden kann. In nicht durchmischten Behältern kommt es aufgrund von Dichteunterschieden und dem Auftrieb durch Gasbildung zu einer

Schichtenbildung. Die Mikroorganismen befinden sich hauptsächlich im unteren Teil des Fermenters, während sich das abzubauen Substrat in der oberen Schicht ansammelt (Friehe *et al.*, 2013 a). Eine zu starke Durchmischung ist jedoch kontraproduktiv, denn acetogene Bakterien, die Wasserstoff bilden, stehen in einer engen Lebensgemeinschaft mit den Wasserstoff verbrauchenden Methanogenen. Werden diese syntrophen Organismen aufgrund von Scherkräften voneinander getrennt, ist der Interspezies-Wasserstoff-Transfer zwischen acetogenen Bakterien und methanogenen Archaea gestört. Der Wasserstoffpartialdruck steigt an, wodurch die Umsetzung der Zwischenprodukte der Acidogenese aus energetischen Gründen verhindert wird. Es kommt zur Anreicherung organischer Säuren, wie beispielsweise Propionsäure, iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure, was wiederum die Methanogenese hemmt.

Die Mehrheit (etwa 86 %) der Biogasanlagen in Deutschland wird mesophil (37-43 °C) betrieben (Maus *et al.*, 2016). Mesophile Anlagen zeichnen sich durch eine höhere Diversität an Mikroorganismen und eine bessere Prozessstabilität aus. Es gibt aber auch thermophile Anlagen (6 %), die bei Temperaturen zwischen 45 und 60 °C betrieben werden. Der erhöhte Energiebedarf zur Erhaltung der thermophilen Temperatur im Reaktor stellt keinen wichtigen Faktor dar, da zusätzliche Wärme, die durch Kraft-Wärme-Kopplung entstanden ist, zur Zeit häufig vergeudet wird (Weiland, 2010). Thermophile Anlagen zeichnen sich durch höhere Umsatzraten und kürzere hydraulische Verweilzeiten aus. Unter der hydraulischen Verweilzeit wird die durchschnittliche Zeit des Aufenthalts von Substraten im Fermenter verstanden. In mesophilen Anlagen ist eine Verweilzeit von 30 bis 40 Tagen anzustreben (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). In der Praxis wird diese jedoch meist überschritten. Die hydraulische Verweilzeit in BGA, die mit Energiepflanzen wie Mais gefüttert werden, kann 40 bis 80 Tage betragen (König *et al.*, 2013). In thermophilen Anlagen beträgt sie etwa 20 Tage (Maus *et al.*, 2016).

Das gewonnene Biogas kann in Blockheizkraftwerken zur Gewinnung von Wärme und Strom genutzt werden und lässt sich darüber hinaus nach Aufarbeitung ins Erdgasnetz einspeisen (Abbildung 1.5), welches in Deutschland gut ausgebaut ist (Fischer *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine BGA (BGA Butschen) in Viersen (Nordrhein-Westfalen) beprobt, die thermophil bei 54 °C betrieben wird, eine Verweilzeit von 28 Tagen aufweist und die sich durch einen platzsparenden, siloförmigen Anlagenbau auszeichnet. Weitere Anlagenparameter sind der Tabelle 2.1 unter Abschnitt 2.5 zu entnehmen. Die Durchmischung des Substrates erfolgt über eine Pumpe, wobei das Substrat über eine Fermentersteigleitung dem Gärraum im oberen Teil wieder zugeführt wird. Des Weiteren gibt es ein Hydrolyserohr, in welchem das Substrat ein bis zwei Stunden verbleibt, bevor es von der nächsten Charge weiter in den Gärraum geschoben wird. Die Hydrolyse findet somit in einem separaten Raum innerhalb des Fermenters statt (Hydrolyserohr). Das neu hinzukommende Substrat wird vom restlichen Fermenter vorgewärmt, wodurch der Abbau beschleunigt wird. Steine und nicht abbaubare, feste Bestandteile sammeln sich in einem konusförmig vertieften Boden, von dem sie abgesaugt werden können.

Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen

Die Zusammensetzung von Biogas variiert und ist abhängig von diversen Parametern wie eingebrachtem Substrat, Anlagentyp und dessen Betriebsparameter. Grundsätzlich besteht Biogas aus 50-75 % der energietragenden Komponente Methan (CH_4), 25-45 % Kohlenstoffdioxid (CO_2), 2-7 % Wasser (H_2O), 0-2 % Stickstoff (N_2), 0-1 % Wasserstoff (H_2) und zu je 0-2 % Sauerstoff (O_2) bzw. Schwefelwasserstoff (H_2S) (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Der mikrobiologische Prozess des anaeroben Abbaus organischer Substrate lässt sich in vier Stufen einteilen: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese (Abbildung 1.6). Der Prozess des stufenweisen Abbaus organischen Materials findet im Fermenter dabei zeitlich und räumlich parallel statt.

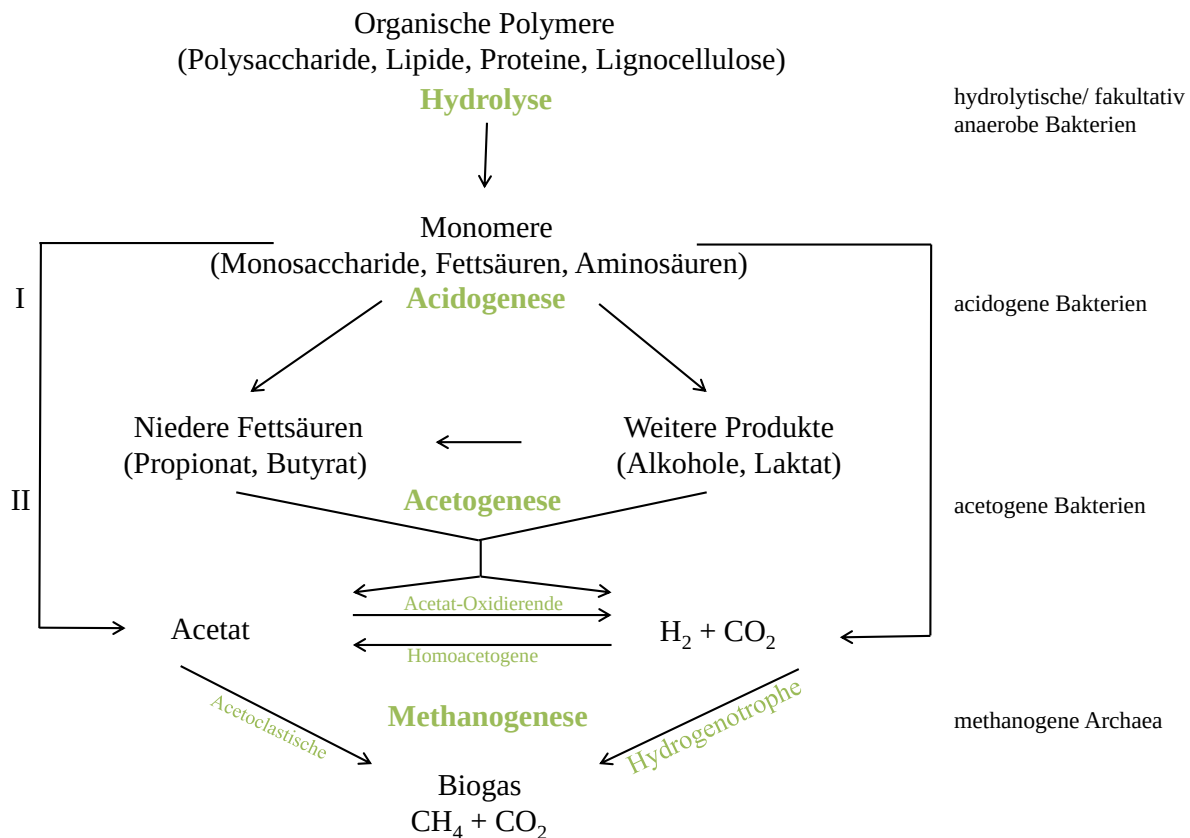


Abbildung 1.6: Schema des anaeroben Abbaus von organischen Polymeren durch Mikroorganismen in Biogasanlagen. Die Umsetzung der Polymere erfolgt in vier aufeinanderfolgenden Stufen: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Neben den wichtigsten Substraten und Stoffwechselwegen sind ebenfalls die beteiligten Mikroorganismengruppen abgebildet. I = fermentative Bakterien I (primäre Gärer) und II = fermentative Bakterien II (sekundäre Gärer). Neueste Erkenntnisse zur methylotrophen Methanogenese und Methanotrophie (May, 2015), die es genauer zu ermitteln gilt, wurden in dem Schema nicht berücksichtigt. Verändert nach Reineke & Schlömann (2015).

Hydrolyse

In der ersten Stufe, der Hydrolyse, werden komplexe organische Polymere (Polysaccharide, Lipide und Proteine) in ihre oligomeren und monomeren Verbindungen (Saccharide, Fettsäuren und Aminosäuren) gespalten. Dazu findet eine Besiedlung des organischen Materials statt und Bakterien sekretieren hydrolytische Enzyme wie Cellulasen, Cellobiasen, Xylanasen, Amylasen, Lipasen und Proteasen (Weiland, 2010; Christy *et al.*, 2014). Auch die mögliche Beteiligung und Verbesserung der hydrolytischen Phase durch anaerobe Pilze der Gattung *Cyellamyces*, die in Rindermist nachgewiesen wurden (Fliegerova *et al.*, 2010), wird diskutiert (Griffith *et al.*, 2010; Kuhad *et al.*, 2016). Die meisten der hydrolytischen Bakterien sind strikt anaerob wie Bacteroidetes, Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Bifidobacterium*, aber auch einige fakultativ Anaerobe wie *Enterobacteriaceae* und

Vertreter der Gattung *Streptococcus* sind beteiligt (Weiland, 2010; Klocke *et al.*, 2017). Die entstehenden oligo- und monomeren Verbindungen können von den hydrolytischen Organismen wie auch von anderen Bakterien aufgenommen werden (Christy *et al.*, 2014).

Der Abbau von Cellulose und Hemicellulose, welche Bestandteile von Pflanzen sind, sowie der Zugang hydrolytischer Bakterien zu diesem Material stellen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in Biogasanlagen dar (Christy *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Horváth *et al.*, 2016). Lignin wird nach bisherigem Kenntnisstand unter anaeroben Bedingungen nicht oder nur sehr langsam abgebaut, sodass Substrate mit hohem Ligninanteil in Biogasanlagen praktisch nicht umgesetzt werden (Schieder *et al.*, 2010). Lignocellulosehaltiges Biomaterial ist in ausreichender Menge vorhanden und ein billiges Ausgangsmaterial zur Herstellung von Biogas. Aufgrund der kristallinen Struktur ist es durch Mikroorganismen jedoch schlecht abzubauen. In der Vergangenheit wurde deshalb die Aufmerksamkeit auf die Vorbehandlung von lignocellulosehaltiger Biomasse gelegt, vergleichbar mit der Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation (Abschnitt 1.2). Die Vorbehandlung beinhaltet verschiedene physikalische, chemische und biologische Methoden (Divya *et al.*, 2015; Budzianowski, 2016). Die Vorbehandlung sollte kosteneffizient sein und einen möglichst hohen Ertrag an polysaccharidhaltigem Substrat mit einer geringen Menge an inhibitorischen Nebenprodukten liefern (Horváth *et al.*, 2016). Gegenwärtig kommt es dennoch aufgrund der resultierenden Kostensteigerung der Biogasproduktion zum Rückgang der Anwendung der vielen existierenden Methoden (Budzianowski, 2016). So sind die Kosten für die am häufigsten verwendeten Enzyme wie Cellulasen und Hemicellulasen (Zheng *et al.*, 2014) recht hoch. Dem gegenüber steht dabei eine nur geringe Steigerung der Biogasproduktion, wodurch die Anwendung von Enzymen zur Vorbehandlung limitiert wurde (Mao *et al.*, 2015). Bei der Nutzung von lignocellulosehaltigem Biomaterial zur Herstellung von Biogas kommt es somit zu den gleichen Problemen wie bei der Nutzung von Lignocellulose zur Bioethanol-Herstellung. Erkenntnisse aus der Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation (siehe Abschnitt 1.2) könnten somit auch die Herstellung von Biogas aus Lignocellulose verbessern.

Acidogenese

Während der Hydrolyse gebildete Produkte werden in der zweiten Stufe, der Acidogenese, von fermentativen Mikroorganismen (primäre Gärer, I in Abbildung 1.6) als Substrat genutzt. Das während der Glycolyse entstehende Pyruvat kann je nach mikrobiellem Stoffwechselweg zu leicht flüchtigen Säuren wie Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure sowie zu anderen organischen Säuren (Ameisensäure, Milchsäure), Ketonen oder Aldehyden umgesetzt werden. Aufgrund dessen sinkt der pH-Wert, was für die acidogenen und im folgenden Schritt für die acetogenen Bakterien von Vorteil ist, denn sie bevorzugen ein leicht saures Milieu (pH 4,5-5,5). Des Weiteren entstehen durch den anaeroben Abbau durch die primären Gärer Alkohole, H_2 und CO_2 . Vertreter der acidogenen Stufe sind *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* und *Salmonella* (Christy *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte die Art *Deftuviitoga tunisiensis* in einer Untersuchung am häufigsten isoliert und in hoher Abundanz detektiert werden und scheint somit eine große Bedeutung in Biogasanlagen zu spielen (Cibis, 2014; Cibis *et al.*, 2016). Die Bildung von Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure konnte bei Kulturen von Isolat der Gattung *Bacillus*, *Clostridium*, *Deftuviitoga*, *Dendrosporobacter*, *Proteiniborus*, *Selenomonas* und *Tepidanaerobacter* nachgewiesen werden (Cibis, 2014; Cibis *et al.*, 2016).

Mit der Bildung von Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff entstehen bereits während der Acidogenese Ausgangsstoffe, die in der letzten Stufe des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, verwendet werden können.

Werden veresterte Fette wie Rapsöl und proteinreiche Substrate wie Klee gras eingesetzt, entstehen aus den darin enthaltenen Schwefelverbindungen Schwefelwasserstoff (H_2S) und aus Stickstoffverbindungen Ammoniak (NH_3) (Schieder *et al.*, 2010). Diese Stoffe können bereits in geringen Konzentrationen toxisch sein und somit den Gärprozess stören (Friehe *et al.*, 2013 a). Bei der Nutzung von Biogas führen hohe H_2S -Konzentrationen zu Korrosionsschäden an Blockheizkraftwerken und Heizkesseln (Friehe *et al.*, 2013 a). Im Vergleich zu kohlenhydrathaltigen Substraten ist der Methangehalt in Biogas beim Einsatz von lipid- und proteinreichen Substraten potentiell höher. Hydrolyse und Acidogenese sind nicht strikt zu trennen, denn hydrolytisch aktive Bakterien können entstandene Produkte ebenfalls weiter verwerten. Mikroorganismen, die an den ersten beiden Stufen beteiligt sind, zeichnen sich im Gegensatz zu den Organismen, die an der

Acetogenese und der Methanogenese beteiligt sind, durch schnellere Wachstumsraten aus. Eine Anreicherung von Carbonsäuren wie Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure u. a. kann ein Hinweis auf eine Prozessinstabilität sein. Sinkt der pH-Wert, behindert dies die Organismen der Methanogenese und damit auch die syntrophen Organismen der Acetogenese, was zu einer weiteren Akkumulation von Säuren und damit einer Absenkung des pH-Wertes führt.

Acetogenese

In der dritten Abbaustufe werden die in der Acidogenese entstandenen leicht flüchtigen Fettsäuren sowie Ethanol, aber auch flüchtige Fettsäuren zu Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff abgebaut. Die Reaktionen werden hauptsächlich von strikt anaeroben, syntrophen Bakterien, den sekundären Gärern (II in Abbildung 1.6), durchgeführt. Die Oxidation von Fettsäuren ist ein endergoner Prozess, der nur stattfinden kann, wenn die entstehenden Produkte (Essigsäure oder Wasserstoff) aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden und Energie von nachfolgenden Reaktionen bereitgestellt wird. Wasserstoff ist in Wasser schlecht löslich, sodass sich der Wasserstoffpartialdruck in unmittelbarer Umgebung der Syntrophen erhöhen und die Reaktion thermodynamisch unmöglich machen würde. Aufgrund dessen kommen die Acetogenen in einer engen Lebensgemeinschaft, einer sogenannten Syntrophie, mit den Wasserstoff verbrauchenden methanogenen Archaea vor, die an der letzten Stufe des anaeroben Abbauprozesses beteiligt sind. Unter Syntrophie ist ein Spezialfall der symbiotischen Kooperation zwischen zwei metabolisch verschiedenen Organismen zu verstehen, die gegenseitig auf die Umsetzung von Substraten angewiesen sind, typischerweise aus energetischen Gründen (Schink, 1997). Zwischen den syntrophen, acetogenen Bakterien und den methanogenen Archaea entsteht ein Inter-Spezies-Elektronentransfer in Form von Wasserstoff (Schink, 1997; Schieder *et al.*, 2010).

Die Wasserstoff produzierenden acetogenen Bakterien wie *Syntrophomonas wolfeii* und *Syntrophobacter wolinii* sind strikt anaerob und besitzen ein pH-Optimum bei etwa 6. Die langsam wachsenden Organismen reagieren sensitiv auf Fluktuationen des organischen Materials und auf Umwelteinflüsse (Christy *et al.*, 2014). Im Allgemeinen sind Vertreter syntropher Bakterien den Gattungen *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora*, *Syntrophus*, *Propionibacter*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Thermoanaerobium*, *Pelobacter* und *Smithella* sowie *Clostridium* und δ -Proteobacteria (Schieder *et al.*, 2010) zuzuordnen. In Propionsäure abbauenden

Anreicherungskulturen, die aus Biogasanlagen gewonnen wurden, konnten *Cryptanaerobacter* sp./*Pelotomaculum* sp., *Syntrophobacter sulfatireducens* und *Candidatus „Cloacamonas“* sp. als Schlüsselspezies identifiziert werden (Ahlert, 2015; Ahlert *et al.*, 2016).

Als weitere Gruppe sind homoacetogene Bakterien zu nennen, welche den durch acetogene Bakterien entstehenden Wasserstoff aus dem Gleichgewicht entfernen, indem sie ihn mit CO₂ zu Acetat umsetzen (Schieder *et al.*, 2010).

Bei Anwesenheit von Sulfat können Sulfatreduzierer des Weiteren Alkohole, Propionat und Butyrat sowie andere organische Säuren wie Laktat, Succinat und Malat verwerten. Sulfatreduzierer und Methanogene konkurrieren um Substrate wie Acetat und H₂/CO₂ (Hansen *et al.*, 1999). Sulfatreduzierer sind in Anwesenheit von Sulfat den methanogenen Archaea aufgrund thermodynamischer Gründe überlegen (Muyzer & Stams, 2008), was zu einer verringerten Methanproduktion führt (Elferink, 1994), sodass dieser Prozess in Biogasanlagen unerwünscht ist. Daneben sind der inhibitorische Effekt von Sulfid auf anaerobe Bakterien sowie die Toxizität von H₂S und deren korrosiven Eigenschaften als weitere negative Begleiterscheinungen zu nennen.

Methanogenese

In der letzten Stufe des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, bilden methanogene Archaea (Abschnitt 1.5) Methan. Auf Grundlage von Ergebnissen aus Abwasserreinigungs- und Klärprozessen wurde zunächst davon ausgegangen, dass der acetoklastische Reaktionsweg in Biogasanlagen ebenfalls dominiert. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass entgegen dieser Annahme die hydrogenotrophe gegenüber der acetoklastischen Methanogenese überwiegt (Bauer *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2008 bzw. 2010; Maus *et al.*, 2016). Lediglich bei niedriger organischer Raumbelastung wurden acetoclastische Methanogene (*Methanosaeta*, *Methanosarcina*) relativ häufig gefunden (Schieder *et al.*, 2010; Stantscheff *et al.*, 2014). Thermophile Bedingungen können das Wachstum von stäbchenförmigen oder coccoiden hydrogenotrophen Zellen bevorzugen (Demirel & Scherer, 2008).

Wie zuvor bereits erwähnt, stellt die Hydrolyse aufgrund des kristallinen Charakters und der schweren Zugänglichkeit von Lignocellulose den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Werden jedoch große Mengen an leicht

abbaubaren Verbindungen in BGA zugeführt, kann die Methanogenese zum geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt werden.

1.5 Methanogene Archaea

Methanogene Archaea sind strikt anaerobe Mikroorganismen, die CO₂ oder Methylgruppen als terminalen Elektronenakzeptor verwenden und Methan als Endprodukt der anaeroben Atmung bilden. Archaea bilden neben Eukarya und Bacteria die dritte Domäne des Lebens. Als zweite prokaryotische Domäne neben den Bacteria teilen sie nicht nur Eigenschaften mit ihnen, sondern auch mit den Eukarya. DNA Replikation, Transkription und Translation ähneln beispielsweise den Prozessen in Eukarya, während der Stoffwechsel dem der Bacteria ähnlich ist (Cavicchioli, 2011). Im Aufbau der Zellwand (Pseudomurein oder Proteinuntereinheiten anstelle von Peptidoglycan) (König, 2016) und der Zellmembran ((Glycerin)Phytanyldiethern und Biphythanyltetraether) sowie in wichtigen Coenzymen der methanogenen Archaea (Methanofuran, Tetrahydromethanopterin, Deazaflavin F₄₂₀, Coenzym M und HS-Coenzym B) unterscheiden sie sich grundlegend von den Eubacteria (Reineke & Schlömann, 2015). Die methanogenen Archaea gehören dem Phylum der *Euryarchaeota* mit den folgenden sechs Ordnungen an: Methanobacteriales, Methanococcales, Mathanopyrales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales und Methanocellales. Eine siebte Ordnung, Methanomassiliicoccales, die phylogenetisch nahe mit den Thermoplasmatales verwandt ist, wurde kürzlich vorgeschlagen (Gaci *et al.*, 2014). Methanogene sind ubiquitär in verschiedenen anaeroben Lebensräumen verbreitet, die mit dem Abbau organischen Materials oder geochemischer Aktivität assoziiert werden. Neben gemäßigten Habitaten sind Archaea im Allgemeinen außerdem in Umgebungen mit extremen Temperaturen, Salzgehalten und pH-Werten zu finden (Liu & Whitman, 2008). Vertreter der methanogenen Archaea konnten in anoxischen Habitaten wie aquatischen Sedimenten, in Sumpf- und Marschland, Tundren, Reisfeldern, geothermischen Systemen, in Abwasser- und Klärschlamm, Deponien sowie in Fermentern nachgewiesen und teilweise isoliert werden. Der Gastrointestinaltrakt von Menschen und Säugetieren sowie der Termitendarm (König *et al.*, 2013) stellen weitere Lebensräume dar.

Die mikrobielle Methanbildung in der Natur erfolgt zu je einem Drittel im Pansen von Wiederkäuern, in Reisfeldern und in natürlichem Feuchtland wie Sümpfen, Seen und Mooren (Reineke & Schlömann, 2015). Wie Abschnitt 1.6 zu entnehmen ist, ist die

Bildung von Methan in Termiten eine beachtenswerte Größe. Auch die Steigerung des Reisanbaus und der Rinderzucht ist eine wichtige Ursache für den Anstieg der Methanbildung (Reineke & Schlömann, 2015). Methan ist im Vergleich zu CO₂ einundzwanzigmal klimaschädlicher und steht in Zusammenhang mit dem Treibhauseffekt sowie dem damit verbundenen Klimawandel.

Die terminale Abbaustufe der anaeroben Verwertung organischen Materials wird als Methanogenese bezeichnet. In der Natur werden drei verschiedene methanogene Ökosysteme beschrieben: (1) In aquatischen Sedimenten, Reisfeldern, in Klärschlamm und Fermentern wird das organische Material komplett abgebaut. (2) In Bezug auf den Intestinaltrakt ist der Prozess der Mineralisation unvollständig und die meisten der entstehenden Zwischenprodukte wie flüchtige Fettsäuren werden vom Blutkreislauf absorbiert und dienen als Nahrung. (3) In Abwesenheit organischen Materials, wie es beispielsweise in heißen Quellen der Fall ist, findet die Methanogenese nur in Form von geochemisch geformtem H₂ statt (Garcia *et al.*, 2000). Je nach Reaktionsweg der Methanogenese und dem dabei verwerteten Substrat werden drei Gruppen unterschieden: hydrogenotrophe, acetoclastische und methylotrophe Methanogene. Die meisten Gattungen methanogener Archaea sind hydrogenotroph und reduzieren CO₂ mit H₂ zu CH₄ (Liu & Whitman, 2008). Diese Reaktion liefert unter Standardbedingungen im Vergleich zu den anderen beiden Reaktionswegen die meiste Energie. Etwa ein Drittel des global produzierten Methans geht auf die hydrogenotrophe Methanogenese zurück. Viele der hydrogenotrophen Archaea können neben H₂ auch Formiat als Elektronendonator nutzen, einige zudem 2-Propanol, 2-Butanol und Cyclopentanol sowie Ethanol und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Liu & Whitman, 2008). Die meisten organischen Substanzen wie Kohlenhydrate, langkettige Fettsäuren und Alkohole werden nicht direkt von Methanogenen metabolisiert (Liu & Whitman, 2008). In diesem Fall sind sie auf die Fermentationsprodukte primärer und sekundärer Gärer angewiesen (Abschnitt 1.4), die dann von den Methanogenen wiederum als Substrat genutzt werden können. Methanogene kommen syntroph mit heterotrophen H₂-produzierenden Bakterien vor (vgl. Abschnitt 1.4), welche die Oxidation verschiedener Substrate katalysieren. Über einen Interspezies-Substrat-Transfer nutzen Methanogene den von syntrophen Bakterien gebildeten H₂, sodass der Wasserstoffpartialdruck unter 10 Pa bleibt (Schink, 1997). Im Gegenzug profitieren die bakteriellen Symbionten von dem Entfernen des H₂, welcher ansonsten deren Wachstum behindern würde.

Zwei Drittel der Methanproduktion ist auf die acetoclastische Methanogenese zurückzuführen (Ferry & Kestead, 2007; Liu & Whitman, 2008), bei der Acetat zu Methan und CO₂ umgewandelt wird. Dieser Reaktionsweg findet vor allem in Frisch- und Abwasser sowie in marinen Sedimenten statt (Cersosimo & Wright, 2015), denn H₂ stellt in diesem Prozess den limitierenden Faktor dar (Garcia *et al.*, 2000) und ist auf zwei Gattungen, *Methanosarcina* und *Methanosaeta*, beschränkt. Neben diesen beiden dominanten Wegen existiert als dritter Weg die methyilotrophe Methanogenese. Als Substrat dienen methylierte C1-Verbindungen wie Methanol, methylierte Amine und Sulfide. Dieser Weg ist auf die Ordnung Methanosarcinales und auf die Gattung *Methanosphaera* aus der Ordnung Methanobacteriales beschränkt (Liu & Whitman, 2008). Die methyilotrophe Methanogenese war in BGA aufgrund der schlechten Messbarkeit methylierter Verbindungen bisher wenig relevant. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Methanol während der Hydrolysephase entsteht, welches von methyilotrophen Archaea reduziert werden kann (May, 2015). Methanol wird beim mikrobiellen Abbau von Pektin, welches Bestandteil von Zellwänden und der Mittellamelle ist, gebildet.

Sulfat reduzierende und homoacetogene Bakterien konkurrieren mit den Methanogenen um H₂ in anaeroben Umgebungen. In Anwesenheit von Sulfat sind Sulfatreduzierer den hydrogenotrophen Methanogenen in Bezug auf H₂-Affinität und Wachstumsrate überlegen (Garcia *et al.*, 2000). Methanogenese und Sulfatreduktion schließen sich jedoch gegenseitig nicht aus. Methyilotrophe Methanogenese und Sulfatreduktion kommen beispielsweise in salinen oder hypersalinen Umgebungen gleichzeitig vor, denn Sulfatreduzierer besitzen eine geringe Affinität gegenüber methylierten Aminen und Methanol, das beim anaeroben Abbau von pflanzlichen Pektinen entsteht (Garcia *et al.*, 2000). Die ökologische Rolle, die Homoacetogene spielen, ist nicht geklärt. In Sedimenten scheinen sie mit Methanogenen nicht um H₂ zu konkurrieren, vor allem im Intestinaltrakt von Termiten spielen sie jedoch eine bedeutende Rolle (Garcia *et al.*, 2000) (siehe Abschnitt 1.6).

1.6 Termiten

Termiten sind ein Beispiel für ein etwa 150 Millionen Jahre altes Ökosystem, das den Abbau von Lignocellulose über den Lauf der Zeit optimiert hat, sodass der Polymerabbau innerhalb von 24 Stunden stattfindet (Breznak, 1984; König *et al.*, 2013). Die Zusammensetzung von Lignocellulose kann Abschnitt 1.2 entnommen

werden. Cellulose ist der Hauptbestandteil von pflanzlichem Material (40-50 %) und stellt die am meisten verbreitete Biomasse auf der Erde dar (Tomme *et al.*, 1995; Ni & Tokuda, 2013). Termiten können 74-99 % der Cellulose und 65-87 % der Hemicellulose im Holz abbauen (Watanabe & Tokuda, 2010), sodass das symbiotische System der Termiten effizienter und schneller ist als das von Pilzen oder Wiederkäuern (König *et al.*, 2013; Brune, 2014). Während die pilzzüchtenden Macrotermitinae, welche eine Subfamilie der Termitidae darstellen, von der ligninabbauenden Kapazität ihrer pilzlichen Partner profitieren, wird der Abbau von Lignin durch die Termiten selbst kontrovers diskutiert. Diverse Studien geben Modifikationen an den aromatischen Ringen und den Seitenketten von Lignin während der Darmpassage in niederen und höheren Termiten an. (Ni & Tokuda, 2013). Die Modifikationen können durch endogene Enzyme, nicht-enzymatische Prozesse oder durch mechanische Beiträge der Mandibel und des Kaumagens hervorgerufen werden (Brune, 2014). Modifiziertes Lignin ist Hauptbestandteil des ausgeschiedenen Faeces.

Entgegen der weit verbreiteten Meinung stellen nur relativ wenige Termiten eine Gefahr für Strukturen aus Holz dar (Brune, 2014). Die Rolle der Termiten als direkte Mediatoren organischen Abbaus und als wichtige Komponenten der tropischen Bodenfauna, welche für die Humifikation, Bodenbeschaffenheit, Stickstofffixierung, Wasserdynamik, Aggregatbindung und die Bildung von Tonmineralen verantwortlich sind, ist weithin anerkannt (Bignell *et al.*, 1997).

Von Termiten werden beträchtliche Mengen an Methan freigesetzt. Geschätzt wird, dass die jährliche Methanemission durch Termiten $1,5 \times 10^8$ t (150 Mt, 1 Mt = 10^{12} g) beträgt (Zimmermann *et al.*, 1982). Weltweit sind etwa 2-4 % der Methanemission auf Termiten zurückzuführen (Sugimoto *et al.*, 2000), was 11 % der Methanemission aus natürlichen Quellen entspricht (Liu & Whitman, 2008). Zusammen mit Schaben, Tausendfüßlern und Käfern gehören Termiten zu den wenigen terrestrischen Arthropoden, von denen bekannt ist, dass sie dieses Treibhausgas emittieren (Hackstein & Stumm, 1994). Es gibt große Unterschiede bei der Methanemissionsrate zwischen Termiten verschiedener Ernährungsgruppen als auch unter den verschiedenen Termitenarten (Brauman *et al.*, 1992; Bignell *et al.*, 1997). Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht bekannt. Generell emittieren niedere Termiten weniger Methan als höhere Termiten (Bignell *et al.*, 1997). Unter den höheren Termiten wurden bei humusfressenden und bei einigen pilzkultivierenden Termiten die höchsten Methanemissionsraten, verglichen mit grasfressenden und holzfressenden,

höheren und niederen Termiten, beobachtet (Brauman *et al.*, 1992: Hongoh & Ohkuma, 2010).

Termiten, die der Ordnung Isoptera angehören, sind sozial lebende Insekten mit fünf Kasten (Geschlechtstiere - König, Königin und Nymphen; Arbeiter und Soldaten). Zusammen mit den Mantodea (Fangschrecken) und den Blattaria (Schaben) bilden sie eine monophyletische Gruppe, die Dictyoptera (Eggleton, 2001 & 2011). Aufgrund phylogenetischer Kontroversen kam es inzwischen zur Einigung, dass Termiten als Epifamilie (taxonomisch gesehen eine Stellung zwischen Familie und Superfamilie) der Blattaria betrachtet werden (Lo & Eggleton, 2011). Es gibt 282 Gattungen (Snyder, 1949) mit 2761 beschriebenen Arten (König *et al.*, 2013), von denen nahezu 75 % auf die höheren Termiten (Familie Termitidae) entfallen (Ni & Tokuda, 2013). Diese unterscheiden sich von den niederen Termiten, zu denen sechs Familien (Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae und Serritermitidae) gehören, durch die Abwesenheit von Flagellaten im Hinterdarm der Termiten.

Das Verbreitungsgebiet der Termiten liegt hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Regionen, jedoch kommen verschiedene Arten der Gattung *Reticulitermes* (Rhinotermitidae) in Teilen Südeuropas vor (Clément *et al.*, 2001). Die ersten schabenähnlichen Fossilien stammen aus dem Karbon vor ~310 Millionen Jahren und Fossilien, die rezenten Schaben ähneln, erscheinen in der frühen Kreidezeit (~130 Millionen Jahre). Die ältesten Termitenfossilien stammen ebenfalls aus der Kreidezeit (~135 Millionen Jahre), sodass der Ursprung der Dictyoptera im späten Jura (~150 Millionen Jahre) angesiedelt wird (Lo & Eggleton, 2011). Die in Australien vorkommende Art *Mastotermes darwiniensis* (*M. darwiniensis*), welche einige gemeinsame Merkmale mit den als Termitenvorfahren angesehenen holzfressenden Schaben besitzt und somit morphologisch gesehen als die ursprünglichste Termitenart gilt, stellt die einzige rezente Spezies der Familie der Mastotermitidae dar. Der ursprüngliche Charakter wird insbesondere in der Kaste der Geflügelten (Alate) deutlich, welche die reproduktiven Termiten umfassen. Die Hinterflügel haben beispielsweise einen distinkten Anallappen und die Weibchen besitzen ein reduziertes Ovipositor (Gay & Calaby, 1970). In Australien stellt *M. darwiniensis* die destruktivste Termitenart dar und lebt von diversen Substraten, darunter auch Holz und Heu (Gay & Calaby, 1970).

1. EINLEITUNG

Während die höheren Termiten diverse Substrate, darunter insbesondere Humus, verwerten (Ni & Tokuda, 2013), nutzen die evolutionär älteren, niederen Termiten vorrangig Holz als Nahrungsquelle. Bei der Verwertung der Substrate wird neben den termiteneigenen mechanischen und enzymatischen Beiträgen eine komplexe symbiotische Gemeinschaft aus allen drei Domänen des Lebens genutzt: Bacteria, Archaea und Eukarya (Flagellaten, Hefen und Pilze) (König *et al.*, 2006).

Holzabbau durch Termiten und ihre Symbionten

Aufgenommene Nahrung wird zunächst durch die Mandibel in wenige Mikrometer große Fragmente (10-20 μm) zerkleinert (Brune, 2014), bevor diese im Vorderdarm mit Enzymen der Speicheldrüsen gemischt und im Kaumagen weiter zerrieben werden (Abbildung 1.7). Glucose, die im Mitteldarm freigesetzt wird, steht der Termite zur Verfügung. Der Hinterdarm mit vergrößerter Gärkammer enthält hauptsächlich die symbiotischen Organismen.

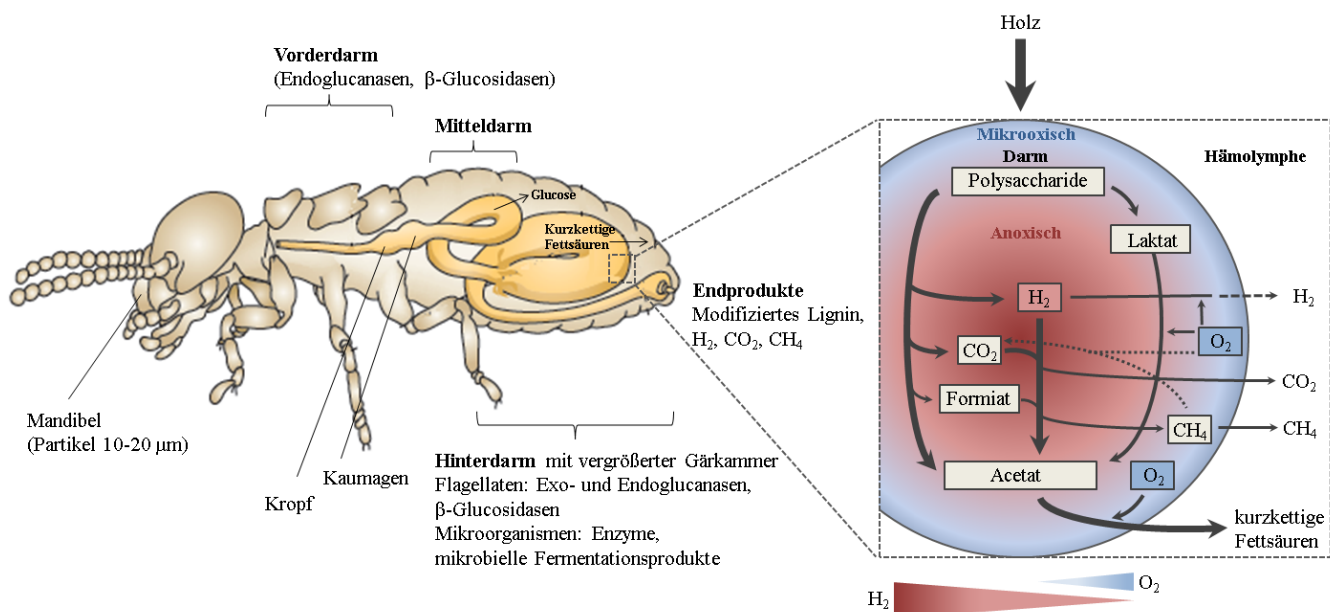


Abbildung 1.7: Schema der Holzpassage durch niedere Termiten und Ablauf mikrobieller Prozesse in der Gärkammer des Hinterdarms. Der Termitendarm untergliedert sich in Vorder-, Mittel- und Hinterdarm mit vergrößerter Gärkammer, in der hauptsächlich die symbiotisch aktiven Organismen vorzufinden sind. Durch Fermentationsprozesse der Flagellaten entstehen hauptsächlich Acetat und kurzkettige Fettsäuren, die von der Termite resorbiert werden. Der als Zwischenprodukt anfallende Wasserstoff (H_2) wird über Homoacetogene mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) zu Acetat umgesetzt, über Methanogene zu Methan umgesetzt oder wird freigesetzt. Der Influx von Sauerstoff (O_2) über die Peripherie der Gärkammer ist aufgrund des großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis enorm. Die effiziente Umsetzung von O_2 durch die mikrobielle Gemeinschaft des Termitendarms resultiert in einem steilen O_2 -Gradienten im Hinterdarm. Der Einfluss methanotropher Bakterien auf die Methanoxidation ist noch zu ermitteln. Verändert nach Brune (2014).

Symbiotische Aktivität im Termitendarm

Bei dem Abbau von Lignocellulose in Termiten werden drei Stufen unterschieden. Zunächst findet eine Hydrolyse der Polymere in Oligomere und Monomere durch termiteneigene Enzyme sowie durch Enzyme der symbiotischen Flagellaten, Hefen und Bakterien statt. Im zweiten Schritt werden diese durch oxidative und fermentative Prozesse von Hefen und Bakterien zu niedermolekularen Säuren, Alkoholen, CO_2 und H_2 abgebaut. In der letzten Stufe entstehen durch homoacetogene und sulfatreduzierende Bakterien sowie durch methanogene Archaea Acetat, CO_2 und Methan (König *et al.*, 2013). Acetat sowie einige andere kurzkettige Fettsäuren, welche typische Endprodukte fermentativer mikrobiologischer Prozesse sind, werden von den Termiten als Energiequelle genutzt und zu CO_2 oxidiert (Abbildung 1.8).

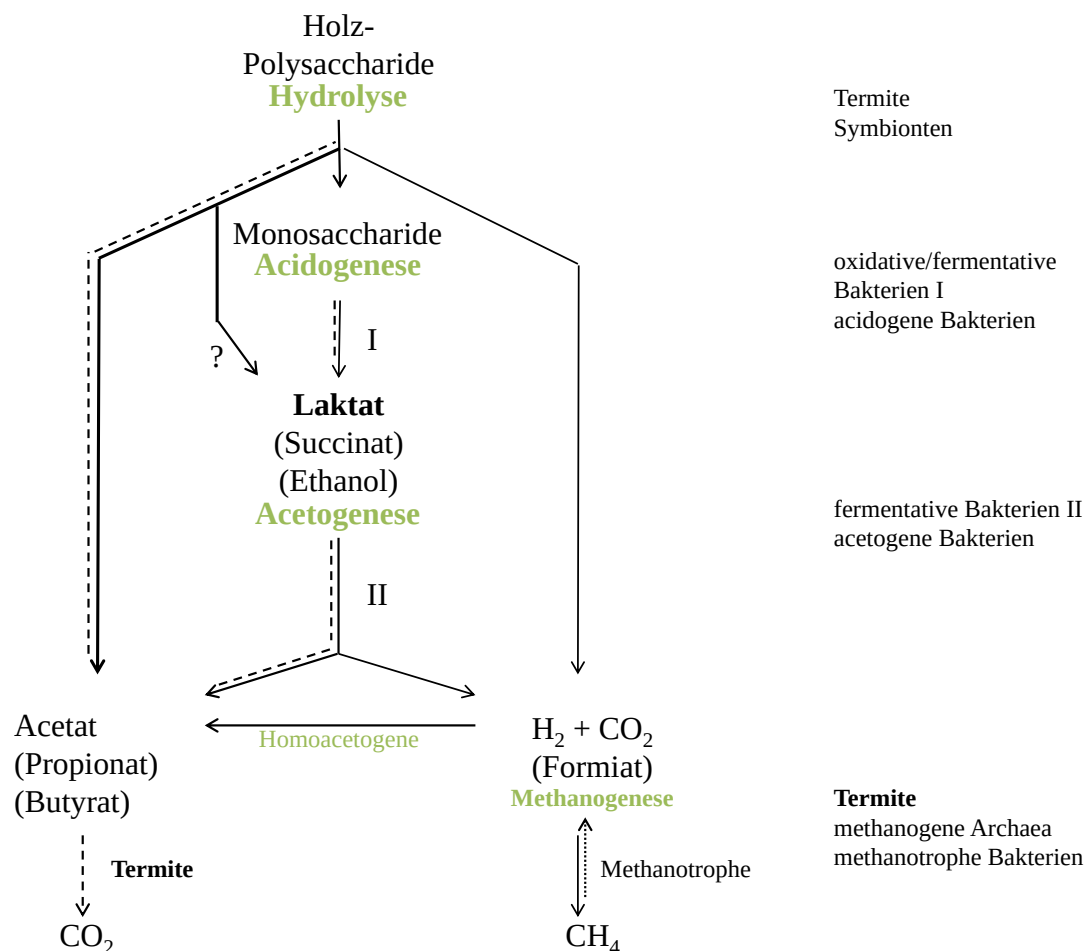


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Abbaus von Holz-Polysacchariden im Hinterdarm niederer Termiten. Die Stärke der Pfeile deutet auf die hauptsächlich stattfindenden Stoffwechselprozesse hin. Getrichelte Linien - - markieren metabolische Aktivitäten, die durch den kontinuierlichen Einstrom von Sauerstoff (O_2) in die Darm-Peripherie stattfindet. Dieser Influx resultiert aus dem steilen O_2 -Gradienten zwischen Darmepithel und Darminhalt. O_2 konnte mittels Microsensor-Analysen zwischen 50 und 200 μm in der Peripherie der Gärkammer nachgewiesen werden. Gepunktete Linien sind noch zu verifizieren. Verändert nach Brune (2009).

Flagellaten

Die in niederen Termiten vorkommenden Flagellaten sind evolutionär gesehen eine der ersten abgezweigten Eukaryoten (König *et al.*, 2013). Alle in Termiten beschriebenen Protozoa gehören den Oxymonadida (Brugerolle & König, 1997), Trichomonadida (Brugerolle *et al.*, 1994) und Hypermastigida an. Die Flagellaten nehmen im Hinterdarm verbleibende Polysaccharide durch Phagocytose auf und hydrolysieren diese durch Cellulasen und Hemicellulasen. Dadurch entsteht Acetat, welches der Termiten zur Verfügung gestellt wird, sowie CO₂ und H₂.

Methanogene Archaea und *Spirochaeta* kommen in Endo- oder Ektosymbiose mit den in Termiten vorkommenden Flagellaten vor.

Pilze und Hefen

Pilze wie *Alternaria alternata*, einige *Aspergillus* Arten und andere filamentöse Pilze konnten aus dem Darm von Termiten isoliert werden (König *et al.*, 2013)

Verschiedene Hefen der Gattung *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Sporothrix* und *Trichosporon* wurden aus den Därmen diverser niederer Termiten isoliert. In *Zootermopsis angusticollis* und *Neotermes castaneus* wurden zwischen 10⁷ und 5 x 10⁸ Hefezellen pro ml Darminhalt gefunden (König *et al.*, 2013).

Von einigen Isolaten wurde eine hydrolytische Aktivität gegenüber Xylan oder Cellulose beschrieben (Schäfer *et al.*, 1996; Wenzel *et al.*, 2002; Handel, 2016).

Bakterien

Die Gesamtzellzahl an Prokaryoten im Termitendarm liegt zwischen 10⁷-10¹¹/ml (Berchtold *et al.*, 1999). Durch molekulare Analysen konnte die mikrobielle Flora im Termitendarm unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit bestimmt werden. Es konnten Proteobakterien, Bacteroidacea, Flavobacteriaceae sowie *Spirochaeta* identifiziert werden. *Spirochaeta* stellen die vorherrschende bakterielle Flora im Hinterdarm dar (König *et al.*, 2013). Die Bakterien sind am Abbau von Cellulose, Hemicellulose, Oligosacchariden und aromatischen Komponenten beteiligt. Außerdem spielen sie eine Rolle in der Nitrifixierung und leisten einen Beitrag zum Redoxstatus.

Homoacetogene Bakterien und *Spirochaeta* (Dröge *et al.*, 2006; Dröge *et al.*, 2008; König & Dröge, 2010), die Acetat aus CO₂ und H₂ produzieren und der Termiten somit Nahrung bereitstellen, sind an der dritten Stufe des Polymerabbaus beteiligt.

Spirochaeta kommen frei lebend, angeheftet an das Darmepithel oder an Protisten vor und stellen damit einen typischen Fall von Ektosymbiose dar (Wenzel *et al.*, 2003; Ohkuma *et al.*, 2006). Obwohl die Methanogenese der Homoacetogenese normalerweise aus thermodynamischen Gründen in Bezug auf H_2 überlegen ist, dominiert die reduktive Acetogenese über die Methanogenese in den meisten holzfressenden Termiten (Liu & Whitman, 2008; Brune, 2014). Im Gegensatz dazu ist es in humusfressenden und pilzzüchtenden Termiten umgekehrt (Brauman *et al.*, 1992; Tholen & Brune 1999; Liu & Whitman, 2008). Obwohl der Mechanismus nicht bekannt ist und auch unter den verschiedenen Termitenarten variieren kann, gibt es verschiedene Theorien, warum die Acetogenese im Gegensatz zur Methanogenese bevorzugt wird. Zum einen wird vorgeschlagen, dass Acetogene in ihrem Metabolismus vielseitiger sind und neben H_2 auch andere organische Substrate nutzen können (Tholen & Brune, 1999). Allerdings bleibt dann zu klären, warum diese Vorteile nicht in anderen Habitaten genutzt werden (Liu & Whitman, 2008). Zum anderen sind die Därme der Termiten hochstrukturiert und durch O_2 - und H_2 -Gradienten sowie den pH-Wert charakterisiert. In höheren Termiten wird H_2 in den anterioren Bereichen des Darms akkumuliert, während die H_2 -Konzentration in den posterioren Bereichen unterhalb des Detektionslevels liegt (Schmitt-Wagner & Brune, 1999). Es ist somit möglich, dass im Termitendarm über das Epithel ein H_2 -Transfer von anterioren Bereichen stattfindet, sodass Mikronischen geschaffen werden, in denen bevorzugt die Acetogenese ablaufen kann (Tholen & Brune, 1999; Liu & Whitman, 2008). Auch ist der H_2 -Partialdruck ausreichend für die Acetogenese.

Sulfatreduzierende Bakterien, die alle der Gattung *Desulfovibrio* zugeordnet werden konnten, könnten unter H_2 -Limitation den Acetogenen und Methanogenen überlegen sein. Bis zu 10^7 lebende Zellen pro ml Gärkammerinhalt wurden in *Mastotermes darwiniensis* und *Reticulitermes santonensis* gezählt (Kuhnigk *et al.*, 1996; König *et al.*, 2006). Durch ihre Befähigung zur Knallgas-Reaktion, bei der O_2 mit H_2 reduziert wird, halten sie das anoxische Milieu im Termitendarm aufrecht. Sie könnten in der Lage sein, einen kompletten Schwefel-Kreislauf durchzuführen und somit einen Beitrag zum Redoxstatus leisten.

Kürzlich wurden methanotrophe Bakterien isoliert, die nahe mit der Gattung *Methylocystis* verwandt sind (Reuß *et al.*, 2015). Ihr Einfluss auf die Methanoxidation im Termitendarm ist noch zu ermitteln.

Archaea

Alle methanogenen Archaea, die im Termitendarm identifiziert werden konnten, gehören den Ordnungen Methanosarcinales, Methanomicrobiales, der kürzlich entdeckten Methanoplasmatales bzw. Methanomassiliicoccales (Paul *et al.*, 2012; Brune, 2014) sowie Methanobacteriales mit der am häufigsten identifizierten Gattung *Methanobrevibacter* (*M'breuibacter*) (*M'* = *Methano*) an (König *et al.*, 2013). Methanogene in niederen Termiten sind meist mit der Gattung *M'breuibacter* der Familie Methanobacteriaceae verwandt. Dagegen gehören methanogene Archaea in höheren Termiten zu der Familie Methanosarcinaceae oder der Ordnung der Methanomicrobiales zusätzlich zu *M'breuibacter* an (Ohkuma *et al.*, 2006). Des Weiteren finden sich in humusfressenden höheren Termiten neben den methanogenen Euryarchaeota bisher nicht kultivierte archaeelle Phyla, die nahe mit ammoniumoxidierenden Thaumarchaeota oder mit Crenarchaeota verwandt sind (Friedrich *et al.*, 2001; Grieco *et al.*, 2013).

Bisher konnten drei verschiedene Arten der Gattung *M'breuibacter* aus der holzfressenden niederen Termiten *Reticulitermes flavipes* in Reinkultur erhalten werden: *M'breuibacter curvatus* RFM-2^T, *M'breuibacter cuticularis* RFM-1^T und *M'breuibacter filiformis* RFM-3^T (Leadbetter & Breznak, 1996; Leadbetter *et al.*, 1998). Drei Stämme, die nahe mit *M'bacterium bryantii* verwandt sind, konnten aus höheren Termiten mit unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten isoliert werden sowie ein Isolat aus einer holzfressenden, höheren Termiten, das mit *M'breuibacter arboriphilus* nahe verwandt ist (Deevong *et al.*, 2004).

Archaea kommen, wenn auch selten, frei lebend in der Gärkammer des Hinterdarms von niederen Termiten vor. Häufiger sind sie an das Darmepithel angeheftet oder kommen in Assoziation mit Flagellaten vor (Leadbetter & Breznak, 1996; Ohkuma *et al.*, 2006; Brune, 2009; Brune, 2014). Dabei kommen sie sowohl in Ecto- als auch in Endosymbiose mit den Flagellaten vor (Ohkuma, 2008). Ebenso wie sulfatreduzierende Bakterien befinden sie sich somit an den belüfteten Bereichen des Darmepithels. Dort herrschen mikroaerophile Bedingungen (Abbildung 1.7) mit einem konstanten Zustrom von Sauerstoff über die Tracheen und das Epithel (Brune *et al.*, 1995; König *et al.*, 2006). Methanogene, Acetogene und Sulfatreduzierer, die den Termitendarm besiedeln, tolerieren und verbrauchen Spuren von O₂ (Leadbetter & Breznak, 1996; Kuhnigh *et al.*, 1996; Karnholz *et al.*, 2002; Christy *et al.*, 2014). *M'breuibacter* Arten zeigen kein Wachstum, wenn Spuren von O₂ im Medium

vorhanden sind. Als dichte Zellsuspensionen bleiben sie jedoch metabolisch aktiv, wenn sie einem kontrollierten Zustrom von O_2 ausgesetzt werden, solange der Zustrom nicht über der Kapazität der O_2 -Entfernung liegt (Tholen *et al.*, 2007; Brune, 2010). Isolate aus der Termit *Reticulitermes flavipes* zeigten eine katalaseähnliche Aktivität, die ihnen dabei hilft, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu entgiften, welches von ihnen oder von Mikroorganismen in der Umgebung durch partielle Reduktion von O_2 gebildet werden könnte (Leadbetter & Breznak, 1996). *M'brevibacter arboriphilus* zeigte bei der Anwesenheit von Hämin im Medium ebenfalls eine hohe Katalase-Aktivität (Brioukhanov & Netrusov, 2012). Die Umsetzung erfolgt höchstwahrscheinlich über die Knallgas-Reaktion und einem vier-Elektronen-Transfer über $F_{420}H_2$ Oxidase (Seedorf *et al.*, 2004; Brioukhanov & Netrusov, 2012). Phylogenetisch ist die $F_{420}H_2$ Oxidase nahe mit FprA von *M'thermobacter marburgensis* Marburg^T verwandt. Das heterolog exprimierte Protein ist ebenfalls eine hoch effiziente Oxidase (Seedorf *et al.*, 2004). Die Sensitivität gegenüber Sauerstoff steigt in der angegebenen Reihenfolge: *Methanosarcina* < *Methanobrevibacter* < *Methanobacterium* << *Methanococcus* (Kiener & Leisinger, 1983; Seedorf *et al.*, 2004).

Die Bakteriendichte im Termitendarm ist höher als die der Archaea und obwohl die Acetogenese der Methanogenese in holzfressenden Termiten überlegen ist, werden beträchtliche Mengen an CH_4 freigesetzt.

1.7 Ziele der Arbeit

Lignocellulose stellt ein kostengünstiges Ausgangsmaterial dar, welches auf der Erde in großen Mengen zur Verfügung steht und im Gegensatz zur Bioethanol-Herstellung der ersten Generation keine Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelherstellung darstellt. Die größte Herausforderung in der Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation besteht darin, Lignocellulose effizient in Zuckermonomere umzusetzen. Die Vorbehandlung der Lignocellulose ist bisher noch recht energieaufwändig und damit kostenintensiv. Der Einsatz von Cellulasen und anderen Enzymen ist ebenfalls teuer. Der konventionelle, industrielle Produktionsprozess beinhaltet die Vorbehandlung, enzymatische Hydrolyse und Fermentation, welche einer ständigen Optimierung unterliegen, um wirtschaftlich Bioethanol der zweiten Generation herzustellen (Saadeddin, 2014). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können auch für die Biogas-Produktion von Vorteil sein. In der Natur stellen holzfressende Termiten durch eine Kombination aus termiteneigenen Enzymen und der Symbiose mit

1. EINLEITUNG

Organismen aus allen drei Domänen des Lebens ein effizientes System zum Abbau von Lignocellulose dar.

Ziel dieser Arbeit ist es zum einen, neuartige Enzymquellen aus holzfressenden Termiten zu finden, um die Hydrolyse von Cellulose effizient durchzuführen, sodass wirtschaftlich Bioethanol aus Stroh produziert werden kann.

Deutschland ist das weltweit führende Land, was die Produktion von Biogas betrifft. Aufgrund der veränderten Subventionspolitik ist der Neubau an Biogasanlagen zurückgegangen. Der Fokus wird nun verstärkt auf die Optimierung der bestehenden Anlagen gelegt. Neben der Nutzung von Biomasse zählen die Umsetzung von Windenergie und die direkte Nutzung solarer Energie zu den am meisten verbreiteten erneuerbaren Technologien (Szuhay *et al.*, 2016). Im Zuge von fehlenden Netzkapazitäten in Deutschland und der schlechten Speicherbarkeit von Elektrizität ist dabei das Power-to-Gas Verfahren in den Fokus gerückt. Dabei soll der Überschussstrom aus Wind- und Solaranlagen dazu genutzt werden, um Elektrolyse zu betreiben. Der dabei entstehende Wasserstoff kann daraufhin mit CO₂ aus Biogasanlagen zusammengebracht werden, um in einem Reaktor Methan zu erzeugen. Daher ist es zum anderen ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Steigerung des Methanertrages in Biogasanlagen durch ein nachgeschaltetes Power-to-Gas Verfahren zu erreichen. Dafür sollten methanogene Archaea aus Termiten und aus einer thermophilen Biogasanlage isoliert sowie auf ihre Methanproduktion überprüft werden, sodass sie in einem Hochleistungs-Methanreaktor eingesetzt werden können.

2. Material und Methoden

Im Folgenden sind zunächst die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Gase sowie Reaktionskits und Geräte aufgeführt. Nicht weiter aufgeführte Laborausstattungen entsprechen den allgemein üblichen Laborstandards.

2.1 Chemikalien und Gase

In den Versuchen wurden Chemikalien, Antibiotika und Gase der folgenden Hersteller verwendet.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % w/v)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agar	Marcor, New Jersey, USA
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	Peqlab, Erlangen
p-Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumeisen(II)-sulfat Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Buttersäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Calciumpantothenat	Merck, Darmstadt
Casamino-säuren	Difco, Würzburg
Carboxymethylcellulose Natriumsalz (CMC, mittelmäßige Viskosität)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cobalt(II)-sulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol, reinst (99 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Folsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA
Isobuttersäure	Merck, Darmstadt
Isovaleriansäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chemikalie	Hersteller
Kalialaun	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. MATERIAL UND METHODE

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Liponsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Mangansulfat Monohydrat	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Natriumformiat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfid Nonahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumwolframat	Merck, Darmstadt
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Nikotinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Methylbuttersäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyridoxinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Resazurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Riboflavin	Merck, Darmstadt
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Marcor, New Jersey, USA
Tween 80	Merck, Darmstadt
Valeriansäure	Roth, Karlsruhe
Vitamin B ₁₂	Roth, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt

Zur Erstellung von Reinkulturen wurden Lösungen der Antibiotika Kanamycinsulfat und Vancomycin-HCl der Firma Roth (Karlsruhe) in einer Konzentration von 100 bzw. 50 mg/ml [w/v] angefertigt. Im Medium wurde eine Endkonzentration von 100

bzw. 50 µg/ml [w/v] erreicht. Die Antibiotikallösungen wurden einzeln oder in Kombination eingesetzt.

Folgende Gase der Firma Westfalen (Münster) wurden bezogen: Formiergas zur Herstellung anaerober Medien (95 % N₂/5 % H₂) [v/v] und das Gemisch Wasserstoff/Kohlenstoffdioxid (80 % H₂/20 % CO₂) [v/v], das zur Erstellung der Gasphase über den Medien verwendet und gegen die Formiergasatmosphäre ausgetauscht wurde.

2.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Im Folgenden werden die verwendeten Biochemikalien, Enzyme und Kits mit Herstellerangabe aufgeführt.

Biochemikalien und Enzyme

Ammoniumpersulfat (APS)

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
(je 10 mM)

Enhancer Solution P (5x)

Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)

Rinderserumalbumin (Fraktion V Albumin)

Oligonukleotide (100 µM)

PCR-Puffer Y mit (20 mM MgCl₂; 10x)

PCR-Wasser

Protein-Größenstandard:

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa

Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)

DNA-Größenstandard: GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)

DNA-Ladepuffer (6x)

Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer

- BsuRI (10 U/µl) mit Puffer R (10x)

- SmaI (10 U/µl) mit Puffer Tango

- XhoI (10 U/µl) mit Puffer Tango

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Kits

DNA-Isolierung:

- DNeasy® Blood and Tissue-Kit

- GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx
PCR-Aufreinigungskit

- USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup

Hersteller

Roth, Karlsruhe

Peqlab, Erlangen

Peqlab, Erlangen

Peqlab, Erlangen

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Steinheim

Peqlab, Erlangen

Roth, Karlsruhe

Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

Peqlab, Erlangen

Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

Thermo Fisher Scientific Waltham, USA

Sigma-Aldrich, Steinheim

Hersteller

Qiagen, Hilden

Roboklon, Berlin

Affymetrix, Santa Clara, USA

2. MATERIAL UND METHODE

- FastDNA Spin Kit for Soil	MP Biomedicals, France
Klonierungskit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.3 Geräte und Hilfsmittel

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Geräte und Hilfsmittel verwendet.

Gerät	Hersteller
Anaerobenzelt (Type B komplett)	Coy Laboratory Products, Michigan, USA
Autoklav: Tecnomara	Tecnomara, Fernwald
Brutschränke:	
- Heraeus (B 6120)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Memmert (GTR 0214)	Memmert, Schwabach
Elektrophoresekammern:	
- Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München
- Sub-Cell® Model 96	Bio-Rad, München
- Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
FPLC-Anlage:	GE Healthcare, München
- FPLC-Detektor Single Path Monitor UV-1	
- FPLC-Fraktionssammler Frac-10	
- FPLC-Mischzelle Flow Cell HR 10	
- FPLC-Pumpen Pump P-500	
- FPLC-Säule Mono S TM HR 5/5	
- FPLC-Säule Superdex TM 75 HR10/30	
Säule	GE Healthcare, München
- Superose 12 10/300 GL	
Gaschromatograph GC 2014	Shimadzu, Duisburg
- Supelco SII 100 / 120 Carbosieve Säule 30 m × 0,25 mm	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Geldokumentationseinheit BioVision CN3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Heizblock HTM 130	HLC BioTech, Bovenden
Heizplatte mit Magnetrührer (RCT S26)	IKA®-Labortechnik, Staufen
Gerät	Hersteller
IEF-Apparatur	Bio-Rad, München
- Rotoforzelle	
- Rotofor Preparative IEF-Cell Mikroskop	
- Fluoreszenzmikroskop Modell BZ-8000 Filter DAPI-B (Ex 360/40; BA 460/50; DM 400)	Keyence, Neu-Isenburg
Phasenkontrastmikroskop: Laborlux11	Leitz, Wetzlar
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Photometer Colorimeter Model 45	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UV-VISIBLE Recording Spectrophotometers UV-	Shimadzu, Kyoto, Japan

240

Pipetten

Eppendorf, Hamburg

Starlab, Hamburg

Reinstwasseranlage:

Merck-Millipore, Darmstadt

- Milli-Q Plus 185

- Millipore RiOS 30

Software (ausgenommen Betriebssoftware von Laborgeräten):

- Bio1D

Vilber Lourmat, Eberhardzell

- BLAST

Altschul *et al.*, 1990

- UCSF Chimera V1.9

www.cgl.ucsf.edu/chimera (Stand 22.07.2016)

- DECIPHER's Find Chimeras

<http://decipher.cce.wisc.edu/FindChimeras.html> (Stand 22.07.2016)

- ExPASy ProtParam tool

<http://web.expasy.org/protparam/> (Stand 22.07.2016)

- EzTaxon Server 2.1

Chun *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012
<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> (Stand 22.07.2016)

- FinchTV Version 1.4.0

Geospiza Inc, Seattle, USA

- Microsoft Office 2010

Microsoft, Redmond, USA

- ReversComplement

http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (Stand 22.07.2016)

Spannungsgerät: Power Source 300 V

VWR, Darmstadt

Spritze mit Absperrventil, 10 ml

Hamilton, Reno, NV, USA

Silikon-Septum für Gewindeflaschen N 9 mit PTFE

Macherey-Nagel, Düren

Thermocycler

- S1000TM Thermal Cycler (PCR)

Bio-Rad, München

- Mastercycler gradient

Eppendorf, Hamburg

Vakuum-Exsikkator Trivac D 4B

Leybold Vacuum, Köln

Vortex-Gerät: Vortex-Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Gerät

Hersteller

Waagen

- Laboratory L610

Sartorius, Göttingen

- Analytic A120S

Sartorius, Göttingen

Wasserbad GFL

GFL, Burgwedel

Zentrifugen

- Micro Star 17

VWR, Darmstadt

- Sigma 2-16K

Sigma, Osterode

2.4 Verbrauchsmaterialien

Bei der Durchführung der Versuche wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet.

2. MATERIAL UND METHODE

Verbrauchsmaterial

Hersteller

Deckgläser:

- 18 x 18 mm

- 24 x 60 mm

Dialyseschläuche (Porengröße 3,5 kDa)

Filter (alle: 0,2 µm Porengröße)

Glasgefäße

Glasgeräte zur anaeroben Kultivierung:

- Bormioli-Injektionsflaschen (100 ml) mit Butylsepten und Aluminium-Bördelkappen

- Hungate-Röhrchen: Kulturröhrchen, 12,5 cm mit Lochkappe und Butylsepten

- Transfusionsflaschen mit Naturgummi-Septen und Aluminiumschraubkappe mit Loch

Kanülen: BD Microlance™ 3 (verschiedene Durchmesser)

Objektträger (76 x 26 cm)

Petrischalen aus Polystyrol

Pipettenspitzen :

- TipOne: 10 µl, 200 µl und 1250 µl

- 5 ml

- 10 ml

Reaktionsgefäße:

- PCR-Tubes (0,2 ml)

- Safe-Lock Tubes (1,5 ml)

- Safe-Lock Tubes (2,0 ml)

Vivaspin 20, 5 kDa

Menzel, Braunschweig

Roth, Karlsruhe

Zellutrans, Roth

VWR, Darmstadt

Schott, Mainz

Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lengeln

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Menzel, Braunschweig

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Starlab, Hamburg

Starlab, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Sartorius, Göttingen

2.5 Untersuchte Biogasanlage (BGA)

Für die Isolierung von methanogenen Archaea wurde eine thermophile Biogasanlage (BGA Butschen) in Viersen (Nordrhein-Westfalen) beprobt. Die Anlagenparameter sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Anlagenparameter der Biogasanlage (BGA Butschen) in Viersen.

Anlagenparameter	BGA Butschen, Viersen
Fermenter	NOVA-Fermenter
Rührung	Flüssigpumpe
V _{brutto} [m ³]	3 x 115
Hydrolyse	Hydrolyserohr
Feste Inputstoffe	Maissilage (56 % Frischmasse (FM)) Gerste (Ganzpflanzensilage) (6 % FM) Rindermist (6 % FM)
Flüssige Inputstoffe	Schweinegülle (32 % FM)
Leistung	150 P _{el} [kW]

Temperatur	54 °C
pH-Wert	7,8
Methangehalt	52-53 %
Verweilzeit	28 Tage

Von der thermophilen Biogasanlage wurden Substratproben entnommen und für weitere Untersuchungen bei -18 °C eingefroren.

2.6 Präparation von Termitendärmen zur Isolierung methanogener Archaea

Neben Fermentersubstrat (Abschnitt 2.5 und 2.8.2 sowie 2.8.3) wurden zur Anreicherung methanogener Archaea die Därme von *Mastotermes darwiniensis* (*M. darwiniensis*) und *Incisitermes marginipennis* (*I. marginipennis*) verwendet. Beide Termitenarten wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM, Berlin) zur Verfügung gestellt. *I. marginipennis* wurde bis zur Präparation in Glasgefäßen auf Pappelholz bei 30 °C gehalten. Die Därme von *M. darwiniensis* wurden direkt präpariert. Zur Präparation der Termitendärme wurden die Termiten dekapitiert und in 70%igem Ethanol gewaschen. Für die Isolierung von methanogenen Archaea aus dem Termitendarm fand die Präparation der Termitendärme in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) unter Formiergusatmosphäre (95 % N₂/5 % H₂) [v/v] statt. Mit Hilfe steriler Pinzetten wurde der Darm unter sterilen Bedingungen posterior aus dem Abdomen gezogen. Ein oder zwei Därme wurden im Anschluss direkt in 20 ml Hungate-Röhrchen mit 5 ml Nährmedium aufgenommen (siehe Abschnitt 2.8.2).

Für die Diversitätsanalyse aus *M. darwiniensis* wurden je 200 mg Material im „GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx“ (Roboklon, Berlin) eingesetzt (Abschnitt 2.10.1), das aus 72 Därmen von Arbeitern sowie aus Darminhalt von 150 Soldaten stammte. Aus Arbeitern und Soldaten von *I. marginipennis* wurde je ein Darm entnommen, gemörsert und ebenfalls in dem Kit eingesetzt.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

Für die Isolierung und Charakterisierung einer Cellulase fanden eine Reihe biochemischer Methoden Verwendung.

2.7.1 Azo-Carboxymethyl-Cellulose-Test (Azo-CMC-Test)

Der Azo-Carboxymethyl-Cellulose-Test (Azo-CMC-Test) ist spezifisch für eine β -1,4-D-Glucanase- Aktivität (Endocellulase). Das Polysaccharid ist mit Remazolbrillant

2. MATERIAL UND METHODE

Blau R (RBB) gefärbt. Dabei entfällt auf etwa jeden zwanzigsten Zuckerrest ein Farbstoffmolekül.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (S-ACMC, Megazyme, Wicklow). Je 0,5 ml Enzymlösung wurden mit 0,5 ml Substratlösung (CMC) versetzt, gemischt und 10 min bei 40 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 ml Stopplösung unterbrochen.

Bei Inkubation der gefärbten CMC mit Cellulase wird das Substrat depolymerisiert, sodass niedermolekulare gefärbte Fragmente entstehen. Diese Fragmente bleiben nach Zugabe der Stopplösung in Lösung. Hochmolekulare Stoffe werden durch Zentrifugation entfernt und die Farbintensität des Überstandes photometrisch bei 590 nm bestimmt. Der Farbstoff ermöglicht somit einen indirekten Rückschluss auf abgespaltene Oligosaccharide zur Quantifizierung des Celluloseabbaus.

Universalpuffer

TRIS	13,0 g/l
Maleinsäure	11,6 g/l
Citronensäure	14,0 g/l
Borsäure	6,3 g/l

Die neu isolierte Cellulase wurde jeweils 1:10 in Universalpuffer verdünnt. Für die Bestimmung der pH-Aktivität des Enzyms wurde die Substratlösung auf pH-Werte zwischen 2 und 5,5 eingestellt. Ebenso wurde das Enzym zuvor in Universalpuffer mit entsprechendem pH-Wert verdünnt. Zur Ermittlung des Temperatur-Aktivitätsbereiches wurde der Azo-CMC-Test bei Temperaturen zwischen 30 und 90 °C durchgeführt. Die Bestimmung der pH-Stabilität und der Endprodukthemmung durch Cellobiose wurde unter optimalen Bedingungen bei einem pH-Wert zwischen 4 und 4,5 und bei 60 °C durchgeführt. Die spezifische Aktivität ist wie folgt definiert:

$$1 \text{ spezifische RBB-Unit [U]} = \frac{1 \mu\text{M Remazolbrilliantblau R}}{1 \mu\text{g Enzym} \times 1 \text{ min}}$$

2.7.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Um den Proteingehalt zu ermitteln, wurde das photometrische Verfahren nach Warburg und Christian (1941) angewendet. Die Extinktion wird bei 280 und 260 nm photometrisch bestimmt. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten mit einem Fassungsvermögen von 100 µl und einer Schichtdicke von 1 cm mit Hilfe des UV-VISIBLE Recording Spectrophotometers UV-240 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.7.3 Ammoniumsulfatfällung

Zur Aufkonzentrierung der Proteinlösung wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde zunächst filtriert (0,2 µm) und der pH-Wert mit NaOH neutralisiert. Unter Rühren im Eisbad wurde dem Kulturüberstand fein gemörsertes Ammoniumsulfat zugesetzt (559 g/l). Die vollständige Fällung erfolgte bei 4 °C über Nacht. Proteinniederschläge wurden abzentrifugiert (8000 x g) und in sterilem MilliQ-Wasser (1/10 des Ausgangsvolumens) aufgenommen.

2.7.4 Dialyse

Um die nach Ammoniumsulfatfällung erhaltene Enzymlösung in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) einsetzen zu können, mussten zunächst die in dieser Lösung vorhandenen Salze entfernt werden. Eine Absenkung der Leitfähigkeit wurde durch eine zweimalige Dialyse gegen entionisiertes Wasser (eH₂O) und MilliQ-Wasser erreicht. Das verwendete eH₂O bzw. MilliQ-Wasser wurde zwei Mal täglich gewechselt und die Dialyse erfolgte über 72 h bei 4 °C und unter langsamem Rühren. Die verwendeten Dialyseschläuche hatten eine Porengröße von 3,5 kDa (Zellutrans, Roth).

2.7.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) stellt ein elektrophoretisches Verfahren dar, bei dem ein Protein in einem elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten wandert bis es an dem pH-Wert angelangt ist, an dem seine Nettoladung Null beträgt (Lottspeich, 2006). Dies entspricht seinem isoelektrischen Punkt, an welchem die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäureseitengruppen gleich ist.

Bei der durchgeführten präparativen IEF wurde mittels einer Ampholytlösung (Typ Servalyt 2-9 Seed Mix, Serva Electrophoresis, Heidelberg) in einem elektrischen Feld ein pH-Gradient zwischen Anode (0,1 M H₃PO₄, niedriger pH-Wert) und Kathode (0,1 M NaOH, hoher pH-Wert) aufgebaut, an dem sich die Proteine entlangbewegten. 1 ml der Ampholytlösung wurde mit 50 ml dialysierter Proteinlösung und 9 ml MilliQ-Wasser versetzt. Die entstandene Lösung wurde luftblasenfrei in eine Rotoforzelle (Bio-Rad, München) überführt und die 20 Kammern der Zelle wurden versiegelt. Im Anschluss wurde ein elektrisches Feld für 4,5 h mit einer Spannung von 2000 V und einer Leistung von 15 W aufgebaut (Rotofor Preparative IEF-Cell, Bio-Rad,

2. MATERIAL UND METHODE

München). Gelangt ein Protein in den pH-Bereich seines isoelektrischen Punktes, verliert es seine elektrophoretische Beweglichkeit und reichert sich dort an (Fokussierung). Aus den 20 erhaltenen Fraktionen wurden solche mit eindeutig nachgewiesener Cellulase-Aktivität vereint und mittels Zentrifugationsfiltration (Vivaspin 20, 5 kDa, Sartorius, Göttingen) 10-fach aufkonzentriert und mit 0,05 M Ammoniumacetatpuffer umgepuffert.

2.7.6 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die FPLC stellt eine Form der Flüssigkeitschromatographie dar, die zur Trennung und Aufreinigung von Proteinen aus komplexen Gemischen eingesetzt wird. Flüssigkeitschromatographie bezeichnet dabei alle chromatographischen Methoden mit einer flüssigen mobilen Phase. In Abhängigkeit der gewünschten Separations- oder Aufreinigungsmethode der Proteine werden Säulen mit verschiedenen stationären Phasen bei der FPLC eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Superose 12 10/300 GL Säule der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Es handelt sich dabei um eine Säule für die Gelchromatographie, welche gelöste Moleküle nach Größe und Form basierend auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße trennt. Zur Elution der Cellulase diente Ammoniumacetat-Puffer (0,05 M, pH 5). Es wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min und ein Papiervorschub des Schreibers von 0,5 cm/min gewählt. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 0,5 ml. Fraktionen mit signifikanter Cellulaseaktivität wurden auf ihren Proteingehalt (Abschnitt 2.7.2) und ihre Reinheit (Abschnitt 2.7.7) überprüft.

2.7.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (Abkürzung für engl. **S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis) stellt eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld dar.

Neben den denaturierenden Eigenschaften von SDS-Molekülen überdecken diese des Weiteren die Eigenladung des Proteins, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im Gel lediglich von der Molekülmasse abhängig ist.

Zur Proteintrennung wird wegen der hohen Auflösung ein SDS-haltiges, diskontinuierliches TRIS-HCl/TRIS-Glycin-Puffersystem verwendet (Laemmli, 1970). Zum Größenvergleich werden Standards mitgeführt, die Proteine bekannter Masse

enthalten. Im vorliegenden Fall wurde der Proteinmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa der Firma Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) verwendet.

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Die Herstellung von denaturierenden Polyacrylamid-Gelen kann der Tabelle 2.3 entnommen werden.

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Puffer	Zusammensetzung
50%ige Glycerin-Lösung	500 g/l Glycerin
10%ige SDS-Lösung	100 g/l SDS
Sammelgelpuffer (1 M TRIS/HCl) (pH 6,8)	121,14 g/l TRIS
Trenngelpuffer (1 M TRIS/HCl) (pH 8,8)	121,14 g/l TRIS
Probenpuffer	300 µl eH ₂ O, 300 µl 10%ige SDS-Lösung, 125 µl 1M TRIS/HCl (pH 6,8), 200 µl 50%ige Glycerin-Lösung, 50 µl β-Mercaptoethanol (Absolutwerte)
Laemmli-Puffer (10x) (pH 8,8)	3,0 g/l TRIS, 14,4g/l Glycin, 10,0 ml/l 10%ige SDS-Lösung

Tabelle 2.3: Herstellung eines Polyacrylamid-Gels mit Trenn- und Sammelgel.

Komponente	Trenngel (20 %)	Sammelgel (4 %)
eH ₂ O	900,00 µl	3,7 ml
Sammelgelpuffer (1M TRIS/HCl) (pH 6,8)		625,0 µl
Trenngelpuffer (1M TRIS/HCl) (pH 8,8)	4,52 ml	
40%ige Acrylamid-Lösung	6,00 ml	625,0 µl
10%ige SDS-Lösung	120,00 µl	50,0 µl
TEMED	10,00 µl	5,0 µl
APS	96,00 µl	50,0 µl

Zu je 5 µl Probenpuffer wurden 15 µl der jeweiligen Probe zugegeben. Im Anschluss wurden diese 3 min bei 99 °C erhitzt. 5 µl des Standards PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) und 10 bis 20 µl der jeweiligen Probe wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde bis zur angegebenen Markierung mit Laemmli-Puffer befüllt und an die Spannungsquelle angeschlossen. Der Lauf wurde bei 80 V gestartet und solange durchgeführt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Danach erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf 150 V und ein Fortsetzen des Laufs für weitere 1,5 Stunden.

2.7.8 Fixierung und Färbung der SDS-Gele

Um die im SDS-Gel enthaltenen Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese fixiert und mittels kolloidaler Coomassie-Färbung Roti®-Blue der Firma Roth (Karlsruhe) sichtbar gemacht. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben nach dem Protokoll „Färbung mit Fixierung“.

2.7.9 Identifizierung des neu isolierten Enzyms

Die Identifizierung des Proteins erfolgte durch [REDACTED] am Institut für Immunologie in Mainz durch Verwendung der Liquid Chromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Methode. Dabei wird eine Kapillar-HPLC mit einem Tandem Quadrupole-Time-of-Flight (Q-TOF) Massenspektrometer (Synapt G2-S-Massenspektrometer, Waters) kombiniert.

Das erhaltene Spektrum und die daraus gewonnenen Sequenzinformationen konnten über das Metagenom, das von dem Kooperationspartner SeqLab – Sequence Laboratories Goettingen GmbH generiert wurde, zur Identifizierung genutzt und mit der Datenbank GenBank Nucleotide collection verglichen werden.

2.7.10 3D-Homologiemodellierung des neu isolierten Enzyms

Das 3D-Homologiemodell wurde durch [REDACTED] am Institut für Molekulare Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mittels des Programms Modeller (V9.16) erstellt. Für die Modellierung des 3D-Homologiemodells diente die 5D8Z Struktur aus der Proteindatenbank (PDB), einer β -1,4-Endoglucanase aus *Ganoderma lucidum* (Liu *et al.*, 2016), als Vorlage. Diese weist die höchste Sequenzähnlichkeit zu der isolierten Cellulase auf. Zudem ist Cellobiose als mitkristallisiertes Substrat enthalten. Es wurden 50 Modelle errechnet und das beste Modell anhand der niedrigsten Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) ausgewählt. DOPE ist ein statistisches Potential, das über eine Auswahl an nativen Proteinen berechnet wurde (Shen & Sali, 2006), sodass Aussagen über den nativen Faltungszustand der Modelle getroffen werden können. Die Struktur der 3D-Homologiemodelle wurde mit dem Programm UCSF Chimera untersucht.

2.8 Mikrobiologische Methoden

Im Folgenden werden die mikrobiologischen Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, beschrieben.

2.8.1 Organismen

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Archaea wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in denen von der DSMZ (DSMZ, 2017) empfohlenen Medien oder in modifiziertem DSM 287 Medium (DSM 278 mod.) sofern ein Wachstum der Organismen in diesem Medium möglich war. Das Überimpfvolumen der Organismen betrug jeweils 10 % [v/v]. Parallele Ansätze wurden aus derselben Vorkultur hergestellt.

Die in Tabelle 2.5 aufgeführten Bakterien- und Hefestämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW, Mainz) entnommen. Es handelt sich um Mikroorganismen, die bis auf Stamm 12749 aus verschiedenen höheren und niederen Termiten isoliert wurden. Die Stammbezeichnung erfolgte teils in Anlehnung an die Termiten, aus der das Isolat erhalten wurde (OO für *Odontotermes obesus*, MD für *Mastotermes darwiniensis*).

Tabelle 2.4: Archaeelle Referenzstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Organismus	DSM-Nummer	DSMZ-Medium	Temperatur [°C]	Morphologie	Methanogenese
<i>Methanobacterium formicicum</i> MF ^T	1535	119	37	Stäbchen	H
<i>Methanobacterium thermaggregans</i> ^T	3266	119	65	Stäbchen	H
<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	2373	141	55	Kokken	H
<i>Methanothermobacter crinale</i> Tm2 ^T	24598	119	65	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter defluvii</i> ADZ ^T	7466	141	60	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter marburgensis</i> Marburg ^T	2133	287	65	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter tenebrarum</i> RMAST ^T	23052	119	70	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H ^T	1053	119	65	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter thermoflexus</i> IDZ ^T	7268	141	55	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter thermophilus</i> M ^T	6529	119	60	Stäbchen	H
<i>Methanothermobacter wolfeii</i> ^T	2970	119	60	Stäbchen	H
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> SN-1 ^T	2095	141	65	Kokken	H
<i>Methanothermus fervidus</i> V24 S ^T	2088	203	83	Stäbchen	H

T = Typstamm, H = hydrogenotroph

Tabelle 2.5: Bakterien- und Hefestämme.

Bakterium/Hefe	Art	Stamm	Quelle	Medium
Hefe	<i>Saitozyma flava</i>	OO2	<i>Odontotermus obesus</i> **	Vogels-Minimalsalz
Hefe	<i>Papiliotrema odontotermidis</i>	OO5	<i>Odontotermus obesus</i> **	Vogels-Minimalsalz
Hefe	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	MD123	<i>Mastotermes darwiniensis</i> *	Vogels-Minimalsalz
Hefe	<i>Saccharomyces arboricolus</i>	12749	Fruchtkörper von <i>Auricularia polytricha</i>	Vogels-Minimalsalz
Bakterium	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ266a	<i>Zootermopsis angusticollis</i> *	CYM-Medium
Bakterium	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ282e	<i>Zootermopsis angusticollis</i> *	CYM-Medium

* = niedere Termiten

** = höhere Termiten

2.8.2 Nährmedien zur Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen

Für die Herstellung anaerober Medien (Tabelle 2.6) wurden die Medienbestandteile zunächst bis auf die reduzierenden Agenzien Cystein-HCl und $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ sowie Aminosäure- und Vitaminlösung zusammengeführt und in eH_2O gelöst. Nachdem das Medium im Vakuum-Exsikkator für 30 min entgast wurde, erfolgte die Einstellung des jeweiligen pH-Wertes. In einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) unter Formiergasatmosphäre (95 % N_2 /5 % H_2) [v/v] erfolgte die Zugabe der reduzierenden Agenzien mit Ausnahme von DSM 311a und 734. Der standardmäßig allen anaeroben Medien in einer Endkonzentration von 1 mg/l zugegebene pH- und Redoxindikator Resazurin reagiert auf die Zugabe dieser Agenzien mit einem Farbumschlag von blau ins Farblose. Der Farbumschlag beruht auf einer zweistufigen Reaktion, bei der das dunkelblaue Resazurin zunächst irreversibel unter Abspaltung eines Sauerstoffatoms zum rosafarbenen Resorufin reduziert wird. Bei weiterer Reduzierung geht Resorufin in die farblose Leukoform Dihydroresorufin über (Twigg, 1945). Aufgrund der Tatsache, dass letztgenannte Reaktion reversibel ist, kann ein nachträglicher Sauerstoffeintrag in das Medium indirekt durch die bewirkte Änderung des Redoxpotentials anhand des Farbumschlags identifiziert werden. Die Kultivierung der strikt anaeroben Archaea konnte somit gewährleistet werden. Nach ausreichender Reduzierung des Nährmediums wurde dieses in Kulturgefäße aliquotiert. In der Regel erfolgte die Kultivierung zu 20 ml in 100 ml Bormioli-Injektionsflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern), die mit Butylsepten und Aluminium-Bördelkappen gasdicht verschlossen wurden. Zur Anreicherung von Organismen wurden 20 ml Hungate-Röhrchen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern) mit 5 ml Nährmedium verwendet, welche mit Butylsepten und Schraubverschlüssen versehen wurden. Die Formiergasatmosphäre wurde über sterile Gasfiltereinheiten und Kanülen durch H_2/CO_2 (80 % H_2 / 20 % CO_2) (Bormioli-Injektionsflaschen 2,0 bar; Hungate-Röhrchen 1,5 bar) ersetzt und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die sterilfiltrierte Aminosäure- und Vitaminlösung (Tabelle 2.7) wurde den anaeroben Medien im Anschluss zugegeben. Die Aminosäurelösung lag in den Medien in einer Endkonzentration von 1:1000 [v/v] verdünnt vor.

Die Medien DSM 311a und 734 wurden nach dem Autoklavieren mit Dithiothreitol reduziert.

Tabelle 2.6: Nährmedien zur Kultivierung methanogener Archaea.

Substanz	DSMZ 119	DSMZ 141	DSMZ 203	DSMZ 287 mod.	DSMZ 311a	DSMZ 734
K ₂ HPO ₄	-	0,14 g	-	0,30 g	0,35 g	-
KH ₂ PO ₄	0,50 g	-	-	0,30 g	0,23 g	0,20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	0,30 g	-	-
NaCl	0,40 g	18,00 g	-	0,50 g	2,25 g	1,00 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g	0,14 g	-	0,10 g	0,25 g	0,10 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,40 g	3,45 g	-	0,15 g	0,50 g	-
NH ₄ Cl	0,40 g	0,25 g	-	2,00 g	0,50 g	0,30 g
Natriumacetat	1,00 g	1,00 g	-	2,00 g	-	-
Natriumformiat	2,00 g	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	4,00 g	5,00 g	2,00 mg	4,00 g	4,00 g	5,80 g
Ni(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	-	-	2,00 mg	-	-	-
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 mg	-	2,00 mg	-	2,00 mg	-
Hefeextrakt	1,00 g	2,00 g	2,00 g	-	2,00 g	0,50 g
Trypton	-	2,00 g	2,00 g	-	-	-
Casaminosäuren	-	-	-	-	2,00 g	0,50 g
Na ₂ SO ₄	-	-	3,40 g	-	-	0,15 g
KCL	-	0,34 g	-	-	-	0,50 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	-	4,00 g	-	-	-	0,40 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 7 H ₂ O	-	2,00 mg	-	-	-	-
Cystein-HCl x H ₂ O	0,50 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	-	-
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,50 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	-	-
Dithiothreitol	-	-	-	-	0,15 g	0,16 g
Vitaminlösung (DSMZ 503)	-	-	-	-	-	1,00 ml
Vitaminlösung (DSMZ 141)	-	10,00 ml	10,00 ml	5,00 ml	-	-
Spurenelementlösung (DSMZ 141)	-	10,00 ml	10,00 ml	5,00 ml	10,00 ml	-
Minerallösung 1 (DSMZ 203)	-	-	-	37,50 ml	-	-
Minerallösung 2 (DSMZ 203)	-	-	-	37,50 ml	-	-
Spurenelementlösung SL 10 (DSMZ 320)	1,00 ml	-	-	-	1,00 ml	1,00 ml
Selenit-Wolfram-Lösung (DSMZ 385)	-	-	-	-	1,00 ml	1,00 ml
Fettsäuremischung	20,00 ml	-	-	-	-	-
pH-Wert	6,8-7,0	7,0	6,5	6,8	7,0	7,2

Die Angaben beziehen sich auf einen Liter.

Allen Medien wurde 1,00 mg Resazurin zugefügt und die Formiergasatmosphäre durch 80 % H₂/ 20 % CO₂) (2 bar) ersetzt.

Nachfolgend können die Lösungen und die Fettsäuremischung für die Herstellung diverser anaerober Nährmedien (Tabelle 2.6) entnommen werden (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Lösungen und Fettsäuremischung für die Herstellung von Nährmedien zur Kultivierung methanogener Archaea.

Name	Verwendet für Medium	Substanz
Aminosäurelösung	anaerobe DSMZ-Medien (Tabelle 2.6)	1,115 g/l L-Arginin-HCl, 1,875 g/l DL-Asparagin, 0,755 g/l L-Cystein, 0,915 g/l L-Glutamat, 0,915 g/l L-Glutamin, 1,01 g/l L-Histidin-HCl, 0,82 g/l L-Leucin, 1,14 g/l L-Lysin-HCl, 0,93 g/l L-Methionin, 0,82 g/l L-Isoleucin, 1,03 g/l L-Phenylalanin, 0,72 g/l L-Prolin, 0,655 g/l L-Serin, 1,5 g/l DL-Threonin, 1,28 g/l L-Tryptophan, 1,18 g/l L-Tyrosin, 1,46 g/l L-Valin
Fettsäuremischung	DSMZ 119	0,50 g Valeriansäure, 0,50 g Isovaleriansäure, 0,50 g 2-Methylbutylsäure, 0,50 g Isobuttersäure, 20,00 ml eH ₂ O
Minerallösung 1	DSMZ 203	6,00 g/l K ₂ HPO ₄
Minerallösung 2	DSMZ 203	6,00 g/l K ₂ HPO ₄ , 6,00 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 12,00 g/l NaCl, 2,40 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 1,60 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O
Selenit-Wolfram-Lösung	DSMZ 311a DSMZ 734	0,5 g/l NaOH, 3,0 mg/l Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O, 4,0 mg/l Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O
Spurenelementlösung	DSMZ 141	1,50 g/l Nitrilotriessigsäure, 3,00 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,50 g/l MnSO ₄ x H ₂ O, 1,00 g/l NaCl, 0,10 g/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,18 g/l CoSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,10 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 0,18 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,01 g/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0,02 g/l KAl(SO ₄) x 12 H ₂ O, 0,01 g/l H ₃ BO ₃ , 0,01 g/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, 0,03 g/l NiCl ₂ x 6 H ₂ O, 3,00 mg/l Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O

Fortsetzung Tabelle 2.7:

Name	Verwendet für Medium	Substanz
Spurenelementlösung SL 10	DSMZ 320	10,00 ml/l HCl (25 %, 7,7 M), 100,00 mg/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 1,50 g/l $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 190,00 mg/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 70,00 mg/l ZnCl_2 , 2,00 mg/l $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 6,00 mg/l H_3BO_3 , 36,00 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 24,00 mg/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
Vitaminlösung	DSMZ 141	2,00 mg/l Biotin, 2,00 mg/l Folsäure, 10,00 mg/l Pyridoxin-HCl, 5,00 mg/l Thiamin-HCl $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 5,00 mg/l Riboflavin, 5,00 mg/l Nicotinsäure, 5,00 mg/l DL-Calcium-Panthothenat, 0,10 mg/l Vitamin B_{12} , 5,00 mg/l p-Aminobenzoessäure, 5,00 mg/l Liponsäure
Vitaminlösung	DSMZ 503	20,00 mg/l Biotin, 200,00 mg/l Thiamin-HCl $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 200,00 mg/l Nicotinsäure, 100,00 mg/l DL-Calcium-Panthothenat, 100,00 mg/l Vitamin B_{12} , 80,00 mg/l p-Aminobenzoessäure, 300,00 mg/l Pyridoxinhydrochlorid

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf einen Liter. Für die Aminosäure-, Spurenelement- und Vitaminlösungen wurde MilliQ-Wasser ($R = 18,2 \text{ m}\Omega$) verwendet.

Für die Überprüfung einer gesteigerten Methanproduktion wurde Medium 287 mod. mit zusätzlich 20 % [v/v] Reaktorfiltrat oder Fermenterinhalt hergestellt. Zur Herstellung des Reaktorfiltrats (Rf) wurde Fermenterinhalt (Fi) aus der mesophilen Praxisbiogasanlagen Neumann in Wallhalben (Ahlert, 2015) entnommen. Dieser wurde zuvor tyndallisiert und durch niedertourige Zentrifugation von groben Pflanzenbestandteilen der Maissilage befreit. Anschließend wurde der viskose Überstand mit einer Vakuumpumpe durch einen Sterilfilter (0,2 µm) filtriert. Das entstandene Reaktorfiltrat konnte daraufhin direkt dem Medium zugegeben oder bei 4 °C gelagert werden.

Im Folgenden sind die Nährmedien für die Kultivierung von Hefen und Bakterien angegeben (Tabelle 2.8) sowie Lösungen zur Herstellung des Vogels-Minimalsalzmediums (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.8: Nährmedien zur Kultivierung von Hefen und Bakterien.

Medium	Zusammensetzung
DSMZ 381 (LB-Medium)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 50 µg Kanamycin, 40 µg X-Gal
CYM	5,0 g/l CMC, 0,5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,5 g/l KCl, 1,0 g/l K ₂ HPO ₄ , 1,0 g/l NaNO ₃
Vogels-Minimalsalzmedium	20 ml/l Vogels-Salzlösung 50 x, 1 g/l Tween 80, 100 ml/l YNB-Lösung 10 x, 10 g/l CMC (mittelmäßige Viskosität)

Tabelle 2.9: Lösungen für die Herstellung des Vogels-Minimalsalzmediums.

Name	Verwendet für Medium	Substanz
Vogels-Salzlösung 50 x	Vogels-Minimalsalzmedium	125 g/l Tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O, 250 g/l KH ₂ PO ₄ , 100 g/l NH ₄ NO ₃ , 10 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 5 g/l CaCl ₂
YNB-Lösung	Vogels-Minimalsalzmedium	67 g/l Yeast Nitrogen Base

2.8.3 Anreicherung und Isolierung von methanogenen Archaea

Methanogene Archaea wurden zum einen aus der thermophilen BGA Butschen in Viersen (Abschnitt 2.5) und zum anderen aus den niederen Termiten *Incisitermes marginipennis* und *Mastotermes darwiniensis* (Abschnitt 2.6) isoliert.

Für die Isolierung methanogener Archaea aus der thermophilen BGA Butschen (Viersen) wurden zunächst Anreicherungskulturen im Medium 287 mod. hergestellt. Dafür wurden 250 mg bis 500 mg Fermentersubstrat (Flüssigkeit mit Pflanzenresten)

2. MATERIAL UND METHODE

der BGA Butschen zu 5 ml Nährmedium gegeben. Die Kulturen wurden als Standkultur bei 55 °C inkubiert. Die Methanproduktion wurde gaschromatographisch (Abschnitt 2.9) überprüft. Nach erfolgreicher Anreicherung wurde die Tiefagar-Verdünnungsmethode (Abbildung 2.1) zur Gewinnung von Reinkulturen angewendet. Erhaltene einzelne Kolonien wurden in Flüssigmedium übertragen. Des Weiteren wurde den flüssigen Medien eine Antibiotikallösung zugesetzt, um die bakterielle Begleitflora zu beseitigen. Die gewonnenen Isolate wurden mehrfach in neues Medium mit Zusatz von Antibiotika übertragen. Die Reinheit wurde molekularbiologisch überprüft (Abschnitt 2.10).

Um methanogene Archaea aus Termiten zu erhalten, wurden ebenfalls Anreicherungskulturen mittels der Medien DSMZ 311a und 734 hergestellt. Dazu wurden ein oder zwei präparierte Därme aus jeweils einer Termitenart zu 5 ml Nährmedium gegeben (Abschnitt 2.6). Die Kulturen wurden als Standkultur bei 30 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Anreicherung durch Überprüfung der Methanproduktion mittels Gaschromatographie wurde ebenfalls die Tiefagar-Verdünnungsmethode angewendet, um Reinkulturen zu erhalten. Die weitere Vorgehensweise ist mit der von der Isolierung methanogener Archaea aus der thermophilen BGA identisch. Auch in diesem Fall wurden Antibiotikallösungen eingesetzt.

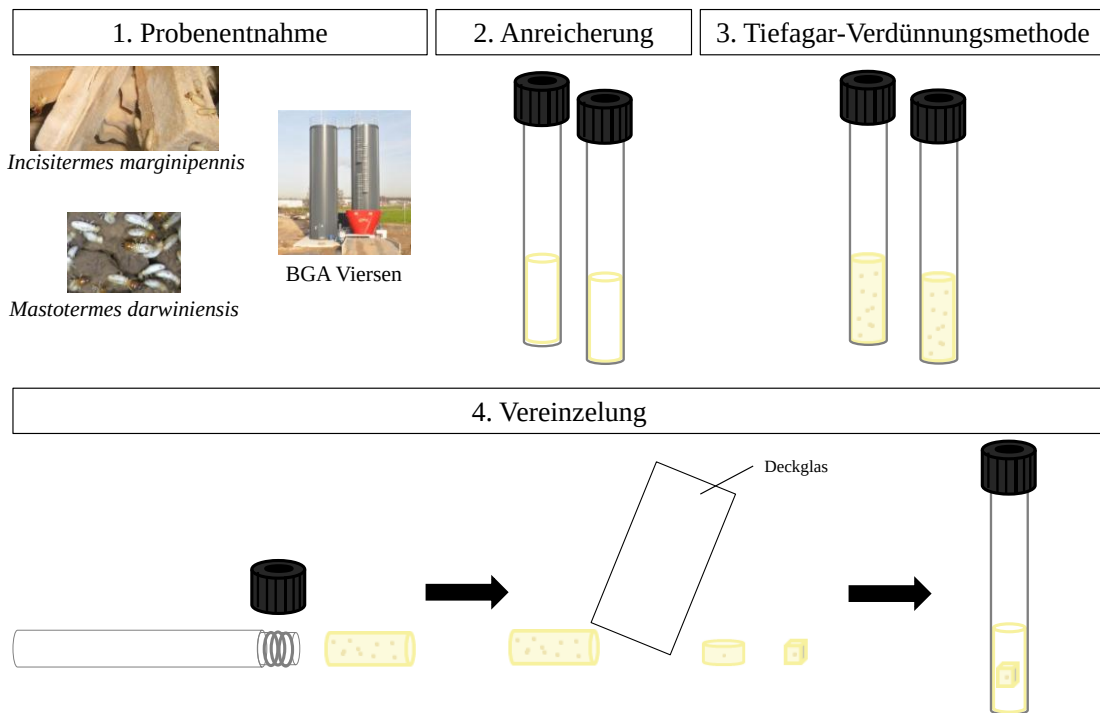


Abbildung 2.1: Schema zur Isolierung methanogener Archaea aus den Termiten *Incisitermes marginipennis* und *Mastotermes darwiniensis* sowie der thermophilen BGA Butschen, Viersen. (1) Präparation des Intestinaltraktes der Termiten und Probenentnahme aus der BGA Butschen, Viersen (2) Anreicherung methanogener Archaea in Flüssigmedium (3) Wachstum einzelner Kolonien nach Anwendung der Tiefagar-Verdünnungsmethode (Nährmedium mit 1,5 % [w/v] Agar) (4) Vereinzeln der Kolonien aus dem Agar mittels sterilem Deckglas und Aufnahme des Agarstücks in neuem Flüssigmedium.

Tiefagar-Verdünnungsmethode

Es wurden 20 ml Hungate-Röhrchen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lengler) mit 5 ml Nährmedium und 1,5 % (w/v) Agar wie unter 2.8.2 beschrieben hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurden die Medien auf etwa 50 °C abgekühlt. Aus den Anreicherungskulturen wurden 0,1 bis 0,5 ml Flüssigkeit entnommen und in die abgekühlten Hungate-Röhrchen injiziert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen im Medium zu gewährleisten, wurden diese gemischt und im Anschluss direkt in einem Eis-Wasserbad abgekühlt, sodass eine lange Aussetzung vor allem der Organismen aus dem Termitendarm vermieden wurde. Die Inkubation erfolgte bei 55 °C bzw. 30 °C. Bei Wachstum von Kolonien im Tiefagar wurden die Agarstücke unter anaerober Atmosphäre (95 % N₂/5 % H₂) mit Hilfe einer sterilen Kanüle in eine ebenfalls sterile Petrischale überführt. Mit einem sterilen Deckgläschen (24 mm x 60 mm) wurde das Agarstück im Anschluss in Scheiben geschnitten. Überschüssiger Agar wurde entfernt und die Kolonien in flüssige Nährmedien überführt, welche anschließend bei entsprechender Temperatur inkubiert wurden.

2. MATERIAL UND METHODE

Zur Herstellung von Reinkulturen wurden die Isolate bis zu drei Mal mit dieser Methode vereinzelt. Zur Inhibition der Begleitflora wurde den Flüssigkulturen nach Vereinzelung eine Kombination der Antibiotika, wie unter 2.1 beschrieben, zugesetzt. Mit Hilfe der Gaschromatographie wurden sowohl die Anreicherungskulturen als auch die gewonnenen Isolate auf ihre Methanproduktion überprüft.

2.9 Analyse von Gasen und Überprüfung der Methanproduktion

Mittels Gaschromatographie fand der Nachweis gasförmiger Substrate und Stoffwechselprodukte statt, wodurch die Aktivität methanogener Archaea überprüft werden konnte. Die Detektion und Quantifizierung der Gase H₂, N₂, CH₄ und CO₂ erfolgte an einem Gaschromatographen (GC 2014, Shimadzu, Duisburg) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor und Autosampler über eine Supelco SII 100 / 120 Carbosieve Säule (30 m × 0,25 mm, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Es wurde folgendes isotherme Programm verwendet: Injektor 170 °C, Säule 170 °C, Detektor 200 °C; Trägergas Helium (25 ml/min). Dabei wurden jeweils 3 ml Gas über eine gasdichte 10 ml Spritze mit Absperrventil (Hamilton, Reno, NV, USA) aus den Kulturgefäßen entnommen und in gasdichte 1,5 ml Probengefäße (Gewindeflaschen N 9 mit PTFE / Silikon-Septum, Macherey-Nagel, Düren) überführt. Hiervon wurde über einen Autosampler 0,2 ml in die Säule injiziert. H₂ konnte nach 1:15 min, CH₄ nach 4:55 min und CO₂ nach 8:40 min Retentionszeit quantifiziert werden.

Mit Ausnahme von *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T wurden diverse Typstämme (*Methanobacterium formicicum* MF^T, *Methanobacterium thermaggregans*^T, *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T, *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T, *Methanothermobacter wolfeii*^T und *Methanothermus fervidus* V24 S^T) sowie das Eigenisolat SIV6 in Medium DSMZ 287 mod. kultiviert. *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T wurde in Medium DSMZ 141 kultiviert, denn in Medium DSMZ 287 mod. ist kein Wachstum möglich. Von jedem Stamm wurden jeweils zwei parallele Ansätze als Batch-Kultur hergestellt und die Methanproduktion nach 48, 54 und 100 Stunden gaschromatographisch bestimmt.

Die Auswirkung des Reaktorfiltrats (Rf) sowie des Fermenterinhalts (Fi) auf die Methanproduktion wurde in einem weiteren Versuch ermittelt. Dazu wurde der Typstamm *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T in Medium DSMZ 287

mod. sowie in Medien mit zusätzlich 20 % Fermenterinhalt (Fi) und in Medien mit zusätzlich 20 % Reaktorfiltrat (Rf) kultiviert und die Methanproduktion gaschromatographisch ermittelt.

In Kooperation mit dem Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (PFI) wurden die Typstämme *Methanobacterium formicicum* MF^T und *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T sowie das Isolat SIV6 in einem Methanreaktor bei unterschiedlichen Temperaturen und Druckverhältnissen auf ihre Methanproduktion überprüft. Das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 ist zudem in einem Hochleistungs-Methanreaktor im Einsatz.

2.10 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden die molekularbiologischen Methoden näher erläutert, die während vorliegender Arbeit Verwendung fanden.

2.10.1 DNA-Isolierung aus Kulturen und Termitendärmen

Für die Identifizierung von archaeellen Isolaten sowie für weitere molekularbiologische Untersuchungen wurde genomische DNA aus Kulturen mit Hilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll für grampositive Bakterien isoliert. Hierzu wurden je 500 µl einer Flüssigkultur 8 Minuten bei 7500 x g abzentrifugiert. Die weitere Isolierung fand gemäß den Herstellerangaben statt. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µl PCR-Wasser statt in 200 µl AE-Puffer. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -18 °C gelagert. Die Methode beruht auf der Bindung der negativ geladenen DNA an einer Silika-Membran, die daraufhin durch den Einsatz eines Niedrigsalz-Systems wieder eluiert werden kann.

Für die Erstellung der Klonbibliothek wurde zur Isolierung genomischer DNA aus *Mastotermes darwiniensis* und *Incisitermes marginipennis* das GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx (Roboklon, Berlin) angewendet. Es wurden je 200 mg der Därme aus Arbeitern und Soldaten eingesetzt (Abschnitt 2.6). Die DNA wurde entsprechend der Herstellerangaben isoliert und in 120 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Methode kombiniert Hitze mit einer chemischen und mechanischen Aufschlussmethode.

Für die Gesamtgenom-Sequenzierung von *Methanothermobacter thermophilus* M^T wurde die DNA mittels des Kits FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France),

2. MATERIAL UND METHODE

welches Keramik- und Silika-Partikel sowie eine Lysematrix für den Zellaufschluss verwendet, isoliert.

2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte in 1-2,5%igen [w/v] Agarosegelen. TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (1x) wurde verwendet, der aus 10x-TBE-Puffer hergestellt wurde.

TBE-Puffer (10x)

TRIS	108,00 g/l
Borsäure	55,00 g/l
Na ₂ EDTA	7,44 g/l
pH 8,3	

Als DNA-Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth). Die mit DNA Loading Dye (6x) versetzten PCR-Produkte wurden auf das Gel aufgetragen.

Um die Auftrennung der DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) für mindestens 20 min gefärbt und mit einer Geldokumentationseinheit (BioVision CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell) photographisch ausgewertet.

2.10.3 PCR-Methoden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR von **P**olymerase **C**hain **R**eaction) ist ein von Kary B. Mullis entwickeltes Verfahren. Es handelt sich um einen zyklischen Prozess, bestehend aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer sowie der Synthese neuer Einzelstränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, sodass es zur exponentiellen Anreicherung des DNA-Abschnittes kommt.

Im Folgenden werden die verschiedenen PCR-Methoden erläutert, die zur Identifizierung der isolierten methanogenen Archaea Verwendung fanden.

2.10.3.1 Amplifikation des archaeellen 16S rRNA-Gens

Die Amplifikation partieller Bereiche des ribosomalen 16S rRNA-Gens erfolgte mittels PCR. Die 16S rRNA, bestehend aus konservierten und variablen Regionen, ist Teil der Ribosomen. Für Diversitätsanalysen mittels Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), Klonierungsreaktionen im Vorfeld von ARDRA

sowie einem Vergleich der Sequenzen mit Datenbanken, wurden Teilsequenzen des etwa 1500 bp (Basenpaare) langen 16S rRNA-Gens mit Oligonukleotid-Primern (Tabelle 2.10), die spezifisch für methanogene Archaea sind, amplifiziert.

Tabelle 2.10: Verwendete Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von 16S rDNA-Fragmenten methanogener Archaea.

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Größe _{Amplifikat} [bp]	Referenz
Met86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	51	1254	Wright & Pimm, 2003
Met1340r	CGG TGT GTG CAA GGA G	53		
AR1530r	GGA GGT GAT CCA GCC G	56	1444 ¹	Mori <i>et al.</i> , 2008

T_m = Schmelztemperatur

¹verwendet in Primerpaarung Met86f/Ar1530r.

Der Reaktionsansatz (Tabelle 2.11) und das Temperaturprogramm (Tabelle 2.12) zur Amplifikation der 16S rRNA-Genfragmente sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz zur Amplifikation von 16S rDNA aus Gesamt-DNA Extrakten.

Komponente	Volumen [µl]
PCR-Wasser	32,7
PCR-Puffer Y (10 x)	5,0
Primer, forward (c = 10 pM) ¹	2,0
Primer, reverse (c = 10 pM) ¹	2,0
dNTP-Mix (c = 10 mM)	2,0
Rinderserumalbumin (BSA; c = 20 mg/mL)	1,0
Taq DNA-Polymerase (c = 5 U/µL)	0,3
DNA-Extrakt	5,0

¹Primerpaarung Met86f/Met1340r oder Met86f/Ar1530r.

Tabelle 2.12: Temperaturprogramm zur PCR-Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Genfragmente mittels der Primerpaarung Met86f/Met1340r bzw. Met86f/Ar1530r.

Phase	Met86f/Met1340r			Met86f/Ar1530r		
	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	1	95	300	1
Denaturierung I	95	60		95	30	
Hybridisierung I	57-53 (-0,3 °C/Zyklus)	60	15	55-56,5 (+0,1 °C/Zyklus)	45	16
Elongation I	72	60		72	90	
Denaturierung II	95	60		95	30	
Hybridisierung II	53	60	20	56	45	21
Elongation II	72	60		72	90	
Finale Elongation	72	600	1	72	300	1

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%igem Agarosegel bei 120 V aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte wie in Abschnitt 2.2 beschrieben.

2.10.3.2 Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR)

Die Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) ist eine von Fröhlich und Pfannebecker entwickelte DNA-Fingerprint-Methode basierend auf der Methode der RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR). Sie dient der Art- bzw. Stammunterscheidung verschiedenster Organismen (Pfannebecker 2005, Fröhlich und Pfannebecker 2006, 2007). Im Unterschied zu einer herkömmlichen PCR werden keine Primerpaare verwendet, sondern es wird ein Primer verwendet, dessen Sequenz seinen Ursprung in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym NotI (GCG GCC GC) hat, an welche eines der vier möglichen Nukleotide am 3'-Ende angefügt wurde.

Das spezifische DNA-Bandenmuster, das nach der Gelelektrophorese generiert werden konnte, bildet einen molekularen Fingerabdruck der modifizierten NotI-Schnittstellen im Genom. Durch einen Vergleich mit den Bandenmustern bekannter Referenzorganismen (sequenzierte Isolate bzw. Typstämme) sollte die Identifizierung unbekannter Kulturen ermöglicht und die Ergebnisse der ARDRA verifiziert werden. Des Weiteren sollte die Gattung *Methanothermobacter* mittels SAPD-PCR unterschieden werden und ein Isolat eingeordnet werden.

Der Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm für die SAPD-PCR sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 2.13 und 2.14).

Tabelle 2.13: Reaktionsansatz für die SAPD-PCR.

Komponente	Volumen [µl]
PCR-Wasser	13,3
PCR-Puffer Y (10x)	2,5
Primer, N-Not (50 µM)	1,0
MgCl ₂ (20 mM)	2,0
dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)	1,0
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2
DNA-Extrakt	5,0

Tabelle 2.14: SAPD-PCR Temperaturprogramm.

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	94	60	1

Hybridisierung	35	60	1	
Rampe I (+ 0,5 °C/Zyklus)	35 - 42,5	12	15	35
Hybridisierung II	42,5	60	1	
Rampe II (+ 1,5 °C/Zyklus)	42 - 70,5	12	19	
Elongation	72	300	1	
Finale Elongation	72	600		1

Die Auswertung erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung von 7 µl des Ansatzes bei 50 V für drei Stunden in einem 1,5%igem (w/v) Agarose-Gel. Die Dokumentation erfolgte wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben. Zur Charakterisierung der Gattung *Methanothermobacter* wurde für jede Bande eines SAPD-PCR-Musters die Fragmentlänge mittels der Software Bio1D bestimmt.

2.10.4 ARDRA methanogener Archaea

Bei der ARDRA handelt es sich um eine PCR-basierte Fingerprint-Methode. Die Analyse stellt einen Spezialfall des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) dar, denn die RFLP-Methodik wird auf ein Amplifikat des 16S rRNA-Gens angewendet. Grundlage des genetischen Fingerabdrucks bildet dabei die Sequenz des vorliegenden 16S rRNA-Gens. Aufgrund der variablen Bereiche unterscheiden sich auch die Position, das Vorkommen und die Anzahl von Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme). Eine Unterscheidung der Organismen auf Gattungsniveau wird dadurch möglich gemacht. Anhand der entstandenen Fingerprintmuster konnten Isolate bzw. Klone der vorliegenden Arbeit in Gruppen zusammengefasst werden. Durch die Sequenzierung der 16S rDNA eines Isolates bzw. eines Klons konnten somit auch die anderen Isolate bzw. Klone dieser Gruppe identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das 16S rRNA-Gen aus dem genomischen DNA-Extrakt amplifiziert (Primerpaar Met86f/Met1340r bzw. Met86f/Ar1530r für die Diversitätsanalyse in Termiten). Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mit den Restriktionsendonukleasen (Tabelle 2.15) verdaut.

Tabelle 2.15: Restriktionsenzyme mit Angabe der Schnittstelle.

Restriktionsenzym	Schnittstelle (5' → 3')
BsuRI (HaeIII)	GG [^] CC
SmaI	CCC [^] GGG
XhoI	C [^] TCGAG

Für den Einfach-Restriktionsansatz mit BsuRI wurden zu 8,7 µl PCR-Produkt jeweils 0,3 µl Restriktionsenzym sowie 1 µl Puffer R pipettiert. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 30 °C über Nacht. Aufgrund unterschiedlicher Temperatur- und Pufferbedingungen wurde der Doppel-Restriktionsansatz mit einer Kombination der Restriktionsendonukleasen SmaI und XhoI in einem zweistufigem Prozess durchgeführt. Zunächst erfolgte ein Einfachverdau mit SmaI. Zu 8,7 µl PCR-Produkt wurden 0,3 µl des Restriktionsenzym SmaI und 1 µl Tango-Puffer pipettiert und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 0,3 µl XhoI und 1 µl Tango-Puffer hinzugefügt. Der komplette Ansatz wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Auswertung des Restriktionsverdaus erfolgte in einem 2,5%igem (w/v) Agarosegel bei 60 V für 3,5 Stunden. In die Geltaschen wurde der gesamte Restriktionsansatz pipettiert, welcher zuvor mit 2 µl Ladepuffer (6x) versetzt wurde. Die Dokumentation der Gele erfolgte wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben. Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

2.10.5 Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA-Sequenz

Nach Amplifizierung des 16S rRNA-Gens und anschließender gelelektrophoretischer Analyse wurden die Amplifikate zunächst mit dem Reaktionskit USB[®] ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) aufgereinigt. Dazu wurden je 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl ExoSAP-IT-Reagenz 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend 25 Minuten bei 80 °C erhitzt. Neben der Identifizierung der Isolate anhand der Sequenzen der 16S rDNA wurden die Isolate zuvor mittels zweier molekularer Fingerprintmethoden analysiert: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) (Abschnitt 2.10.4) und Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) (Abschnitt 2.10.3.2). Mittels eines Vergleichs der durch ARDRA oder SAPD-PCR generierten charakteristischen Bandenmuster der Isolate bzw. Klone mit denen von Typstämmen konnten die Isolate bzw. Klone in Gruppen zugeordnet werden. Die Identifikation erfolgte mittels 16S rDNA-Sequenzierung.

Die aus der Klonbibliothek (Abschnitt 2.10.6) erhaltenen 16S rDNA Sequenzen konnten mit Hilfe des Online-Tools DECIPHER's Find Chimeras auf chimäre Sequenzen hin analysiert werden. Chimäre 16S Amplifikationsprodukte sind hybride

DNA-Moleküle, die sich aus multiplen Sequenzen zusammensetzen können. Die Ursache liegt in unvollständig elongierten Amplifikaten, die während der PCR entstehen. Unvollständige Amplifikationsprodukte können in nachfolgenden Zyklen der PCR als Primer funktionieren. Findet ein Annealing und eine DNA-Synthese von einem falschen Template statt, erfolgt die Bildung chimärer Moleküle (Haas *et al.*, 2011). Bleiben diese Sequenzen unentdeckt, so wird eine erhöhte Biodiversität vorgetäuscht (Wright *et al.*, 2012). Das Programm platziert dabei eine Sequenz in eine phylogenetische Gruppe und detektiert daraufhin kurze Fragmente, die für diese phylogenetische Gruppe atypisch sind.

Zur Sequenzierung der PCR-Amplifikate wurden 2 µl je eines Primers zu dem aufgereinigten PCR-Produkt hinzugefügt. Nach der Sanger-Methode wurde die Sequenz der 16S rDNA durch die Firma LGC (Berlin) ermittelt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit der Software FinchTV (Version 1.4.0) der Firma Geospiza (Seattle, USA). Bei einer Sequenzierung des PCR-Amplifikats mit Forward- und Reverse-Primer wurde das Sequenzierungsergebnis eines Primers zunächst revers komplementär umgeschrieben (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html, Stand: 16.08.2015). Anschließend wurden die DNA-Sequenzen zusammengeführt.

Zur Identifizierung wurden 16S rDNA-Sequenzen der Isolate mit der Datenbank GenBank Nucleotide collection (Altschul *et al.*, 1990) oder der Datenbank EzTaxon Server 2.1 (Kim *et al.*, 2012) verglichen.

2.10.6 Diversitätsanalyse methanogener Archaea in *Mastotermes darwiniensis*

Für die Untersuchung der Diversität methanogener Archaea im Termitendarm erfolgte zunächst die Erstellung einer Klonbibliothek auf Grundlage des archaeellen 16S rRNA-Genfragments (Abbildung 2.2).

2. MATERIAL UND METHODE

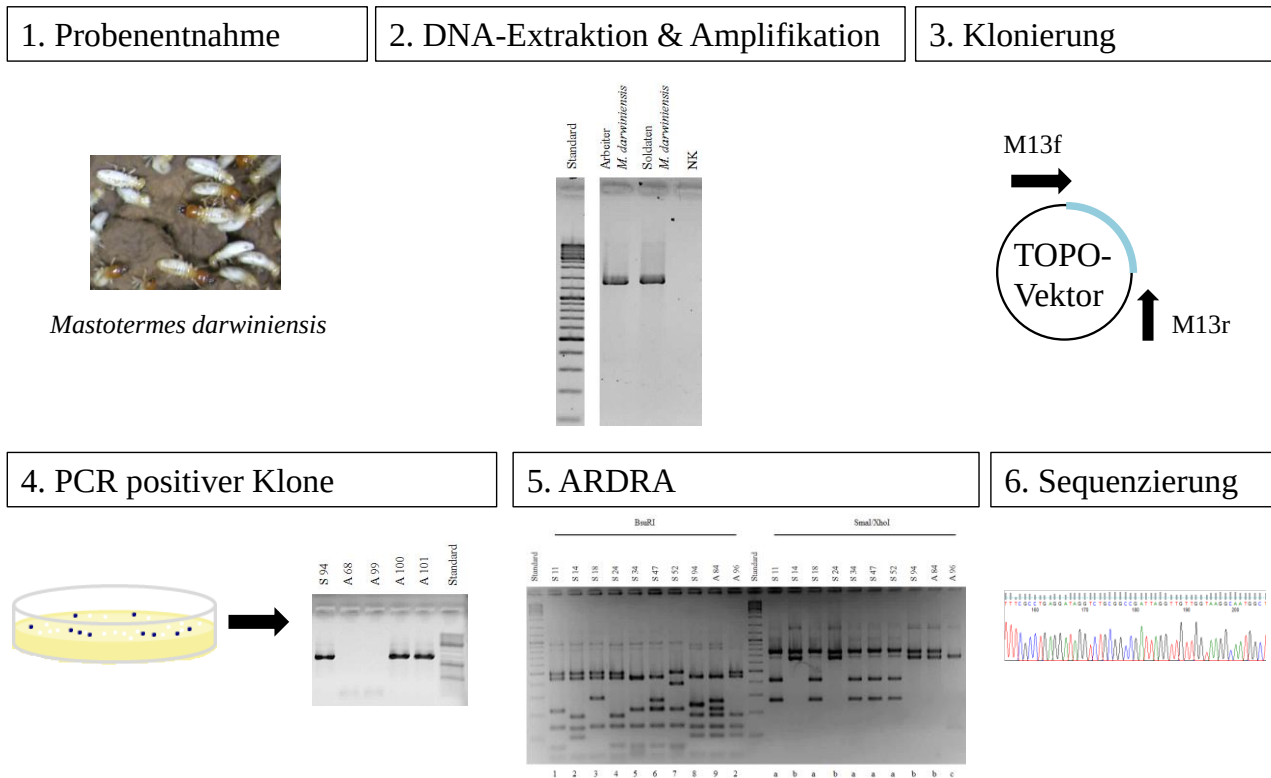


Abbildung 2.2: Schema zur Erstellung der Klonbibliothek methanogener Archaea im Termitendarm von *Mastotermes darwiniensis*. (1) Präparation der Termitendärme wie unter 2.9.1 (2) Isolierung genomischer DNA und anschließende Amplifikation des 16S rDNA-Fragments (3) Klonierung in den TOPO-Vektor und Transformation in chemokompetente *E. coli* (4) Wachstum der Vektor tragenden Klone aufgrund einer Kanamycinresistenz auf kanamycinhaltigen LB-Platten und Differenzierung der Insert tragenden Klone durch fehlende β -Galactosidase Aktivität (Blau/Weiß Selektion) mit anschließender PCR positiver weißer Klone (5) ARDRA und Gruppierung nach Mustern (6) Sequenzanalyse des 16S rRNA-Genfragments methanogener Archaea.

Nach der Probenentnahme wie unter 2.6 beschrieben, Isolierung (Abschnitt 2.10.1) und Amplifikation (Abschnitt 2.10.3.1) genomischer DNA (Primerpaar Met86f/Ar1530r) fand eine Klonierung des 16S RNA-Genfragmentes in ein Vektorplasmid mit anschließender Transformation in chemokompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) statt, bevor die Methode der ARDRA (Abschnitt 2.10.4) angewendet wurde. Die Klonierung erfolgte mit dem Invitrogen TOPO TA-Cloning®-Kit, welches eine ligasefreie Verknüpfung des Amplifikats mit dem Vektor pCRTTMII-TOPO® ermöglicht. Es nutzt dabei den Umstand, dass die *Taq*-Polymerase ein einzelnes desoxy-Adenin an das 3'-Ende der Amplifikate anfügt. Eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus spaltet diesen an der spezifischen Erkennungssequenz 5'-CCCTT-3'. Dabei entsteht Energie, die in einer kovalenten Bindung (Phosphotyrosil-Bindung) zwischen dem Phosphatrest des abgetrennten

Vektorstranges und einem Tyrosil-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase konserviert wird. Eine Ligation von Vektor und Insert wird dadurch erreicht, dass das 3'-OH des Amplifikats die gebildete Phosphotyrosil-Bindung angreifen kann und unter Ablösen der Topoisomerase I diesen Strang kovalent verknüpft. Der gegenläufige Strang kann dann durch das über die *Taq*-Polymerase angehängte desoxy-Adenin eine Basenpaarung mit dem überhängenden Thymin eingehen.

Für die Klonierung wurden je 4 µl des PCR-Amplifikats (Abschnitt 2.10.3.1) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Mit dem Ligationsansatz wurden die chemokompetenten *E. coli* TOP10-Zellen transformiert und 20-50 µl der Zellsuspension auf kanamycinhaltigen LB-Festmedien mit X-Gal ausplattiert. Aufgrund der auf dem Vektor vorhandenen Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin konnte eine Selektion auf dem antibiotikahaltigen Nährmedium erfolgen. Zudem tragen die Vektoren das *lacZα*-Gen, das für das aminoterminalen α -Peptid der β -Galactosidase codiert und bei fehlender Fremd-DNA intakt ist. Bei β -Galactosidase-Aktivität wird der Farbstoff X-Gal hydrolysiert, sodass sich Kolonien mit Vektor, aber fehlendem Insert blau färben. Kolonien, die das Insert tragen, sind weiß gefärbt. Aufgrund dieser Blau/Weiß-Selektion lassen sich erfolgreich klonierte Kolonien (positive/weiße Kolonien) von Kolonien mit missglückter Klonierung unterscheiden. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden je 100 Klone mittels einer sterilen Pippettenspitze gepickt und in 30 µl PCR-Wasser aufgenommen. Nach erfolgreicher Amplifikation mittels des Met86f/Ar1530r-Primerpaares konnten die PCR-Produkte in der ARDRA eingesetzt werden. Die Einteilung der charakteristischen Fingerprintmuster und die Identifizierung erfolgten wie unter Abschnitt 2.10.4 und 2.10.5 beschrieben. Für die Sequenzierung wurden mit Ausnahme des Klons S34 die Primer M13f und M13r in getrennten Ansätzen verwendet. Klon S34 wurde mittels des Primers Met86f sequenziert.

3. Ergebnisse

3.1 Mikroorganismen aus Termiten als neuartige Enzymquelle zur Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation

Um die Hydrolyse von Cellulose effizient durchzuführen und die Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation wirtschaftlich möglich zu machen, müssen geeignete Enzyme gefunden werden. Termiten stellen in der Natur neben Pilzen und Wiederkäuern ein effizientes System zur Umsetzung lignocellulosehaltigen Materials dar. Der Abbau findet innerhalb von 24 Stunden statt. Zur Hydrolyse von Lignocellulose nutzen Termiten eine Kombination aus termiteneigenen Enzymen und Enzymen, die von Symbionten stammen. Termiten wurden aufgrund ihrer effizienten Umsetzung als neuartige Enzymquelle ausgewählt, um wirtschaftlich Bioethanol aus Stroh zu produzieren.

3.1.1 Auswahl eines geeigneten Cellulase-Produzenten

Um einen geeigneten Stamm für die Cellulaseproduktion zu finden, wurden am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) vorliegende Stämme und Isolate aus Termiten sowie ein Isolat von Fruchtkörpern der Chinesischen Morchel mit potentiell cellulolytischer Aktivität dem Azo-Carboxymethyl-Cellulose-Test (Azo-CMC-Test) unterzogen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Ergebnisse des Azo-CMC-Tests verschiedener am IMW vorliegender Isolate.

Bakterium/ Hefe	Art	Stamm	Quelle	Medium	Aktivität
Hefe	<i>Saitozyma flava</i>	OO2	<i>Odontotermes obesus</i> **	Vogels- Minimalsalz	+
Hefe	<i>Papiliotrema odontotermidis</i>	OO5	<i>Odontotermes obesus</i> **	Vogels- Minimalsalz	(+)
Hefe	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	MD123	<i>Mastotermes darwiniensis</i> *	Vogels- Minimalsalz	(+)
Hefe	<i>Saccharomyces arboricolus</i>	12749	Fruchtkörper von <i>Auricularia polytricha</i>	Vogels- Minimalsalz	–
Bakterium	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ266a	<i>Zootermopsis angusticollis</i> *	CYM- Medium	–
Bakterium	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ282e	<i>Zootermopsis angusticollis</i> *	CYM- Medium	–

+ Aktivität

(+) geringe Aktivität

– keine Aktivität

* = niedere Termiten

** = höhere Termiten

Beide *Bacillus megaterium* Stämme aus der niederen Termiten *Zootermopsis angusticollis* sowie die Hefe *Saccharomyces arboricolus*, die von Fruchtkörpern der Chinesischen Morchel *Auricularia polytricha* isoliert wurde, zeigten keinerlei Aktivität. Die beiden Hefen *Trichosporon mycotoxinivorans* aus der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* und *Papiliotrema odontotermitidis* (Handel *et al.*, 2016) aus der höheren Termiten *Odontotermes obesus* zeigten eine geringe Aktivität. Eine deutliche Aktivität konnte lediglich bei dem Hefeisolat *Saitozyma flava* OO2 (*S. flava* OO2) festgestellt werden, das ebenfalls aus der höheren Termiten *Odontotermes obesus* stammt. Das Wachstum der Hefe *S. flava* OO2 wurde parallel zum Aktivitätstest des Überstandes photometrisch bestimmt (Abbildung 3.1).

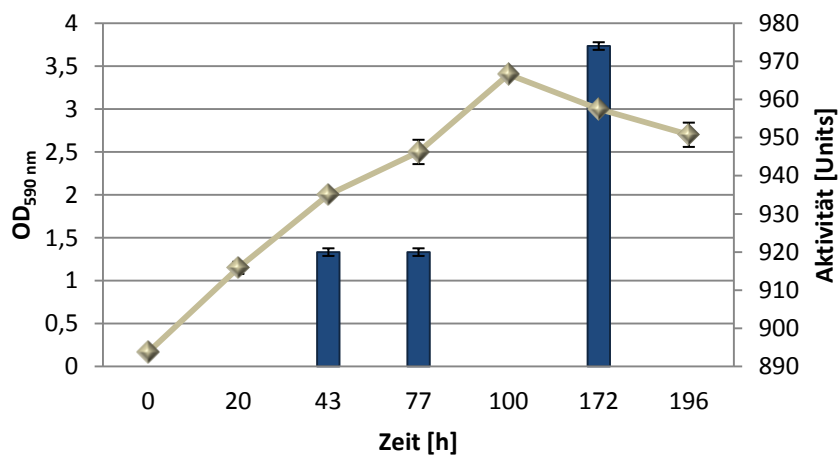


Abbildung 3.1: Wachstum der Hefe *S. flava* OO2 und Bestimmung der Cellulase-Aktivität mittels Azo-CMC-Test aus dem Überstand. Aufgetragen ist die Optische Dichte (OD) bei 590 nm und die Aktivität in Units gegen die Zeit in Stunden (vgl. auch Tabelle 7.1, Anhang).

Die exponentielle Phase ist nach 100 Stunden beendet. Nach 172 Stunden ist die Absterbephase bereits erreicht. Eine deutliche Cellulase-Aktivität ist nach 43 Stunden ermittelt worden. Ein Anstieg der Aktivität ist nach 77 Stunden noch nicht zu verzeichnen. Nach 172 Stunden mit Erreichen der Absterbe- bzw. Stationärphase ist ein leichter Anstieg der Aktivität zu erkennen.

Zur Aufreinigung der Cellulase (Cel1) wurde ein größerer Ansatz hergestellt. Die Konzentrierung und Aufreinigung erfolgte über Ammoniumsulfatfällung, isoelektrische Fokussierung (IEF) und Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (Abschnitt 2.7.3 – 2.7.6).

3.1.2 Aufreinigung und Identifizierung der Cellulase Cel1

Nach kolloidaler Coomassie-Färbung waren zwei Banden für den Kulturüberstand im 20%igen SDS-Gel (Abbildung 3.2) sichtbar. Die obere Bande befindet sich etwas unterhalb von 35 kDa und die untere Bande unterhalb von 25 kDa. Die Fraktionen nach der Aufreinigung durch die IEF (vereinigte Fraktionen 7-9; nicht dargestellt) und die FPLC (Fraktion 22) zeigten lediglich eine Bande etwas unterhalb von 35 kDa.

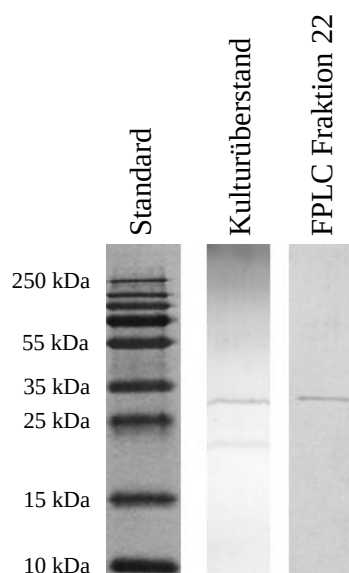


Abbildung 3.2: Kolloidale Coomassie-Färbung nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im 20%igen SDS-Gel. Aufgetragen sind 20 µl des Kulturüberstandes und 10 µl der FPLC Fraktion 22. Als Standard wurde PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa der Firma Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) verwendet.

Das Aufreinigungsschema (Tabelle 3.2) der Cellulase Cel1 zeigt, dass die Gesamtproteinmenge und die spezifische Proteinmenge abnehmen, während die spezifische Aktivität um etwa das 13-fache ansteigt.

Tabelle 3.2. Aufreinigungsschema der Cellulase Cel1. Definition der spezifischen Aktivität (Abschnitt 2.7.1).

	Gesamtvolumen [ml]	Gesamtprotein- menge [mg]	Spezifische Proteinmenge [mg/ml]	Spezifische Aktivität [RBB-Units]
Kulturüberstand	1080,0	287,000	0,266	1402
Dialyse	45,0	0,990	0,022	18245
FPLC Fraktion 22	0,5	0,007	0,015	17833

Die Identifizierung der Proteine aus dem SDS-Gel erfolgte durch [REDACTED] am Institut für Immunologie in Mainz unter Verwendung der Liquid Chromatography-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Methode.

Das erhaltene Spektrum und die daraus gewonnenen Sequenzinformationen konnten über das Metagenom, das von dem Kooperationspartner SeqLab – Sequence Laboratories Goettingen GmbH generiert wurde, zur Identifizierung genutzt und mit der Datenbank GenBank verglichen werden (Abbildung 3.3). Die obere Bande des Kulturüberstandes, die sich etwas unterhalb von 35 kDa im SDS-Gel befindet (Abbildung 3.2), konnte somit als Cellulase identifiziert werden. Bei der unteren Bande, die etwas unterhalb von 25 kDa liegt, handelt es sich um eine Cutinase. Das Gen der Cellulase Cel1 ist unter dem GenBank Eintrag KY073227 hinterlegt.

```

MKTATLLAALSVLAGALA↓APLAGEMSLHRRTLPLRLGGVNLGCDGFDIYGNSTGTPA
CPGTEQVGHFIAADGANLFRPLPAGWQYLVGNNOASTSLAPDFFAQYDALVQAVISKGAY
AIIDVHNYARWNGAIIIGQGGPSNQDFANLWTLATKYKNDPNVIFGLMNEPHDLVDVST
WAGSVQAAVNIRAAGATSQYILIPGTGFTNANAWFQGQDDALLGVTDVPVGGTDKLLL
DVHRYNDVDFSGTHAECTTNSLDVLSSLDLWLGKNGRKAIVSETGGGHTTSCETDLGE
FLHGIKEDYPSVLGFAVWAAGSFDPSYVLSITPTNGVDNQLFDIAVKPNLP

```

Abbildung 3.3: Aminosäuresequenz der Cellulase Cel1, die mittels Metagenom und durch die (LC-MS/MS)-Methode (unterstrichene Bereiche) gewonnen wurde. ↓ zeigt die mögliche Spaltstelle, die über SignalP 4.1 Server ermittelt wurde. Vorausgesagte **Signalsequenz** und **Pro-Sequenz** für CMCase 1 (Cui *et al.*, 1992).

Die Cellulase Cel1 aus *S. flava* OO2 wies eine 90%ige Sequenzidentität mit CMCase 1 aus *S. flava* (isoliert als *Cryptococcus flavus*) und eine 85%ige Sequenzidentität mit einer CMCase aus *Cryptococcus* sp. S-2 (hier CMCase S-2 genannt) nach blastn auf. Die Cellulase Cel1 gehört der Glykosidhydrolase-Familie 5 an.

Über ExPASy ProtParam tool wurde eine Größe von 35,8 kDa für die gesamte Aminosäuresequenz ermittelt. Secretome P 2.0a Server sagt ein Signalpeptid über SignalP voraus (Einstellung Mammalia). Über SignalP 4.1 Server ergab sich ebenfalls ein Signalpeptid über SignalP mit einer Spaltstelle zwischen den Aminosäuren an der Position 18 und 19 (Abbildung 3.3 ↓). Über ExPASy ProtParam tool wurde ein Molekulargewicht von 34,1 kDa ermittelt. Für das potentiell reife Protein nach Cui *et al.* (1992) (Abbildung 3.4) ergab sich über ExPASy ProtParam tool ein Protein mit der Größe von 32,8 kDa und für das potentiell reife Protein mit Pro-Sequenz ergab sich eine Größe von 34,3 kDa.

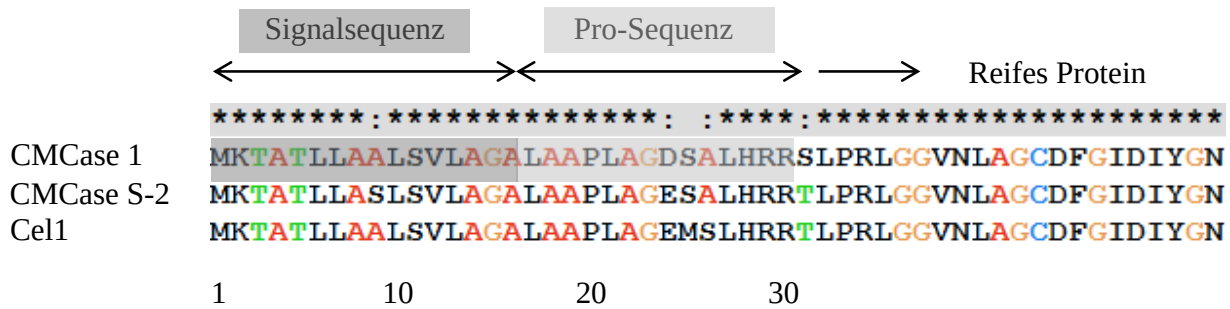


Abbildung 3.4: Alignment der N-terminalen Sequenz der isolierten Cellulasen CMCase 1 (Cui et al., 1992) und CMCase S-2 (Thongekkaew et al., 2008) sowie der eigenen isolierten Cellulase Cel1. Für CMCase 1 wird eine **Signalsequenz** und eine **Pro-Sequenz** vorgeschlagen, sodass das reife Protein an Aminosäure 31 beginnt.

Als Vorlage für das 3D-Strukturmodell diente die 5D8Z Struktur der β -1,4-Endoglucanase aus *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) (Liu et al., 2016). Das Enzym hatte von allen bekannten Cellulasen mit Kristallstruktur die größte Sequenzübereinstimmung zu Cel1 und zudem Cellobiose als mitkristallisierten Liganden. Die ersten 32 Aminosäuren sind in dem vorliegenden Modell (Abbildung 3.5) nicht enthalten, denn dafür ist kein Template vorhanden. Zwischen der Cellulase-Sequenz aus *S. flava* OO2 und der Template-Sequenz sind 45 % der Aminosäuren konserviert und 60 % der Aminosäuren homolog. Während die Template-Struktur vier Disulfidbrücken enthält, sind in der Sequenz aus *S. flava* OO2 nur zwei Disulfidbrücken vorhanden. Eine dieser Disulfidbrücken liegt konserviert vor, während die zweite eine neue Disulfidbrücke darstellt, die den ersten Loop stabilisiert. Die beiden Glutaminsäuren (E) des aktiven Zentrums in der Struktur aus *G. lucidum* sind in der Sequenz aus *S. flava* OO2 enthalten.

Cellobiose wurde an der gleichen Stelle in das Modell aus *S. flava* OO2 eingefügt, an der es auch in der Struktur aus *G. lucidum* liegt. Es wurde kein molekulares Docking angewendet. Die in der Struktur aus *G. lucidum* wichtigen Aminosäuren zur Substratbindung sind Tryptophan (W) W202 und Asparagin (N) N242. In der Sequenz aus *S. flava* OO2 ist die Aminosäure Tryptophan (W) und Asparagin (N) jeweils gegen Phenylalanin (F) getauscht.

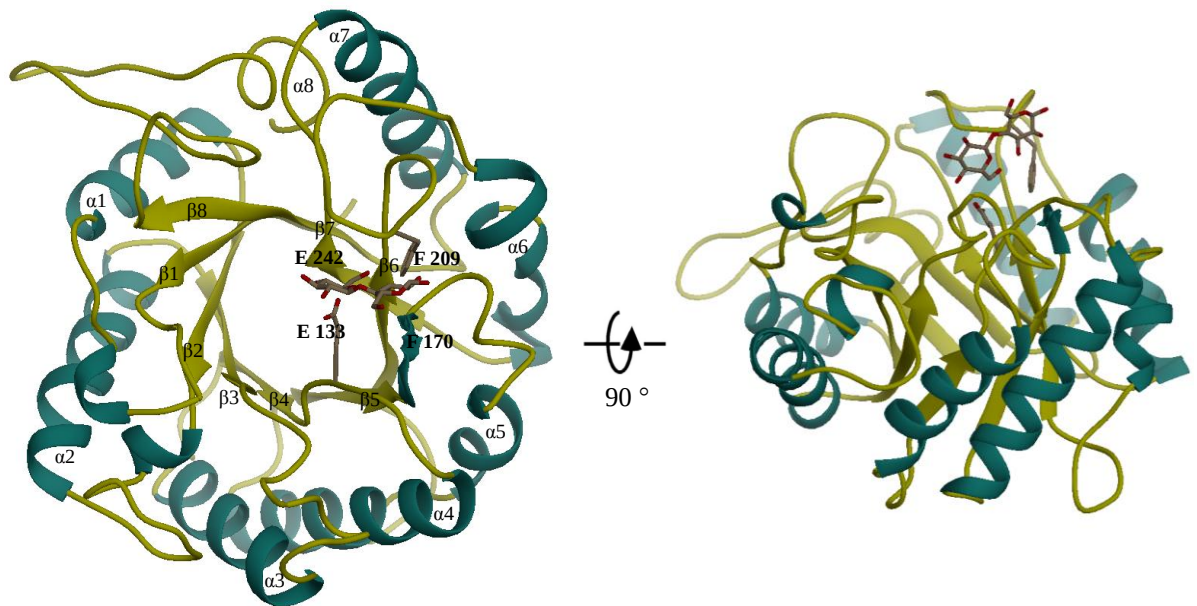


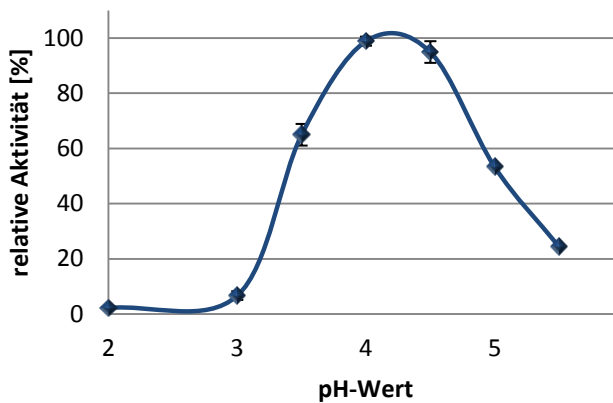
Abbildung 3.5: 3D-Strukturmodell der Cellulase.

3.1.3 Charakterisierung der Cellulase Cel1 aus der Hefe *Saitozyma flava* OO2

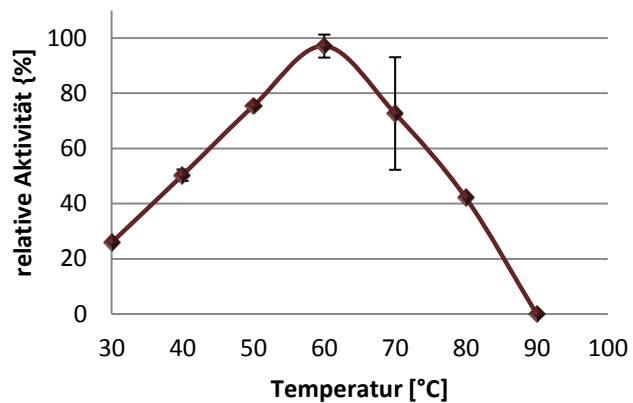
Nach vorangegangener Aufreinigung und Identifizierung der Cellulase Cel1 wurde diese näher charakterisiert. Cel1 zeigte im Überstand eine Aktivität in einem pH-Bereich zwischen $< 3,5$ und $> 5,5$ mit einem Optimum bei 4 bis 4,5 (Abbildung 3.6 A). Zwischen < 30 und > 80 °C konnte eine Aktivität der Cellulase Cel1 mit einem Temperatur-Optimum bei 60 °C ermittelt werden. (Abbildung 3.6 B). Die Bestimmung der pH-Stabilität der Cellulase und die Endprodukthemmung durch Cellobiose (Abbildung 3.6 C und D) erfolgte mit dem Azo-CMC-Test unter optimalen Bedingungen (60 °C und bei einem pH-Wert zwischen 4 und 4,5). Zur Überprüfung der pH-Stabilität wurde die Cellulase bei pH-Werten zwischen 2 und 7 für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Cellulase Cel1 war in einem pH-Bereich zwischen < 2 und > 6 stabil. Im Test zur Endprodukthemmung durch Cellobiose zeigte die Cellulase bei einer Konzentration von 25,5 % Cellobiose eine 50%ige Aktivität.

3. ERGEBNISSE

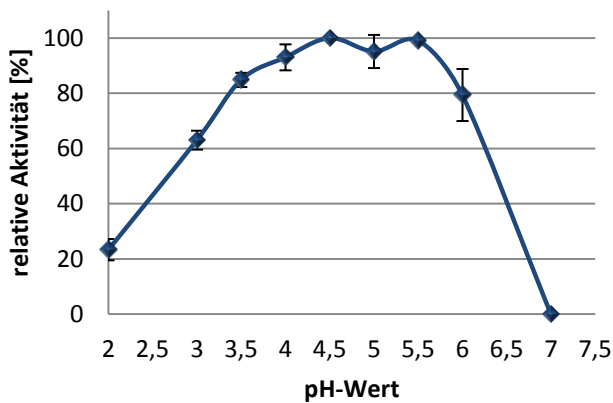
A



B



C



D

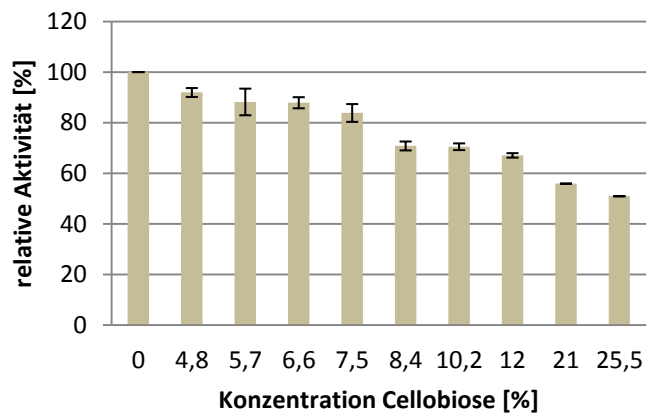


Abbildung 3.6: pH- (A) und Temperatur-Spektrum (B) sowie pH-Stabilität (C) und Endprodukthemmung (D) der Cellulase Cel1. Aufgetragen ist die relative Aktivität in % gegen den pH-Wert (A und C), die Temperatur in °C (B) oder gegen die Konzentration von Cellobiose in % (D). (Vgl. auch Tabellen 7.2 bis 7.5, Anhang).

Nachdem die Ergebnisse der neu isolierten Cellulase Cel1 zur Verbesserung der enzymatischen Saccharifikation bei der Bioethanol-Herstellung vorgestellt wurden, folgen nun die Ergebnisse zur Steigerung des Methanertrages in Biogasanlagen durch ein nachgeschaltetes Power-to-Gas Verfahren mittels eines methanogenen Neuisolates.

3.2 Einsatz eines methanogenen Neuisolates in einer Power-to-Gas Anlage

Das in Biogasanlagen (BGA) gewonnene Gas besteht zu 50-75 % aus der energietragenden Komponente Methan (CH_4) und zu 25-45 % aus Kohlenstoffdioxid (CO_2). Durch ein nachgeschaltetes Power-to-Gas Verfahren sollte der Methanertrag in Biogasanlagen gesteigert werden. Dabei wird CO_2 aus BGA mit Wasserstoff (H_2), der durch Elektrolyse mit Hilfe von Überschussstrom aus Windenergie und Photovoltaik erzeugt wird, über methanogene Archaea in einem Hochleistungs-Methanreaktor zu Methan umgewandelt. Gleichzeitig wird die zwangsweise Abschaltung von Wind- und Solaranlagen vermieden und Strom in Form von einem chemischen Energieträger gespeichert. Im Gegensatz zur Elektrizität ist das gasförmige Methan gut speicherbar. Ihm kommt eine wichtige Rolle in der Langzeitspeicherung zu. Es kann darüber hinaus in das in Deutschland bereits gut ausgebaute Erdgasnetz eingespeist werden. Solange die Batteriespeicherkapazität nicht verbessert wird und die Wasserstofftechnologie nicht ausgereift ist, stellt das Power-to-Gas Verfahren eine sinnvolle Alternative dar.

Technisch erfolgt die Methansynthese bereits über den sogenannten Sabatier-Prozess, welches ein katalysatorabhängiges Verfahren ist. Es erfordert im Gegensatz zur mikrobiellen Umsetzung jedoch eine hohe Reinheit der Ausgangsgase und eine dementsprechend aufwändige vorgeschaltete Gasreinigung.

Zur Optimierung von BGA durch ein nachgeschaltetes Power-to-Gas Verfahren wurden deshalb Isolate aus Termiten und der thermophilen Biogasanlage Butschen in Viersen gewonnen, identifiziert und teilweise auf ihre Einsatzfähigkeit in einem Hochleistungs-Methanreaktor überprüft. Aufgrund der mikrooxygenen Bereiche im Hinterdarm von Termiten (Abschnitt 1.6) wurde davon ausgegangen, dass die dort vorkommenden Archaea eine größere Toleranz gegenüber Sauerstoff haben und somit weniger störanfällig für den Einsatz in einem Hochleistungs-Methanreaktor sind. Thermophile Biogasanlagen zeichnen sich im Vergleich zu mesophilen Anlagen durch höhere Umsatzraten aus. Die daraus gewonnenen methanogenen Archaea könnten sich in Bezug auf die Methanproduktion beim Einsatz in einer Power-to-Gas Anlage als vorteilhaft erweisen.

3. ERGEBNISSE

3.2.1 Biodiversität methanogener Archaea in *Mastotermes darwiniensis*

Um ein geeignetes Medium zur Isolierung von methanogenen Archaea aus Termiten zu finden, wurde zunächst überprüft, welche Organismen in der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* und *Incisitermes marginipennis* vorkommen. Für die Diversitätsanalyse wurde zuerst genomische DNA aus Därmen bzw. Darminhalt von Arbeitern und Soldaten der Termiten gewonnen. Mit dem archaeenspezifischen Primerpaar Met86f/Ar1530r wurde das 16S rRNA-Gen aus dem genomischen DNA-Extrakt amplifiziert und in einer Klonierung eingesetzt. Klone, die das archaeenspezifische Amplifikat enthielten, wurden im Anschluss der ARDRA unterzogen. Anhand der entstandenen Fingerprintmuster wurden Klone in Gruppen zusammengefasst (Abbildung 3.7).

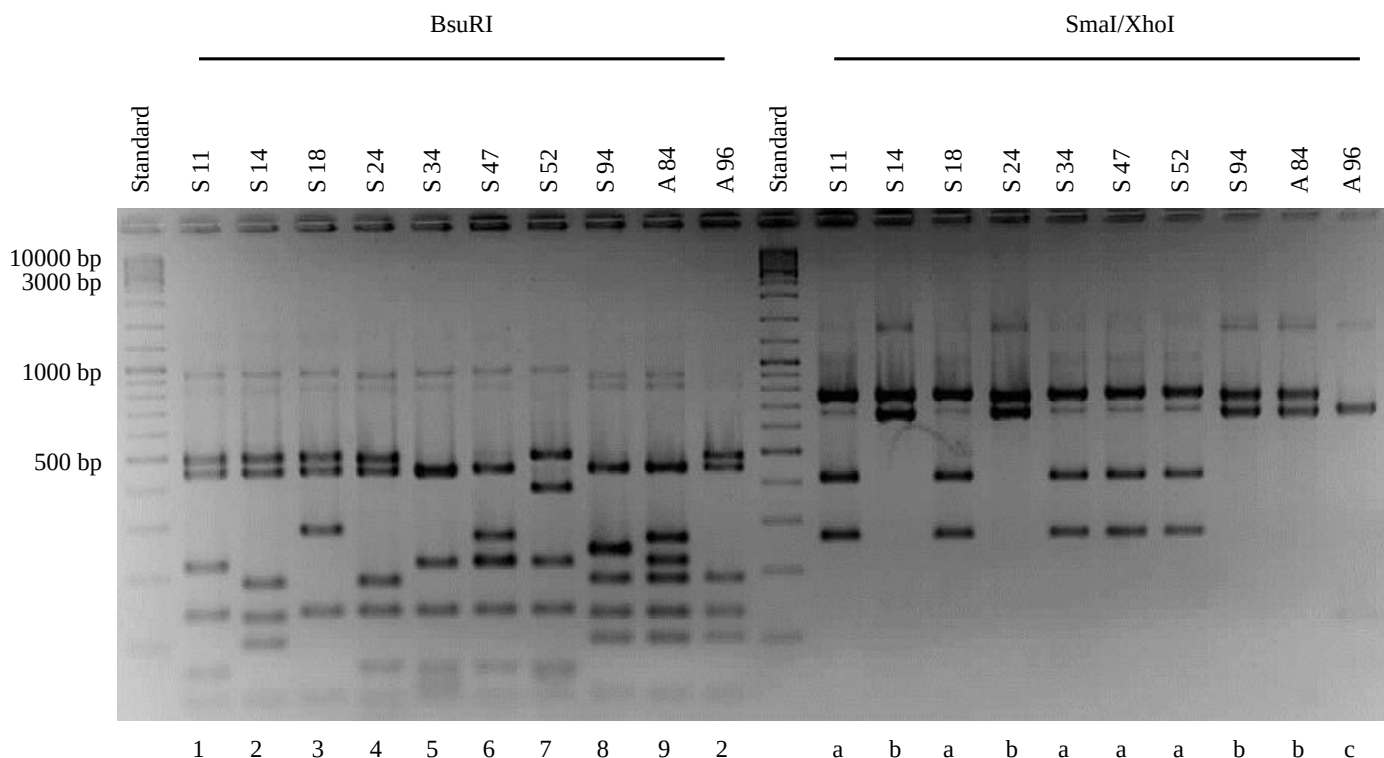


Abbildung 3.7: Restriktionsmuster der 16S rDNA der Termiten-Klonbibliothek nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Klone wurden aus Arbeitern (A) und Soldaten (S) der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* erhalten. Ein Einfachverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym BsuRI, der Doppelverdau erfolgte mittels SmaI/XhoI. Als Standard diente GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot).

Für jede Gruppe wurde ein repräsentativer Klon über die 16S rDNA-Sequenz identifiziert (Tabelle 3.3). Eine Diversitätsanalyse methanogener Archaea in *Incisitermes marginipennis* war nicht gelungen.

Tabelle 3.3: Identifikation methanogener Archaea aus der Termiten *Mastotermes darwiniensis* mittels erhaltener Restriktionsmuster nach vorangegangener ARDRA der Klonbibliothek. Ergebnisse der Sequenzanalyse nach Abgleich mit den Datenbanken ¹GenBank Nucleotide collection und ²EzTaxon Server 2.1.

Muster	Nächste(r) verwandte(r) Art bzw. (Typ-)Stamm ¹	[%]	Nächster verwandter Typ-Stamm ²	[%]	Fragmentlänge des 16S rRNA-Gens [bp]	Arbeiter/Soldaten (Anzahl Klon/Umfang Klonbibliothek) [%]
1 a	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	94,0	<i>Methanobrevibacter filiformis</i> RFM-3 ^T	93,9	1414	16,3 / 76,7
2 b	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	95,0	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> DH-1 ^T	95,9	1403	85,7 / 9,6
2 c	<i>Methanobrevibacter curvatus</i> RFM-2 ^T	96,0	<i>Methanobrevibacter cuticularis</i> RFM-1 ^T	93,4	1316	1,4 / 0
3 a	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	93,0	<i>Methanobrevibacter filiformis</i> RFM-3 ^T	96,9	1327	0 / 4,1
4 b	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> AZ	96,0	<i>Methanobrevibacter curvatus</i> RFM-2 ^T	96,3	1077	0 / 1,4
5 a	<i>Methanobrevibacter curvatus</i> RFM-2 ^T	94,0	<i>Methanobrevibacter curvatus</i> RFM-2 ^T	93,7	821	0 / 1,4
6 a	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	94,0	<i>Methanobrevibacter filiformis</i> RFM-3 ^T	96,9	1394	0 / 2,7
7 a	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	93,0	<i>Methanobrevibacter filiformis</i> RFM-3 ^T	93,9	1339	0 / 2,7
8 b	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	95,0	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> DH-1 ^T	95,9	1317	0 / 1,4
9 b	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	96,0	<i>Methanobrevibacter curvatus</i> RFM-2 ^T	96,3	1370	1,4 / 0

3.2.2 Charakterisierung der Isolate aus Termiten und einer thermophilen BGA

Es konnten Isolate aus zwei verschiedenen niederen Termiten und Isolate aus der thermophilen Biogasanlage Butschen in Viersen (BGA Butschen, Viersen) gewonnen werden.

Die Isolate, die aus dem Termitendarm der niederen Termiten *Incisitermes marginipennis* und *Mastotermes darwiniensis* gewonnen wurden, konnten nach Extraktion der DNA der ARDRA (Abbildung 3.8) unterzogen werden.

3. ERGEBNISSE

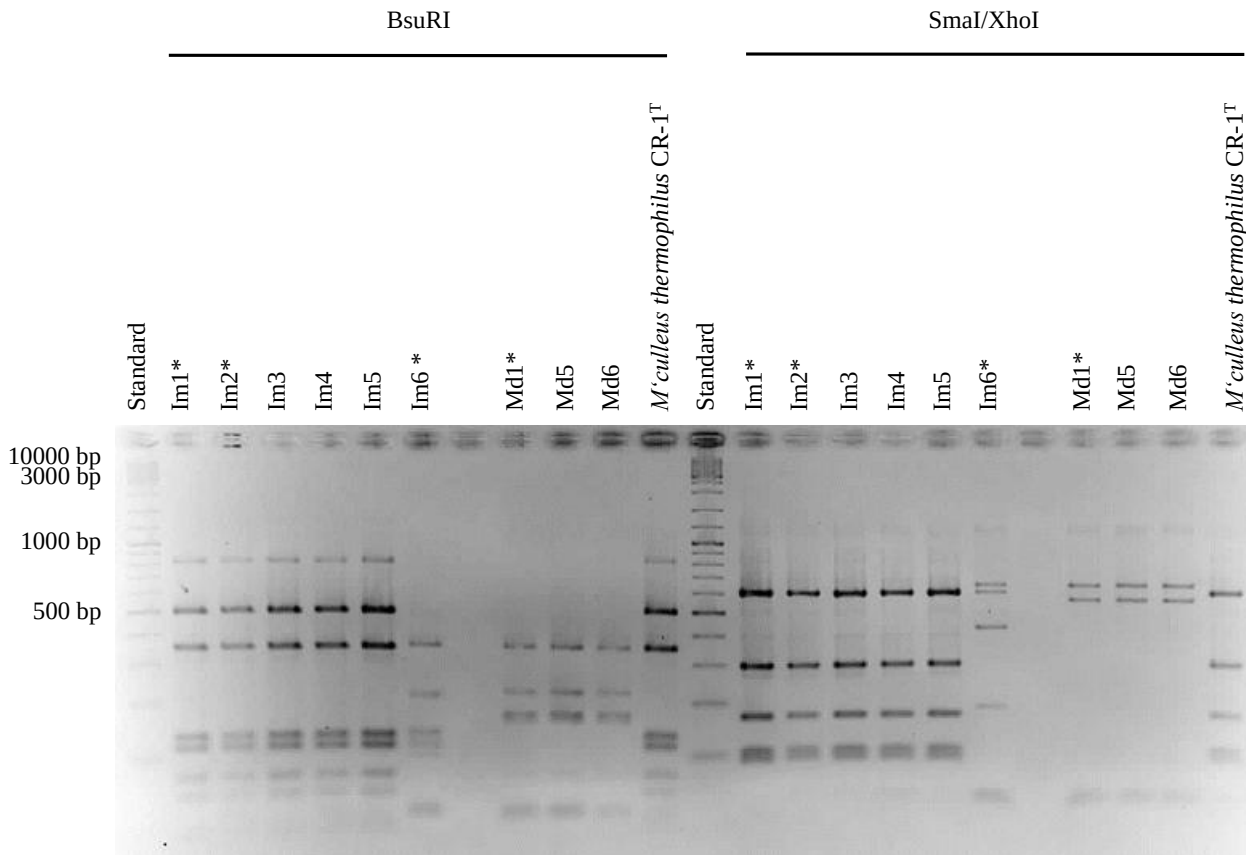


Abbildung 3.8: Restriktionsmuster der 16S rDNA der archaeellen Termiten-Isolate aus *Incisitermes marginipennis* (Im1-6) und *Mastotermes darwiniensis* (Md1, 5 und 6) sowie des Typstamms *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T (*M'culleus thermophilus* CR-1^T) nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Ein Einfachverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym BsuRI, der Doppelverdau erfolgte durch SmaI/XhoI. Als Standard diente GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat.

Die Isolate Im1-6 weisen dasselbe Restriktionsmuster wie der Typstamm *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T (*M'culleus thermophilus*) (*M'* = Methano) auf. Neben der Einordnung der Isolate durch die Restriktionsmuster mittels ARDRA erfolgte eine genauere Zuordnung über die SAPD-PCR (Abbildung 3.9).

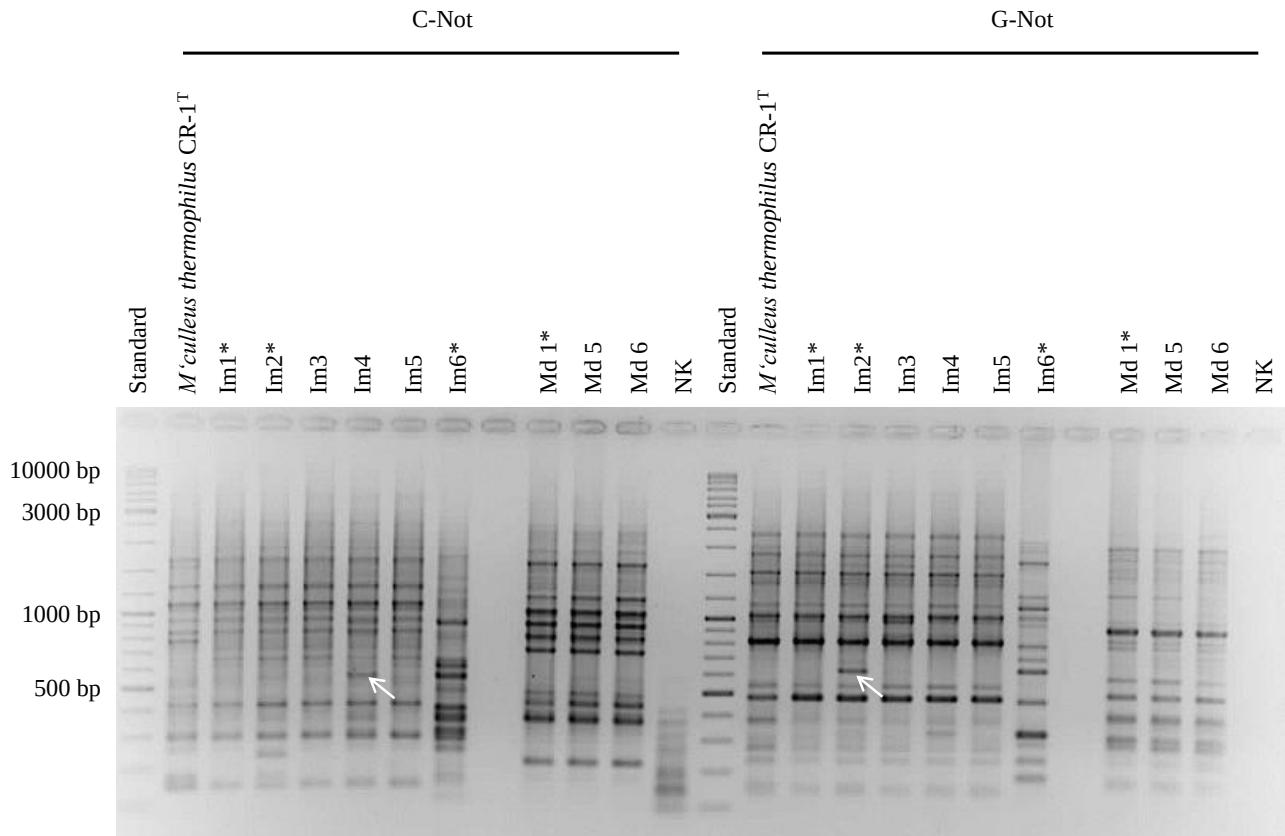


Abbildung 3.9: SAPD-PCR Fingerprintmuster genomischer DNA der Termitenisolate und dem Typstamm *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T (*M'culleus thermophilus* CR-1^T) nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Primer dienten C- und G-Not. NK= Negativkontrolle; Standard = GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat, weißer ↗ = zusätzliche Bande.

Aus *Incisitermes marginipennis* wurden sechs Isolate (Im1-6) erhalten, die sich in zwei Gruppen aufteilten. Aus *Mastotermes darwiniensis* wurden drei Isolate (Md1, 5 und 6) gewonnen, für die alle das gleiche Muster erhalten wurde. Bis auf das Isolat Im6 wurden alle aus Termiten gewonnenen Isolate mittels des Mediums 311a erhalten. Das Isolat Im6 wurde in Medium 734 angereichert, ein Wachstum in Medium 311a war jedoch ebenfalls möglich. Je ein Isolat des gleichen Musters wurde mit einem Primer mit Spezifität für Archaea sequenziert (Abbildung 3.8 und 3.9, Kennzeichnung durch *) und mit den Datenbanken GenBank Nucleotide collection und EzTaxon Server 2.1 verglichen. Fünf der Isolate aus *Incisitermes marginipennis* (Im1-5) wurden als *Methanoculleus thermophilus* identifiziert, nachdem die Isolate Im1 und Im2 mit einer 100%igen Sequenzidentität zugeordnet werden konnten. Die durch den Pfeil markierte zusätzliche Bande im Muster von Im2 hatte keine Bedeutung für die Zuordnung durch die Sequenzierung. Gleiches lässt sich auch für Im4 annehmen. Im Unterschied zu dem Typstamm von *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T, der ein optimales Wachstum bei

3. ERGEBNISSE

55 °C zeigt, war ein Wachstum der Isolate Im1-5 bei 55 °C nicht möglich. Das Isolat Im6 konnte über die Datenbank GenBank Nucleotide Collection mit einer 99%igen Sequenzidentität *Methanosarcina barkeri* zugeordnet werden. Über die Datenbank EzTaxon Server 2.1 ergab sich eine etwa 99%ige Ähnlichkeit mit *Methanosarcina horonobensis*. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die archaeellen Isolate aus der Termiten *Mastotermes darwiniensis* konnten als *Methanobacterium beijingense* identifiziert werden. Für das sequenzierte Isolat Md1 ergab sich jeweils eine 99%ige Sequenzidentität über die Datenbanken GenBank Nucleotide collection und EzTaxon Server 2.1.

Die Sequenzen der Isolate Im1, Im2, Im6 und Md1 sind bei GenBank unter folgenden Einträgen hinterlegt: MF407517 (Im1), MF407518 (Im2), MF407519 (Im6) und MF407520 (Md1).

Tabelle 3.4: Zuordnung der Isolate aus den Termiten *Incisitermes marginipennis* und *Mastotermes darwiniensis* sowie der thermophilen Biogasanlage Butschen in Viersen zu den nächsten verwandten Typstämmen methanogener Archaea.

Ort der Isolation	Stamm	Nächster verwandter (Typ-)Stamm ¹	[%]	Nächster verwandter (Typ-)Stamm ²	[%]	Fragmentlänge des 16S rRNA-Gens [bp]	Anzahl/Gesamte Isolate
<i>Incisitermes marginipennis</i>	Im1	<i>Methanoculleus thermophilus</i> JB-1/CR-1 ^T	100,0	<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	100,00	801	5/6
<i>Incisitermes marginipennis</i>	Im2	<i>Methanoculleus thermophilus</i> JB-1/CR-1 ^T	100,0	<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	100,00	801	5/6
<i>Incisitermes marginipennis</i>	Im6	<i>Methanosarcina barkeri</i> HWS2.1	99,0	<i>Methanosarcina horonobensis</i> HB-1 ^T	99,14	818	1/6
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Md1	<i>Methanobacterium beijingense</i> 4-1/8-2 ^T	99,0	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2 ^T	99,08	970	3/3
BGA Butschen, Viersen	SIV6	<i>Methanothermobacter wolfeii</i> ^T	100,0	<i>Methanothermobacter wolfeii</i> ^T	100,00	811	6/18
BGA Butschen, Viersen	V2.1	<i>Methanoculleus thermophilus</i> JB-1/FR-4	100,0	<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	100,00	811	12/18
BGA Butschen, Viersen	V2.5	<i>Methanoculleus thermophilus</i> JB-1/FR-4	99,0	<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	100,00	761	12/18
BGA Butschen, Viersen	V2.8	<i>Methanoculleus thermophilus</i> JB-1/CR-1 ^T	100,0	<i>Methanoculleus thermophilus</i> CR-1 ^T	100,00	791	12/18

¹ GenBank Nucleotide collection

² EzTaxon Server 2.1.

Aus der thermophilen Biogasanlage wurden 18 Isolate gewonnen, die sich nach ARDRA (Abbildung 3.10 und 3.11) und SAPD-PCR (Abbildung 3.12) zwei verschiedenen Gruppen zuordnen ließen.

12 der Muster konnten nach Sequenzierung (Kennzeichnung durch *) als *Methanoculleus thermophilus* identifiziert werden und sechs (V1, 3-6 und SIV6) der Muster wurden *Methanothermobacter wolfeii* zugeordnet (Tabelle 3.4). Die Sequenzidentität bei den Datenbanken GenBank Nucleotide collection und EzTaxon Server 2.1 lag jeweils bei 100 % (99 % für V2.5 bei GenBank Nucleotide collection). Die Sequenzen der Isolate SIV6, V2.1, V2.5 und V2.8 sind bei GenBank unter folgenden Einträgen hinterlegt: KT368944 (SIV6), KT368945 (V2.1), KT368946 (V2.5) und KT368947 (V2.8).

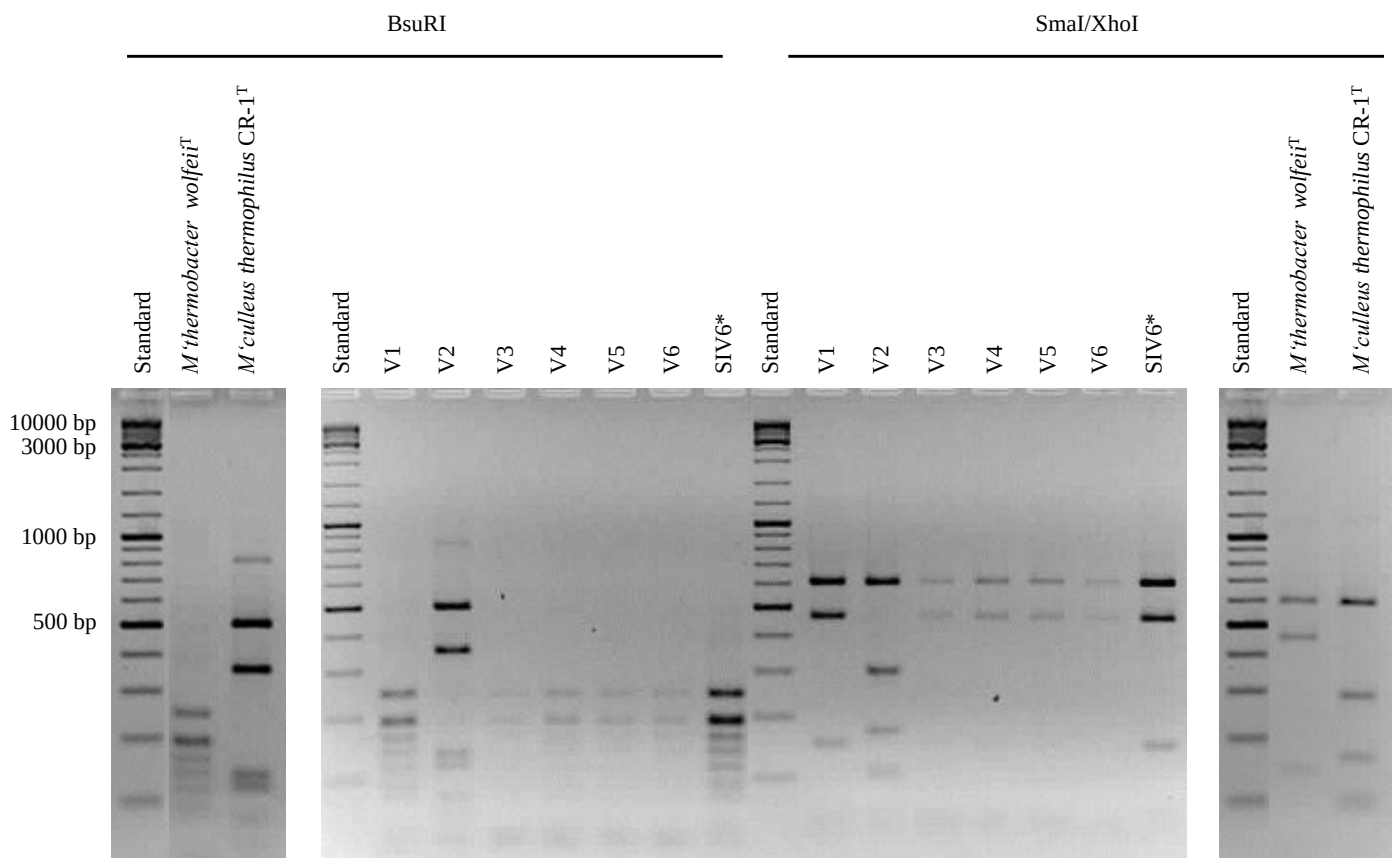


Abbildung 3.10: Restriktionsmuster der 16S rDNA von Isolaten thermophiler Archaea aus der BGA Butschen, Viersen und der Referenz-Typstämme *Methanothermobacter wolfeii*^T (*M'thermobacter wolfeii*^T) *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T (*M'culleus thermophilus* CR-1^T) nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Ein Einfachverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym BsuRI, der Doppelverdau erfolgte durch SmaI/XhoI. Als Standard diente GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat.

3. ERGEBNISSE

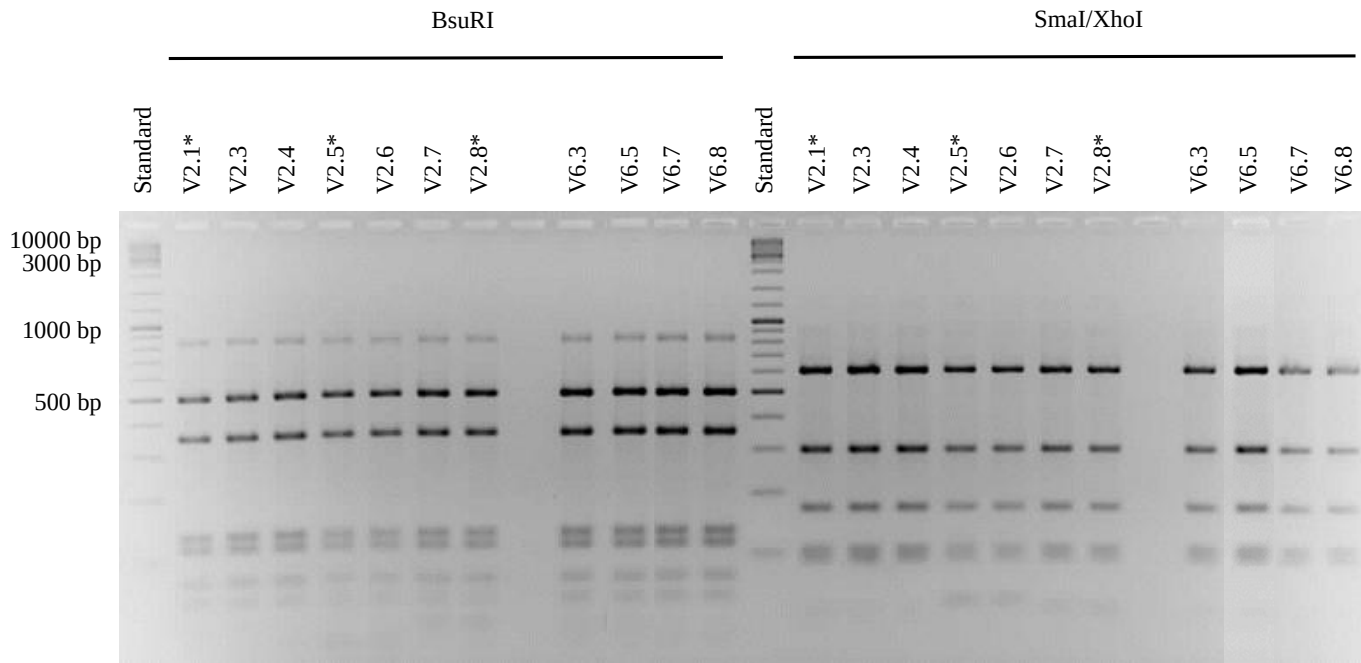


Abbildung 3.11: Restriktionsmuster der 16S rDNA der -Isolate aus der BGA Butschen in Viersen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Ein Einfachverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym BsuRI, der Doppelverdau erfolgte durch SmaI/XhoI. Als Standard diente GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat.

Eine weitere molekularbiologische Analyse elf der 18 Isolate erfolgte wie auch schon für die Isolate aus Termiten über die SAPD-PCR (Abbildung 3.12).

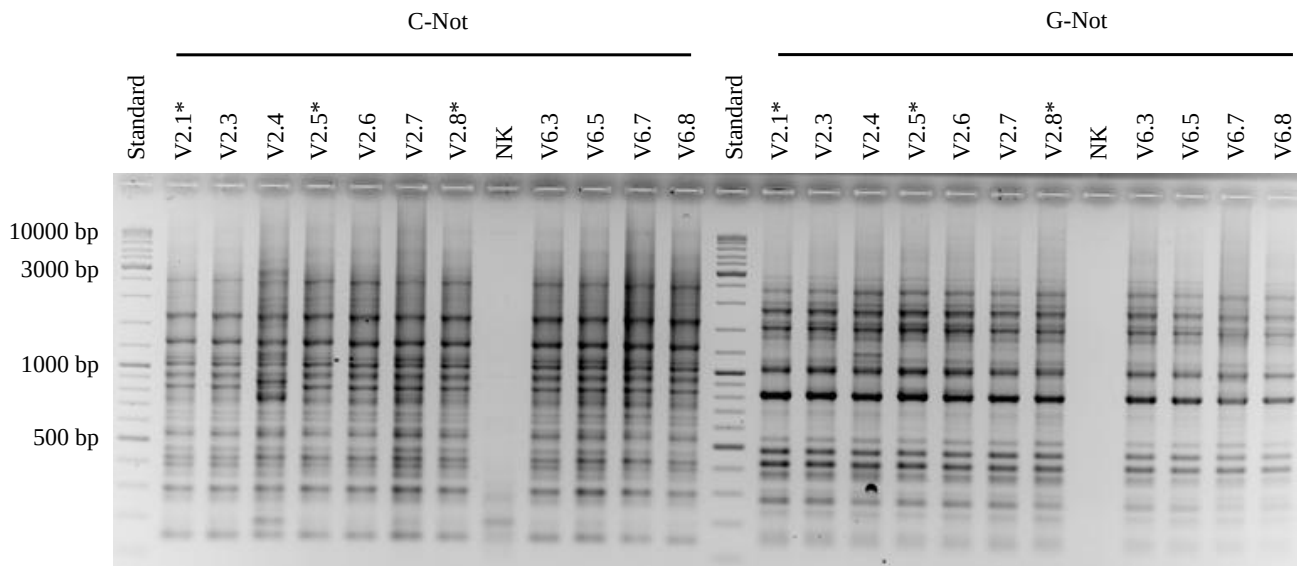


Abbildung 3.12: SAPD-PCR Fingerprintmuster genomischer DNA thermophiler Isolate aus der BGA Butschen in Viersen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Primer dienen C- und G-Not. NK= Negativkontrolle; Standard = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat

3.2.3 SAPD-PCR der Gattung *Methanothermobacter* und des Isolates SIV6

Die Gattung *Methanothermobacter* (*M'thermobacter*), zu der aktuell acht verschiedene Typstämme gezählt werden, wurde mittels SAPD-PCR näher charakterisiert. Des Weiteren wurde das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 aus der thermophilen BGA Butschen in Viersen über diese Methode dieser Gattung zugeordnet. Nach vorangegangener DNA-Extraktion wurden die acht verschiedenen Stämme der Gattung *Methanothermobacter* zusammen mit dem Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 der SAPD-PCR unterzogen (Abbildung 3.13).

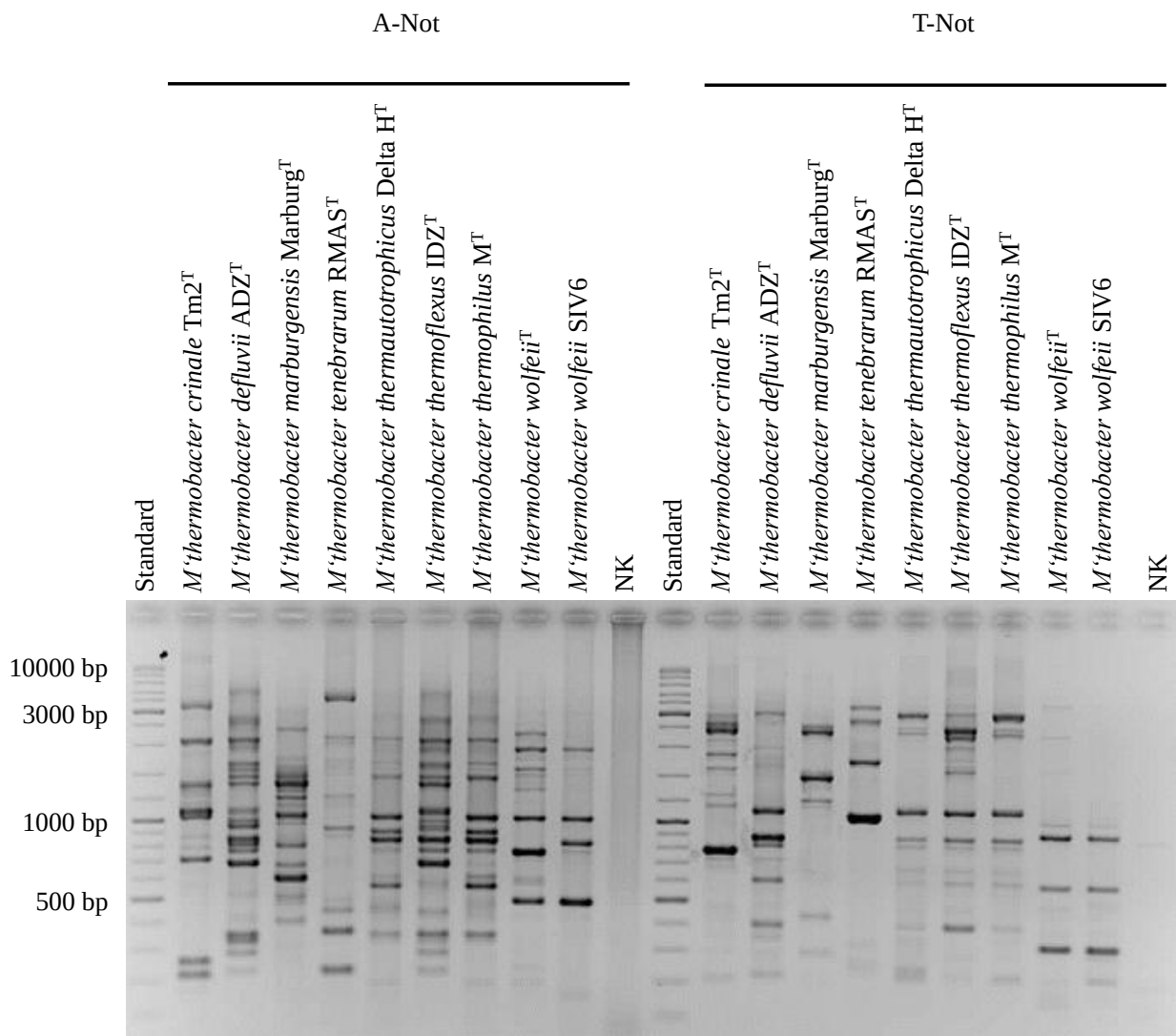


Abbildung 3.13: SAPD-PCR Fingerprintmuster genomischer DNA von Typstämmen der Gattung *Methanothermobacter* (*M'thermobacter*) sowie des Isolats *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Primer dienten A- und T-Not. NK= Negativkontrolle; Standard = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot). * = sequenziertes Isolat. (Vgl. auch Tabelle 7.6, Anhang).

Zur weiteren Charakterisierung der Gattung *Methanothermobacter* wurde für jede Bande eines SAPD-PCR-Musters die Fragmentlänge mittels der Software Bio1D bestimmt. Die Amplifikationsprodukte in bp, die mit den Primern A-Not und T-Not erhalten wurden, sind tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 7.6, Anhang).

Bis auf die beiden Arten *M'thermobacter thermautotrophicus* Delta H^T und *M'thermobacter thermophilus* M^T konnten speziesspezifische Muster für alle bisher bekannten Arten der Gattung *M'thermobacter* generiert werden.

Das Muster des Isolats *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 zeigte mit dem Primer A-Not geringfügige Unterschiede zum generierten Bandenmuster des Typstamms *Methanothermobacter wolfeii*^T. Die Muster, die mit dem Primer T-Not generiert wurden, sind jedoch weitgehend identisch.

3.2.4 Methanproduktion methanogener Typstämme und des Isolates SIV6

Nachdem methanogene Archaea aus zwei verschiedenen niederen Termiten und der thermophilen BGA Butschen in Viersen isoliert und identifiziert wurden, sollten diese teilweise sowie diverse Typstämme auf ihren potentiellen Einsatz für das Power-to-Gas Verfahren überprüft werden.

Dazu wurde die Methanproduktion sieben verschiedener Typstämme aus den Gattungen *Methanobacterium* (*M'bacterium*), *Methanothermococcus* (*M'thermococcus*), *Methanoculleus* (*M'culleus*), *Methanothermobacter* (*M'thermobacter*) und *Methanothermus* (*M'thermus*) sowie des Isolats *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 aus der thermophilen BGA Butschen in Viersen in je zwei parallelen Batch-Kulturen gaschromatographisch überprüft (Abbildung 3.14).

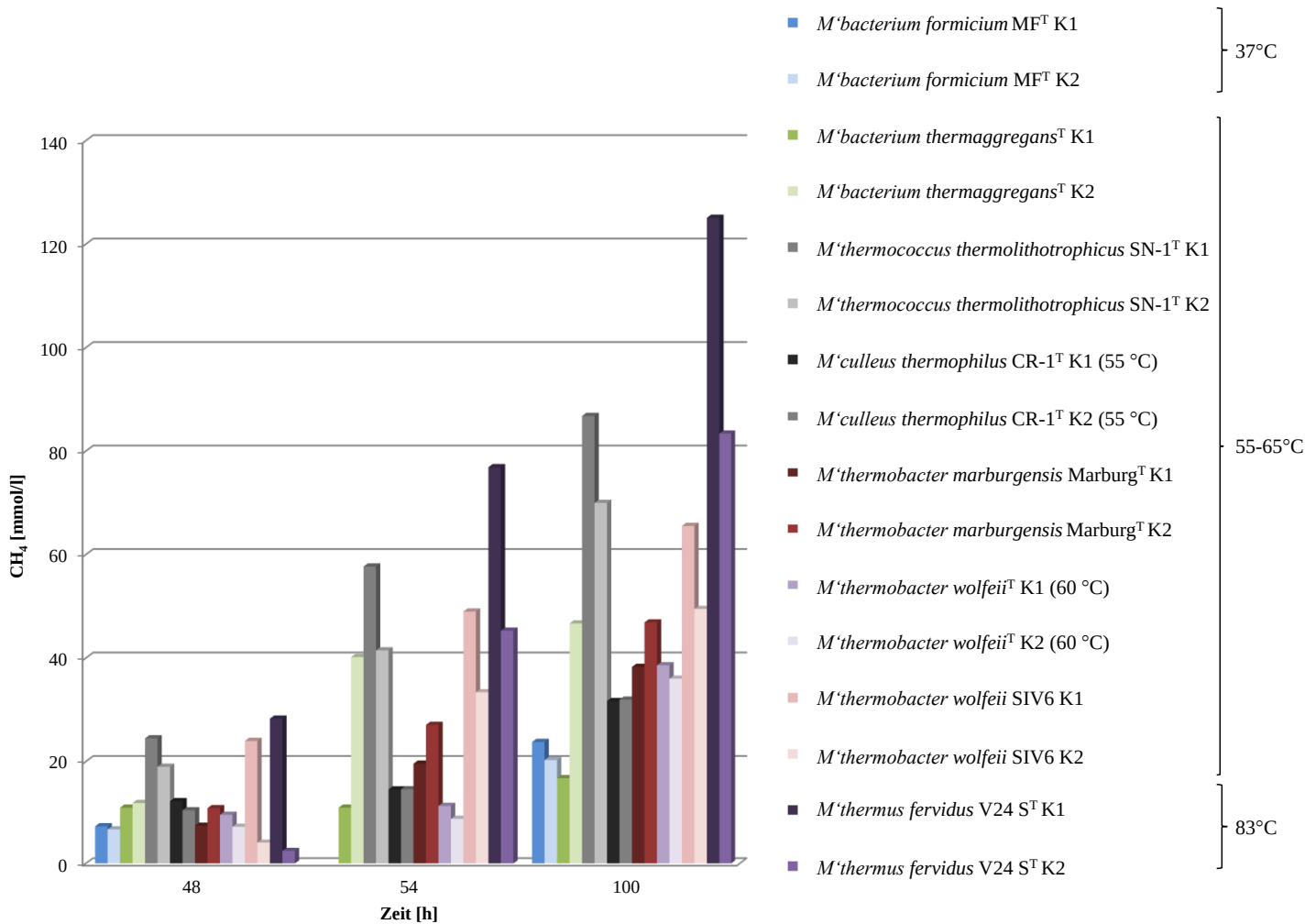


Abbildung 3.14: Methanproduktion methanogener Typstämme und des Isolats *Methanothermobacter (M'thermobacter) wolfeii* SIV6. Aufgetragen ist die Methanproduktion in mmol/l gegen die Zeit in Stunden. Es wurden von jedem Stamm immer zwei Kulturen Kultur 1 (K1) und Kultur 2 (K2) auf die Entstehung von Methan überprüft. (Vgl. auch Tabelle 7.7, Anhang).

Die Methanproduktion wurde bei der optimalen Wachstumstemperatur des jeweiligen Archaeons über einen gewissen Zeitraum ermittelt. Die Methanproduktion des mesophilen Stammes *Methanobacterium formicicum* MF^T K1 beträgt nach 100 Stunden etwa 24 mmol/l. Die Produktion des thermophilen Stammes *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T K2 beträgt nach der gleichen Zeit mit 46 mmol/l etwa das Doppelte. Die höchste Methanproduktion weist der hyperthermophile Stamm *Methanothermobacter thermophilus* V24 S^T K1 mit etwa 125 mmol/l auf. Die Produktion ist im Vergleich zu dem mesophilen Stamm *Methanobacterium formicicum* MF^T K1 um den Faktor 5,2 gesteigert und im Vergleich zu dem thermophilen Stamm *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T K2 um ein 2,7-faches höher.

3. ERGEBNISSE

Innerhalb der Organismen, deren optimale Wachstumstemperatur zwischen 55 und 65 °C liegt, kommt es zu erheblichen Unterschieden in der Methanproduktion. So erreichen *Methanoculleus thermophilus* CR-1^T, *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T und *Methanothermobacter wolfeii*^T nach 100 h nur knapp 1/3 bis etwa das doppelte der Methanproduktion von *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T. *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T sowie das Eigenisolat erreichen nahezu die gleiche Methanproduktion wie das hyperthermophile Archaeon *Methanothermus fervidus* V24 S^T K 2.

Auffällig ist des Weiteren, dass auch zwischen den Kulturen 1 und 2 (K 1 und 2) desselben Stammes unterschiedliche Methanproduktionen gemessen wurden. Den größten Unterschied zeigt dabei *Methanobacterium thermaggregans*^T. Aber auch die beiden Kulturen von *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T und *Methanothermus fervidus* V24 S^T zeigen erhebliche Unterschiede.

Um die Auswirkungen und mögliche Steigerung der Methanproduktion zu überprüfen, wurde dem Medium DSMZ 287 mod. zusätzlich 20 % [v/v] Reaktorfiltrat (Rf) (DSMZ 287 mod. + Rf) oder 20 % [v/v] Fermenterinhalt (Fi) (DSMZ 287 mod. + Fi) zugefügt. Die Methanproduktion von *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T (*M'thermobacter marburgensis* Marburg^T) wurde in je zwei parallel stattfindenden Ansätzen bei 65 °C über einen gewissen Zeitraum ermittelt (Abbildung 3.15).

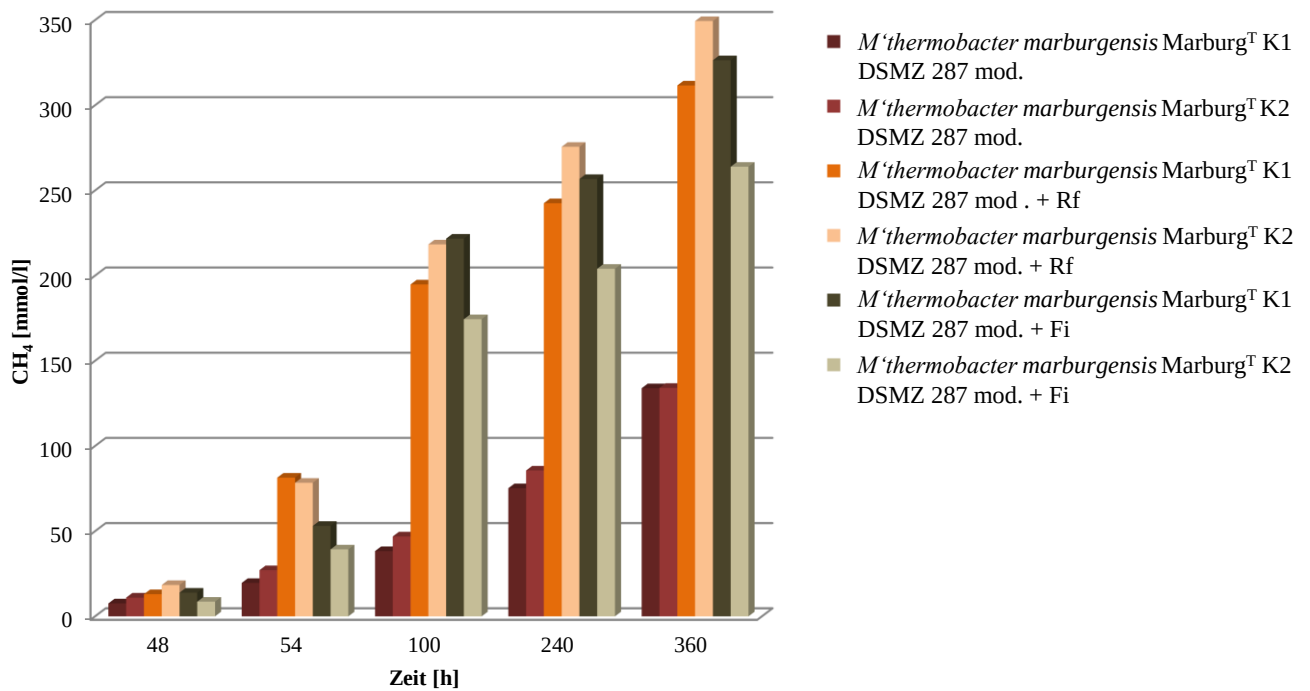


Abbildung 3.15: Methanproduktion von *M'thermobacter marburgensis* Marburg^T in Medium 287 mod., 287 mod. mit Reaktorfiltrat (DSMZ 287 mod. + Rf) und in Medium 287 mod. mit Fermenterinhalt (DSMZ 287 mod. + Fi). Aufgetragen ist die Methanproduktion in mmol/l gegen die Zeit in Stunden. (Vgl. auch Tabelle 7.8, Anhang).

Es zeigte sich, dass die Methanproduktion sowohl durch das Reaktorfiltrat als auch durch den Fermenterinhalt um mindestens das Doppelte gesteigert werden konnte.

In Kooperation mit dem Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (PFI) wurden die Typstämme *Methanobacterium formicicum* MF^T und *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T sowie das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 in einem Methanreaktor auf ihre Methanproduktion überprüft. Die folgenden Ergebnisse (Tabelle 3.5) wurden durch [REDACTED] übermittelt.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.5: Ergebnisse aus dem Methanreaktor für die beiden Typstämme *Methanobacterium formicicum* MF^T und *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T sowie das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6. Aufgeführt sind die spezifische Gasabbaurate sowie CH₄-Bildungsrate in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen und Druckunterschieden.

Stamm	Temperatur [°C]	Druck [bar]	Spezifische Gasabbaurate [NI/h je m ³]	Spezifische CH ₄ - Bildungsrate [NI/h je m ³]
<i>Methanobacterium formicicum</i> MF ^T	37	2,25	90	18
	43	6,50	320	73
<i>Methanothermobacter marburgensis</i> Marburg ^T	57	5,00	912	182
	64	6,50	1450	-
	64	6,50	1660	326*
<i>Methanothermobacter wolfeii</i> SIV6	62	6,50	1788	359

* optimiertes Medium

NI = Normliter

- keine Daten vorliegend

Methanobacterium formicicum MF^T zeigte bei einer Temperatur von 37 °C und einem Druck von 2,25 bar eine spezifische Methanbildungsrate von 18 NI/h je m³. Bei einer Erhöhung der Temperatur von 37 auf 43 °C und des Druckes von 2,25 auf 6,50 bar konnte die spezifische Methanbildungsrate um fast das 4-fache gesteigert werden.

Eine Erhöhung der Temperatur von 57 auf 64 °C sowie des Druckes von 5,00 auf 6,50 bar führte bei *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T unter Benutzung eines optimierten Mediums zu einer Steigerung der Methanbildungsrate um etwa das 1,8-fache.

Das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 zeigte bei einer Temperatur von 62 °C und einem Druck von 6,50 bar die höchste Methanbildungsrate im Vergleich zu den beiden getesteten Typstämmen.

Das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 ist zudem in einem Hochleistungs-Methanreaktor (Abbildung 3.16) im Einsatz.



**Abbildung 3.16:
Hochleistungs-
Methanreaktor
in Pirmasens**

4. Diskussion

4.1 Bioethanol-Herstellung aus Stroh durch den kombinierten Einsatz von Thermodruckhydrolyse (TDH) und neuartigen Enzymquellen

Lignocellulosehaltige Biomasse ist ein erneuerbarer Rohstoff, der nicht mit der Nahrungs- und Futtermittelherstellung konkurriert und in ausreichender Menge auf der Welt vorhanden ist. Lignocellulosehaltige Biomasse stellt somit ein großes Potential bei der Nutzung erneuerbarer Energien dar.

Aufgrund des teilweise kristallinen Charakters von Cellulose stellt sich der Abbau dieses Polymers als schwierig dar. Die erfolgreiche Nutzung lignocellulosehaltiger Biomasse als erneuerbarer Energieträger ist abhängig von der Entwicklung ökonomisch machbarer Technologien zur Cellulase-Produktion (Kuhad *et al.*, 2016). Zur industriellen Nutzung ist man deshalb auf der Suche nach neuartigen und potenten Cellulasen, die sich durch eine hohe thermische Stabilität, eine Aktivität bei niedrigen pH-Werten, einer hohen Umsatzrate, einer geringen Hemmung durch Endprodukte und die bei der Vorbehandlung potentiell anfallenden toxischen Substanzen, auszeichnen. In vorliegender Arbeit sollte Stroh als Ausgangsmaterial und die Thermodruckhydrolyse (TDH), die am Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (PFI) optimiert wurde (Ballmann *et al.*, 2013; Gasser *et al.*, 2014), als Methode der Vorbehandlung dienen.

In der Natur stellen Termiten neben Pilzen und dem Pansen von Wiederkäuern ein effizientes System zur Umsetzung von Lignocellulose dar und ermöglichen einen Abbau des Biomaterials innerhalb von 24 Stunden (König *et al.*, 2013). Aufgrund dessen wurden Termiten als Quelle zur Isolierung neuartiger Cellulasen ausgewählt.

4.1.1 Hefeisolat *Saitozyma flava* OO2 aus niederen Termiten als Cellulase-Produzent

Isolate aus Termiten und einem Pilz, welche zu Beginn dieser Arbeit in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) vorlagen, wurden erneut mittels Azo-Carboxymethyl-Cellulose-Test (Azo-CMC-Test) auf ihre cellulolytische Aktivität gescreent (Tabelle 3.1). Es handelt sich dabei um einen Test, der spezifisch für eine Endocellulase-Aktivität ist. Die Hefe *Saccharomyces arboricolus* zeigte zuvor eine cellulolytische Aktivität im Azur-Cellulose-Test. Alle anderen Stämme zeigten eine cellulolytische Aktivität im Kongorot-Test (Wenzel *et al.*, 2002). Beide *Bacillus megaterium* Stämme aus der niederen Termiten *Zootermopsis*

4. DISKUSSION

angusticollis sowie die Hefe *Saccharomyces arboricolus*, die von Fruchtkörpern der Chinesischen Morchel *Auricularia polytricha* isoliert wurde, zeigten keine Endocellulase-Aktivität im Azo-CMC-Test. Die zuvor beobachtete cellulolytische Aktivität konnte somit nicht bestätigt werden. Carboxymethylcellulose (CMC) ist ein Substrat für Endoglucanasen und kann deshalb als Test auf Endoglucanase- und β -Glucosidase-Aktivität verwendet werden (Pointing, 1999). Die fehlende cellulolytische Aktivität kann somit auf die Spezifität des Azo-CMC-Tests zurückgeführt werden. Als weitere Ursache ist die unterschiedliche Durchführung der Methoden zu nennen. Während die Mikroorganismen im Azur-Cellulose- und Kongorot-Test auf Azur-Cellulose- bzw. CMC-haltigem Medium wachsen, wird im Azo-CMC-Test der potentiell cellulolytische Überstand zehn Minuten mit CMC-haltigem Substrat inkubiert. Die geringe Aktivität, die bei den beiden Hefen *Trichosporon mycotoxinivorans* aus der niederen Termite *Mastotermes darwiniensis* und *Papiliotrema odontotermitidis* aus der höheren Termite *Odontotermes obesus* festgestellt wurde, lässt sich auf die gleichen Gründe zurückführen.

In der Arbeit von Cho *et al.* (2010) zeigten cellulolytische Bakterienisolate, die aus der niederen Termite *Reticulitermes speratus* gewonnen wurden, eine geringe Aktivität in einem künstlichen Medium. Die Autoren gehen davon aus, dass die cellulolytische Aktivität auf die termiteneigenen Enzyme und die der Flagellaten zurückzuführen ist. Metagenomdaten aus höheren Termiten, denen Flagellaten fehlen, zeigen jedoch eine vielfältige Zusammenstellung an bakteriellen Genen für die Hydrolyse von Cellulose und Xylose (Warnecke *et al.*, 2007). Des Weiteren zeigen Bakterienisolate, die ebenfalls aus einer höheren Termite stammen, eine signifikante hydrolytische Aktivität (Taechapoempol *et al.*, 2011). Der Mitteldarm wurde als der Hauptort der cellulolytischen Aktivität in höheren Termiten betrachtet, denn an dieser Stelle werden die termiteneigenen Enzyme sezerniert. Im Vergleich zum Mitteldarm konnte jedoch eine bis zu 59%ige Cellulase-Aktivität für kristalline Cellulose im Hinterdarm gefunden werden (Tokuda & Watanabe, 2007).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass das Hefeisolat *Saitozyma flava* OO2 (*S. flava* OO2), das aus der höheren Termite *Odontotermes obesus* stammt, eine deutliche Endocellulase-Aktivität im Azo-CMC-Test zeigte. *S. flava* war ursprünglich unter dem

Namen *Cryptococcus flavus* bekannt, wurde jedoch zwischenzeitlich umbenannt (Liu *et al.*, 2015).

4.1.2 Eigenschaften der isolierten Cellulase Cel1

Die höchste Aktivität der Cellulase war in der stationären bzw. in der Absterbephase der Hefe *S. flava* OO2 erreicht (Abbildung 3.1). Das Aufreinigungsschema (Tabelle 3.2) der Cellulase Cel1 zeigt, dass die Gesamtproteinmenge und die spezifische Proteinmenge abnimmt, während die spezifische Aktivität ansteigt, was für eine Erhöhung der Reinheit spricht (Ermittlung der spezifischen Aktivität siehe Abschnitt 2.7.1). Dies wurde durch das Auftragen der Proben im SDS-Gel bestätigt (Abbildung 3.2). Die geringfügige Abnahme der spezifischen Aktivität nach der FPLC könnte an dem verwendeten Puffer liegen.

Zur weiteren Charakterisierung der Endocellulase Cel1 wurde der Kulturüberstand nach vorangegangener Zentrifugation und Sterilfiltration genutzt. Die darin enthaltene Cutinase sollte keinen Einfluss auf die Aktivität der Cellulase haben. Cutinasen, die der α/β -Hydrolase Superfamilie angehören, hydrolysieren Esterbindungen des Pflanzenpolymers Cutin, aber auch anderer Polymere (Chen *et al.*, 2013). Industriell verwendete Cellulasen und Cellulasemixturen sind aufgrund der Kostenersparnis ebenfalls nicht hoch aufgereinigt.

Für die Cellulase Cel1 konnte eine Aktivität in einem breiten Temperatur-Bereich zwischen < 30 und > 80 °C mit einem Temperatur-Optimum bei 60 °C ermittelt werden (Abbildung 3.6 B). Die Cellulase war in einem pH-Bereich zwischen < 2 und > 6 stabil. In einem pH-Bereich zwischen $< 3,5$ und $> 5,5$ zeigte die Endocellulase eine Aktivität mit einem Optimum zwischen 4 und 4,5 (Abbildung 3.6 A).

Eine aufgereinigte Cellulase, die ebenfalls aus einer cellulolytischen Hefe gewonnen wurde, zeigte eine Aktivität in einem Temperaturbereich von 4 bis 60 °C und in einem pH-Bereich zwischen 3 und 9 mit einem Optimum bei pH 5 (Korish, 2003; König *et al.*, 2013). Das Hefeisolat wurde aus der Gemeinen Feuerwanze (*Pyrrhocoris apterus*) isoliert und gehört der Gattung *Trichosporon* an. *Trichosporon* ist in der Natur weit verbreitet und kommt u.a. im Boden, auf abgestorbenem Holz, in Blatthornkäfern (Scarabaeidae) und in Termiten vor (Colombo *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu der

4. DISKUSSION

aufgereinigten Cellulase aus *Trichosporon* ist die Cellulase Cel1 aus *S. flava* OO2 bei höheren Temperaturen aktiv und hat bei einem geringeren pH-Wert ihr Optimum. *S. flava* ist in der Natur ebenfalls weit verbreitet und kommt in der Luft und in Humus in Japan vor, auf Blättern des Waldsauerklees (*Oxalis acetosella*) in Russland und in der Phyllosphäre von Gras in den USA (Kurtzman *et al.*, 2011). Aus dem Stamm *S. flava* JCM 8044 (isoliert als „*Cryptococcus flavus*“), der aus Boden/von einem abgestorbenen Stück Holz in Japan isoliert wurde, konnte eine Carboxymethylcellulase (CMCase) CMCase 1 identifiziert werden (Hatano *et al.*, 1991; Cui *et al.* 1992). Das Enzym ist in einem pH-Bereich zwischen 3,5 und 6,5 aktiv mit einem Optimum bei pH 4,3. Es zeigt in einem Temperaturbereich zwischen < 40 und 80 °C Aktivität mit einem Optimum zwischen 65 und 70 °C. Eine weitere CMCase (hier zur Unterscheidung CMCase S-2 genannt) konnte aus dem Stamm *Cryptococcus* sp. S-2 beschrieben werden (Thongekkaew *et al.*, 2008).

CMCase S-2 konnte bis zur Homogenität aufgereinigt werden und hatte eine Größe von 34 kDa. Die CMCase S-2 ist in einem pH-Bereich zwischen 2 und 5,5 aktiv mit einer maximalen Aktivität bei 3,5. Das Enzym war in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 7,5 stabil und zeigte bei Temperaturen zwischen 30 und 70 °C eine Aktivität mit einem Maximum zwischen 40 und 50 °C. Mit Sequenzähnlichkeiten von 90 % zu CMCase1 und von 85 % zu CMCase S-2 zeigt die untersuchte Cellulase Cel1 aus *S. flava* OO2 eine starke Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Cellulasen aus der gleichen Hefeart, auch wenn die Organismen von unterschiedlichen Quellen isoliert wurden. Im Folgenden ist eine Übersicht der Eigenschaften der drei Cellulasen gezeigt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht der Eigenschaften der aus *Saitozyma flava* (vormals *Cryptococcus flavus*) isolierten Cellulasen.

Cellulase	Quelle	Isoliert aus	pH-Bereich (Optimum)	pH-Stabilität	Temperatur-Bereich (Optimum) [°C]	Temperatur-Stabilität	MW (kDa)	Besonderheiten
CMCase 1 ¹	<i>Saitozyma flava</i> JCM 8044 (isoliert als <i>Cryptococcus flavus</i>)	Erdboden/ abgestorbenes Stück Holz in Japan	3,5-6,5 (4,3)	-	<40-80 (65-70)	Halbwertszeit bei 98 °C, pH 6,0 30 Minuten	34	CMC und Cellobiose induziert CMCase Produktion
CMCase S-2 ²	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	-	2-5,5 (3,5)	5,5-7,5	30-70 (40-50)	50%ige Aktivität bei 90 °C, pH 3,5, 60 Minuten	34	-
Cel1	<i>Saitozyma flava</i> OO2	<i>Odontotermes obesus</i>	3,5-5,5 (4,0-4,5)	2-6	30-80 (60)	n. d.	32,8-34,3	50%ige Aktivität bei 25,5 % Cellobiose

- = keine Angabe; n.d. = nicht durchgeführt

¹ Hatano *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 1992; ² Thongekkaew *et al.*, 2008.

Bei dem Test auf Endprodukthemmung durch Cellobiose zeigte die Cellulase Cel1 bei einer Konzentration von 25,5 % Cellobiose zudem noch eine 50%ige Aktivität (Abbildung 3.6 D).

Cel1 ist aufgrund ihres Temperatur- (60 °C) und pH-Optimums (zwischen pH 4,0 und 4,5) für die industrielle Anwendung geeignet. Die enzymatische Saccharifikation, die der hier angewendeten TDH folgt, findet bei 50 °C und einem pH-Wert von 5 statt (Ballmann *et al.*, 2013). Das verwendete Strohhydrolysat wird derzeit von pH 2 auf pH 5 gepuffert (Handel, 2016). Um das Enzym bei höheren Temperaturen oder bei pH-Werten < 3 einzusetzen, müsste es zunächst per Mutagenese optimiert werden.

4. DISKUSSION

Der Einsatz von acidophilen oder auch thermophilen Enzymen könnte die Kosten für das Verfahren senken. Es sind diverse Enzyme mit diesen Eigenschaften beschrieben. Ein thermophiles Isolat, *Geobacillus* sp. R7, produziert eine thermostabile Cellulase mit hohem hydrolytischen Potential (Zambare *et al.*, 2011). Des Weiteren wird eine von *Aspergillus fumigatus* produzierte thermophile und acidophile Endoglucanase beschrieben (Grigorevski-Lima *et al.*, 2009). Diese CMCase zeigt die höchste Aktivität bei 65 °C und einem pH-Wert von 2. Eine ebenfalls acidothermophile Cellulase wurde aus *Bacillus subtilis* Stamm LFS3 mit einem Temperatur-Optimum von 60 °C und einem pH-Optimum bei 4 isoliert (Rawat & Tewari, 2011). Eine weitere thermoacidophile Endocellulase ist aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* mit einem Temperatur-Optimum von 80 °C und einem pH-Optimum von pH 4 bekannt (Eckert & Schneider, 2003). Eine thermophile Cellulase aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima* hat ein Temperatur-Optimum bei 85 °C (Lian *et al.*, 2016).

Diverse kommerziell erhältliche Cellulasen und ihre Eigenschaften wurden zusammengestellt (Tabelle 7.9, Anhang). Die meisten industriell genutzten Cellulasen stammen aus filamentösen Pilzen wie *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* und *Humicola*. Diese bilden Cellulase-Komplexe mit allen drei verschiedenen Klassen an Cellulasen in unterschiedlichem Verhältnis (Kuhad *et al.*, 2016). Ein weiterer Grund, warum der Schwerpunkt auf der Nutzung pilzlicher Cellulasen liegt, ist darin begründet, dass Pilze große Mengen an Enzymen produzieren, die sezerniert werden, sodass sie leicht aus dem Medium extrahiert und gereinigt werden können.

Aufgrund der Tatsache, dass die Cellulase Cel1 eine Bande unterhalb von 35 kDa auf dem SDS-Gel zeigt (Abbildung 3.2) und über ExPASy ProtParam tool eine Größe von 35,8 kDa für die komplette Sequenz berechnet wird, ist ein Signalpeptid, wie es von Secretome P 2.0a Server und SignalP 4.1 Server vorgeschlagen wird, sehr wahrscheinlich. Für die CMCase 1 wird eine Signalerkennungsstelle an Position 16 oder 18 vorgeschlagen (Alanin-X-Alanin; X steht für eine beliebige Aminosäure) (Cui *et al.*, 1992). Letztere Position stimmt mit der über SignalP 4.1 Server vorgeschlagenen Spaltstelle zwischen den Aminosäuren an der Position 18 und 19 (Abbildung 3.3 ↓) überein, was ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34,1 kDa ergibt. Unter Nutzung der *in silico* postulierten Spaltstelle würde eine

hydrophobe Leadersequenz aus 16 bzw. 18 Aminosäuren generiert werden. Dies entspricht den üblichen Längen von Signalpeptiden in extrazellulären Proteinen (Cui *et al.*, 1992). Signalsequenzen dienen der Sortierung von Proteinen an ihren finalen Bestimmungsort. Signalpeptide weisen kein gut definiertes Sequenzmotiv auf (Martoglio & Doberstein, 1998), zeichnen sich jedoch durch drei distinkte Regionen aus (Nielsen *et al.*, 1999). Auf eine N-terminale positiv geladene n-Region folgt eine zentrale h-Region, die durch sechs bis 15 hydrophobe Aminosäuren charakterisiert ist (Martoglio & Doberstein, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). Den Abschluss bildet eine C-terminale c-Region aus polaren und ungeladenen Aminosäuren, welche die Spaltstelle einschließt. Ob eine Prosequenz wie für CMCase 1 vorhanden ist, welche abgespalten werden muss, um den N-Terminus des reifen Proteins zu erhalten, müsste für Cel1 über eine N-terminale Sequenzierung oder über eine genauere Bestimmung der Größe mittels FPLC mit Proteinen bekannter Größe als Vergleich ermittelt werden. Die Anwesenheit von Propeptiden ist von verschiedenen extrazellulären Enzymen aus Pilzen bekannt (Barnett *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 1992). Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asparagin-X-Serin/Threonin) wie sie häufig in von Pilzen sekretierten Enzymen, welche auch verschiedene cellulolytische Enzyme beinhaltet, auftritt (Cui *et al.*, 1992), ist in der Proteinsequenz von Cel1 nicht vorhanden.

Aufgrund des potentiellen Starts des reifen Enzyms Cel1 an Position 31 der Aminosäuresequenz ist das Fehlen der ersten 32 Aminosäuren in dem 3D-Strukturmodell, was auf das Signalpeptid von *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) (Liu *et al.*, 2016) zurückzuführen ist, nicht weiter relevant. *G. lucidum* ist ein Weißfäulepilz, der aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannt ist und im Fernen Osten seit mehr als 2000 Jahren eingesetzt wird (Fang & Zhong, 2002). Als saprophytischer Organismus produziert der Pilz eine Reihe von lignocellulolytischen Enzymen, um Lignin und Cellulose abzubauen (Liu *et al.*, 2016). Endogene EG von Insekten wurden der Glykosidhydrolase-Familie (GHF) 9 zugeordnet, während Protisten ein Set aus GHF5 und GHF7 EG sowie GHF7 CBHs nutzen (Ni & Tokuda, 2013). In höheren Termiten wurden 45 GHF der mikrobiellen Gemeinschaft entdeckt (Ni & Tokuda, 2013). Cel1 gehört der Glykosidhydrolase-Familie 5 an. GHF5-Proteine sind sogenannte Retaining Enzyme, die einem klassischen Koshland double-displacement Mechanismus folgen (Koshland, 1953). Sie weisen eine klassische (α/β)₈ TIM barrel Faltung mit den zwei am aktiven Zentrum beteiligten Glutaminsäuren (E)

auf (Abbildung 3.5), die ungefähr 200 Reste in der Sequenz auseinanderliegen und an den C-terminalen Enden des β -Strangs 4 (Säure/Base) und 7 (Nucleophil) lokalisiert sind (Jenkins *et al.*, 1995). Die beiden Glutaminsäuren (E) des aktiven Zentrums in der Struktur aus *G. lucidum* sind in der Cel1-Sequenz enthalten. Die α -Helix $\alpha 8$ ist in vorliegendem Modell von Cel1 nur partiell ausgebildet.

Als Template für das 3D-Strukturmodell diene die 5D8Z Struktur der 1,4-Endoglucanase aus *G. lucidum*. Wie bereits erwähnt, sind die ersten 32 Aminosäuren in dem vorliegenden Modell (Abbildung 3.5) nicht enthalten, denn dafür ist kein Template vorhanden. Zwischen der Cellulase-Sequenz aus *S. flava* OO2 und der Template-Sequenz sind 45 % der Aminosäuren konserviert und 60 % der Aminosäuren homolog. Das rekombinante Enzym aus *G. lucidum* mit einer optimalen Aktivität bei 60 °C und pH 3-4 hydrolysiert CMC und β -Glucan, aber nicht Xylan und Mannan. Das Enzym zeigt somit ähnliche Eigenschaften wie Cel1. Das Substratspektrum von Cel1 müsste im Anschluss an diese Arbeit überprüft werden. Während die Template-Struktur vier Disulfidbrücken aufweist, sind in der Sequenz aus Cel1 nur zwei Disulfidbrücken vorhanden. Aufgrund sich verändernder Umweltbedingungen könnte die Endoglucanase von *G. lucidum* eine größere Notwendigkeit zur Stabilisierung aufweisen, wohingegen der Termitenbau und der Gastrointestinaltrakt der Termiten für die Hefe und die sezernierte Cellulase eine gleichbleibende Umgebung zur Verfügung stellt. Eine dieser Disulfidbrücken liegt konserviert vor, während die zweite eine neue Disulfidbrücke darstellt, die den ersten Loop stabilisiert. Dieser Loop ist bei *G. lucidum* auch länger als bei der Cellulase von *S. flava* OO2.

Cellobiose wurde an der gleichen Stelle in das Modell von Cel1 eingefügt, an der es auch in der Struktur aus *G. lucidum* liegt. Es wurde kein molekulares Docking angewendet. Darunter versteht man die computergestützte Vorhersage des Bindungsmodus sowie der Bindungsenergie zweier aneinander bindender Moleküle. Die in der Struktur aus *G. lucidum* wichtigen Aminosäuren sind Tryptophan (W) W202 und Asparagin (N) N242. In der Sequenz aus Cel1 ist die Aminosäure Tryptophan (W) gegen Phenylalanin (F) getauscht, sodass die bei der Bindung zur mitkristallisierten Cellobiose ausgebildeten Stapelkräfte erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu fällt durch den Austausch von Asparagin (N) gegen Phenylalanin (F) eine Wasserstoffbrücken-Bindung, die mit Cellobiose ausgebildet wird, weg. Möglicherweise ist das Substratspektrum von Cel1 gegenüber der Endoglucanase aus *G. lucidum* erweitert.

Erkenntnisse aus der Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation leisten ebenfalls einen Beitrag zur Verbesserung der Biogasgewinnung aus lignocellulosehaltiger Biomasse. Nachdem der Einsatz einer neu isolierten Cellulase für die enzymatische Saccharifikation während der Bioethanol-Herstellung besprochen wurde, folgt im Anschluss die Diskussion über neu isolierte methanogene Archaea und deren Einsatz in einer Power-to-Gas Anlage.

4.2 Reduzierung von Biogas-CO₂ zu CH₄ unter Nutzung von elektrolytischem Wasserstoff regenerativer Energiequellen durch methanogene Archaea

Die mikrobielle Umsetzung von Wasserstoff aus erneuerbaren Energiequellen zu Biomethan stellt neben der Bioethanol-Herstellung der zweiten Generation eine weitere Alternative dar, um die Menschheit von fossilen Energieträgern unabhängig zu machen.

Dieses sogenannte Power-to-Gas Verfahren nutzt den aus Windenergie und Photovoltaik erzeugten Überschussstrom, um Elektrolyse zu betreiben. Der dabei entstehende Wasserstoff wird zur Methanerzeugung genutzt und stellt eine Speicherung des Überschussstroms in Form eines chemischen Energieträgers dar. Dabei wird der Methanertrag in Biogasanlagen optimiert, denn Biogas besteht noch bis zu 25-45 % aus Kohlenstoffdioxid (CO₂). Gleichzeitig verwendet das Power-to-Gas Verfahren die in Deutschland gut ausgebaute Infrastruktur wie Erdgasnetz und Gasspeicher. Gegenüber der technischen Methansynthese bietet die mikrobielle Umsetzung einige Vorteile. Neben dem hohen energetischen Wirkungsgrad von über 80 % der biologischen Methanbildung ist eine hohe Reinheit der Ausgangsgase aufgrund des katalysatorunabhängigen Verfahrens und der nicht vorhandenen Endprodukthemmung im biologischen Prozess nicht erforderlich. Das Power-to-Gas Verfahren stellt eine sinnvolle Alternative zur Wasserstofftechnologie dar, solange diese noch nicht ausgereift ist.

Zur Isolierung von methanogenen Archaea wurde zum einen eine thermophile Biogasanlage (BGA Butschen, Viersen) als Quelle ausgewählt, denn thermophile Anlagen zeichnen sich im Vergleich zu mesophilen Anlagen durch hohe Umsatzraten aus. Zum anderen wurden Termiten als Quelle verwendet, denn es wird davon ausgegangen, dass die in Termiten vorkommenden Archaea gegenüber Sauerstoff

unempfindlicher sind. Die gewonnenen Isolate wurden teilweise auf ihren potentiellen Einsatz in einer Power-to-Gas Anlage überprüft.

4.2.1 Diversitätsanalyse methanogener Archaea in *Mastotermes darwiniensis*

Methanogene Archaea in höheren Termiten konnten bisher den Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanobacteriales und den kürzlich entdeckten Methanoplasmatales bzw. Methanomassiliicoccales (Paul *et al.*, 2012; Brune, 2014) zugeordnet werden. In niederen Termiten ist die Ordnung Methanobacteriales dominant vertreten.

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 137 positive Klone gewonnen werden, von denen 67 Klone aus dem Darm von Arbeitern und 70 Klone aus dem Darm von Soldaten der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* stammen. Eine Diversitätsanalyse in der Termiten *Incisitermes marginipennis* war nicht möglich. Dies könnte an der unterschiedlichen Isolierung der Därme liegen (Abschnitt 2.6).

Durch ARDRA konnten insgesamt 10 verschiedene Muster generiert werden (Abbildung 3.7). Die Identifizierung erfolgte durch den Abgleich der 16S rDNA-Sequenzen jeweils eines Klons mit den Datenbanken GenBank Nucleotide collection und EzTaxon Server 2.1 (Tabelle 3.3). Acht von zehn Mustern wurden durch die Datenbank GenBank Nucleotide collection als *Methanobrevibacter arboriphilus* identifiziert. Die beiden anderen Muster konnten *Methanobrevibacter curvatus* zugeordnet werden. Die Datenbank EzTaxon Server 2.1 ordnete vier der Muster *Methanobrevibacter filiformis*, zwei der Muster *Methanobrevibacter arboriphilus*, drei der Muster *Methanobrevibacter curvatus* sowie ein Muster *Methanobrevibacter cuticularis* zu. Eine Übereinstimmung der beiden Datenbanken fand nur in drei Mustern statt (2b, 5a und 8b). Vier (1a, 3a, 6a und 7a) der durch die Datenbank GenBank Nucleotide collection als *Methanobrevibacter arboriphilus* identifizierten Muster wurden durch die Datenbank EzTaxon Server 2.1 *Methanobrevibacter filiformis* zugeordnet. Zwei weitere Muster (4b und 9b), die ebenfalls *Methanobrevibacter arboriphilus* zugeordnet wurden (GenBank Nucleotide collection), konnten als *Methanobrevibacter curvatus* identifiziert werden (EzTaxon Server 2.1). Muster 2c, das über die Datenbank GenBank Nucleotide collection als *Methanobrevibacter curvatus* identifiziert wurde, ist über EzTaxon Server 2.1 als einziges Muster *Methanobrevibacter cuticularis* zugeordnet worden. Die Ergebnisse sind abhängig von

der Zuverlässigkeit der hinterlegten Sequenzen in den Datenbanken. EzTaxon Server 2.1 nutzt Sequenzen der GenBank Nucleotide collection und von Stämmen, die von Autoren hinterlegt wurden. Es handelt sich im Gegensatz zu GenBank Nucleotide collection nur um Typstämme, die Sequenzen werden kuratiert und die Nomenklatur über die DSMZ aktualisiert (Park *et al.*, 2012).

Die Verteilung der Muster war in Arbeitern und Soldaten unterschiedlich. Muster 2b konnte in nahezu 86 % der Klone aus Arbeitern festgestellt werden, während Muster 1a mit einer Häufigkeit von nahezu 77 % den größten Teil in Soldaten ausmachte. Muster 2c und 9b konnten lediglich in Klonen aus Arbeitern festgestellt werden, während die Muster 3a, 4b, 5a, 6a, 7a und 8b nur in Klonen aus Soldaten gefunden wurden. Dies lässt sich auf die unterschiedliche Präparation und Anzahl der verwendeten Termitendärme zurückführen (Abschnitt 2.6). Denn Soldaten rezenter Termiten sind nicht in der Lage, sich selbst zu ernähren und sind auf die Fütterung via stomodealer Trophallaxis, dem Austausch von Material zwischen Individuen (Cabrera & Rust, 1999), angewiesen (Nalepa, 2011).

Die Unterschiedlichkeit der Muster weist trotz der Zuordnung zur gleichen Art über die Datenbanken auf verschiedene Arten hin. Die Sequenzzugehörigkeit gibt einen Hinweis darauf. Die Sequenzidentitäten lagen zwischen 93,4 und 96,9 % und somit in allen Fällen unterhalb der anerkannten Artgrenze von 97 % in Bezug auf die 16S rRNA Gensequenz (Stackebrandt & Goebel, 1994; Chun *et al.*, 2007). Der Forderung auf eine nahezu vollständige 16S rDNA Sequenz von >1300 bp (Stackebrandt *et al.*, 2002) konnte bis auf Muster 4b und 5a in allen anderen Mustern nachgekommen werden. Die Identitäten sind folglich als *Metanobrevibacter* sp. einzustufen. Es ist des Weiteren davon auszugehen, dass es sich möglicherweise um neue Arten dieser Gattung handelt. Die gewonnenen Ergebnisse stimmen mit phylogenetischen Untersuchungen der symbiotischen Gemeinschaft in der niederen Termiten *Cryptotermes domesticus* (Familie Kalotermitidae) und *Reticulitermes speratus* (Familie Rhinotermitidae) überein (Ohkuma & Kudo, 1998; Shinzato *et al.*, 1999). Sequenzen dieser Studien konnten ebenfalls der Gattung *Methanobrevibacter* (Ordnung Methanobacteriales) zugeordnet werden. Die meisten Sequenzen waren jedoch solche von noch nicht identifizierten Arten.

Eine andere phylogenetische Studie zeigte, dass 16S rRNA-Sequenzen von Mikroorganismen aus den Därmen höherer Termiten auf eine nahe Verwandtschaft mit Methanogenen der Ordnungen Methanosarcinales und Methanomicrobiales hindeuten (Ohkuma *et al.*, 1999). Sequenzen, die von Därmen niederer Termiten erhalten wurden, waren ebenfalls nah mit der Gattung *Methanobrevibacter* verwandt. Die vorherrschende Verbreitung von Methanobacteriales ist aber nicht allein auf niedere Termiten beschränkt. Es wurden *Methanobrevibacter arboriphilicus* (mittlerweile umbenannt in *Methanobrevibacter arboriphilus*) und *Methanobacterium bryantii* in den Därmen der holzfressenden höheren Termiten *Nasutitermes costalis* und *Nasutitermes nigriceps* (Familie Termitidae) beschrieben (Yang *et al.*, 1985; Brauman *et al.*, 2001).

Aufgrund der Ergebnisse wurden die DSMZ Medien 311a und 734 zur Isolierung von methanogenen Archaea aus Termiten verwendet. Beide Medien kommen bei der Kultivierung der drei bereits vorhandenen Isolate aus der niederen Termiten *Reticulitermes flavipes* zum Einsatz.

4.2.2 Archaeelle Isolate aus niederen Termiten und der thermophilen BGA

Bisher gehörten alle Isolate, die aus niederen Termiten gewonnen werden konnten, der Gattung *Methanobrevibacter* (*M'brevibacter*) (*M'* = *Methano*) an (Brune, 2014). Es konnten drei verschiedene Arten dieser Ordnung aus der niederen Termiten *Reticulitermes flavipes* in Reinkultur erhalten werden: *M'brevibacter curvatus* RFM-2^T, *M'brevibacter cuticularis* RFM-1^T und *M'brevibacter filiformis* RFM-3^T (Leadbetter & Breznak, 1996; Leadbetter *et al.*, 1998).

Aus höheren Termiten mit unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten konnten drei Stämme isoliert werden, die nahe mit *Methanobacterium bryantii* verwandt sind, und ein Isolat aus einer holzfressenden höheren Termiten, das mit *Methanobrevibacter arboriphilus* nahe verwandt ist (Deevong *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt neun Isolate aus Termiten gewonnen werden (Tabelle 3.4), darunter sechs aus der niederen Termiten *Incisitermes marginipennis* und drei aus der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis*. Die Isolate aus *Incisitermes marginipennis* teilten sich nach ARDRA (Abbildung 3.8) und SAPD-PCR (Abbildung 3.9) in zwei Muster auf. Bei fünf der Isolate aus *Incisitermes*

marginipennis handelt es sich um *Methanoculleus thermophilus* nach Zuordnung der Isolate Im1 und Im2 mit einer 16 S rDNA-Sequenzidentität von 100 %. Dies bestätigt auch die übereinstimmenden Muster der Isolate und des Typstammes aus ARDRA und SAPD-PCR. Die durch einen Pfeil markierte zusätzliche Bande im SAPD-PCR Fingerprintmuster bei Isolat Im2 (Abbildung 3.9) lieferte kein abweichendes Ergebnis bei der Sequenzierung. Ähnliches ist für Isolat Im4 anzunehmen. Aufgrund der Tatsache, dass die Banden auf gleicher Höhe liegen wie charakteristische Banden des Isolats Im6, ist es möglich, dass es sich bei diesen beiden Isolaten (Im2 und Im4) um eine archaeelle Mischkultur handelt. *Methanoculleus thermophilus* ist dabei in hohen Zellzahlen vertreten, wohingegen das andere Archaeon nur in geringen Zellzahlen vorkommt. Das Isolat Im6 konnte mit einer 99%igen Sequenzidentität nach GenBank Nucleotide Collection *Methanosarcina barkeri* zugeordnet werden bzw. *Methanosarcina horonobensis* mit einer ebenfalls etwa 99%igen Sequenzidentität nach EzTaxon Server 2.0. Im6 wurde im Gegensatz zu den anderen aus Termiten stammenden Isolaten mit Hilfe des Mediums 734 gewonnen. Die Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich von Medium 311a (Tabelle 2.6).

Die drei Isolate, die aus der Termitenart *Mastotermes darwiniensis* gewonnen wurden, zeigten nach ARDRA (Abbildung 3.8) und SAPD-PCR (Abbildung 3.9) identische Muster. Es handelt sich ausschließlich um *Methanobacterium beijingense*, nachdem das Isolat Md1 mit einer 99%igen 16S rDNA-Sequenzidentität nach GenBank Nucleotide Collection und EzTaxon Server 2.0 zugeordnet werden konnte.

Dadurch, dass die Artgrenze bei 97 % Ähnlichkeit in Bezug auf die 16S rDNA festgelegt ist, handelt es sich höchst wahrscheinlich nicht um neue Arten, auch wenn höhere Schwellenwerte (98,7-99,0 % bzw. 98,65 %) in verschiedenen Studien vorgeschlagen wurden (Stackebrandt & Ebers, 2006; Kim *et al.*, 2014). Das Artkonzept der 97 %-Grenze wird jedoch in manchen Spezies beispielsweise wegen multipler Kopien des 16S rRNA Gens nicht gerecht (Nguyen *et al.*, 2016). Bei Ähnlichkeiten über 97 % müssen andere Methoden wie DNA-DNA Hybridisierung oder die Analyse von Gensequenzen mit höherer Auflösung verwendet werden (Tindall *et al.*, 2010).

Die mittels SAPD-PCR generierten spezifischen Muster weisen im Falle von Im1-5 (Abbildung 3.9) aufgrund des Vergleichs mit dem vorliegenden Typstamm ebenfalls nicht auf neue Arten hin. Ein entsprechender Vergleich der Isolate Im6 und Md1, 5 und 6 mit den entsprechenden Typstämmen (*Methanosarcina barkeri* bzw.

4. DISKUSSION

Methanosarcina horonobensis sowie *Methanobacterium beijingense*) ist im Anschluss dieser Arbeit durchzuführen. Die Sequenzähnlichkeit der sequenzierten Isolate (Im1, 2 und 6 und Md1) von über 97 % und die Ähnlichkeit der generierten SAPD-PCR Muster weisen jedoch ebenfalls nicht auf neue Arten hin. Allerdings konnten die beschriebenen Arten erstmalig aus Termiten isoliert und angereichert werden.

Die erhaltenen Isolate stellen Gemeinschaften dar, die sich mit Ausnahme von Im2 sowie Im4 mit großer Wahrscheinlichkeit aus einem archaeellen Organismus und mehreren bakteriellen Organismen zusammensetzen. Die archaeellen Organismen scheinen im Vergleich zu den bakteriellen Organismen in hoher Zellzahl vorzuliegen, denn die SAPD-PCR Muster würden andernfalls durch die Muster der Bakterien überlagert werden. Die archaeelle Gemeinschaft in den Isolaten Im2 und Im4 könnte auf Grundlage der Ergebnisse der SAPD-PCR aus der Art *Methanoculleus thermophilus* respektive *Methanosarcina barkeri* bzw. *horonobensis* bestehen. Aufgrund der eindeutigen Sequenzierungsergebnisse und des Fingerprintmusters der SAPD-PCR liegt *Methanoculleus thermophilus* in hohen Zelltitern vor, wohingegen *Methanosarcina barkeri* bzw. *horonobensis* nur in geringen Zellzahlen vorliegt. Die Agarshake-Methode ist kein zuverlässiges Verfahren, um Reinkulturen methanogener Archaea zu erhalten. Jedoch war die Vereinzelung eventuell auch aufgrund des obligat syntrophen Charakters der Organismen nicht möglich. Dafür spricht auch der Einsatz von Antibiotika, welcher das Wachstum der Kulturen verhinderte. Um die Organismen doch noch in Reinkultur zu erhalten, sollten Antibiotika in geringeren Konzentrationen oder andere Antibiotika als die hier verwendeten eingesetzt werden. Auch die Anwendung anderer Methoden wie serielle Verdünnung oder Mikromanipulation könnten zum Erhalten von Reinkulturen führen.

Entgegen der gewonnenen Ergebnisse aus der Klondatenbank (Abschnitt 4.2.1) konnten keine neuen Arten aus *Mastotermes darwiniensis* erhalten werden. Auch die sechs Isolate, die aus der niederen Termitenart *Incisitermes marginipennis* gewonnen wurden, stellen keine neuen Arten dar. Dies könnte auf komplexe Ansprüche der Organismen zurückzuführen sein, welche die nicht in Kultur erhaltenen Organismen an ihre Umgebung stellen. Zum anderen sind auch hemmende Substanzen denkbar, die das Wachstum stören. Auch der potentiell mögliche syntrophe Charakter der Organismen erschwert die Isolierung und die Gewinnung von Reinkulturen.

Die in der Klondatenbank erhaltenen Identitäten (Tabelle 3.3) deuten alle auf *Methanobrevibacter* sp. hin. Die Energiegewinnung der Gattung *Methanobrevibacter* erfolgt über die hydrogenotrophe Methanogenese, wobei CO_2 mit H_2 zu CH_4 reduziert wird. In manchen Fällen dient auch Formiat als Elektronendonator.

Entgegen der erstellten Klonbibliothek aus der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* wurden Isolate in Kultur gewonnen, die in der Klondatenbank nicht erfasst wurden. Während die Identitäten der Klondatenbank auf *Methanobrevibacter* sp. hindeuten, wurden in Kultur Isolate erhalten, die der Gattung *Methanobacterium* (Md1, 5 und 6) zugeordnet werden konnten. Die Diskrepanz kann auf die unterschiedliche Isolierung der Termitendärme zurückzuführen sein und auf das verwendete Kit zur DNA-Isolation (Abschnitt 2.10.1).

Die Gattung *Methanobacterium*, die ebenso wie *Methanobrevibacter* der Ordnung der Methanobacteriales angehört, oxidiert H_2 , Formiat oder CO. CO_2 ist normalerweise der Elektronenakzeptor, allerdings reduzieren manche stattdessen Methanol. Eine Reduktion von Schwefel zu Sulfid ist ebenfalls möglich, allerdings wird dadurch kein Wachstum ermöglicht.

Wie bereits erwähnt, wurden aus der niederen Termiten *Incisitermes marginipennis* Archaea der Gattung *Methanoculleus* (Im1-5) und *Methanosarcina* (Im6) erhalten. Die Gattung *Methanoculleus* (Ordnung Methanomicrobiales) nutzt H_2 und CO_2 sowie Formiat zur Energiegewinnung. Einige verwerten zudem sekundäre Alkohole. Es sind mesophile und thermophile Arten dieser Gattung bekannt. Die in dieser Arbeit isolierten Arten der Gattung *Methanoculleus* (Im1-5: *Methanoculleus thermophilus*), die aus der niederen Termiten *Incisitermes marginipennis* gewonnen wurden, sind entgegen dem eindeutig zugeordneten Typstamm nicht zu einem Wachstum bei 55 °C befähigt.

Die Gattung *Methanosarcina* (Im6: *Methanosarcina barkeri* bzw. *horoebensis*) ist in der Lage, alle drei Wege der Methanogenese zu nutzen. Sie ist zur hydrogenotrophen, acetoclastischen und methylotrophen Methanogenese fähig.

Kürzlich konnte in BGA nachgewiesen werden, dass Methanol während der Hydrolysephase aus Pektin entsteht, welches von methylotrophen Archaea reduziert werden kann (May, 2015). Möglicherweise kommt der methylotrophen Methanogenese in Termiten ebenfalls eine größere Bedeutung zu als bisher

angenommen. Nachdem die Isolate in Reinkulturen vorliegen, sollten Substratverwertungstests durchgeführt werden und die Verwertung von Methanol von *Methanosarcina barkeri* bzw. *hironobensis* (Im6) und *Methanobacterium beijingense* (Md1, 5 und 6) überprüft werden.

Wegen der Gefahr der möglichen Kontamination wurden die Isolate aus Termiten nicht im Methanreaktor eingesetzt.

Aus der thermophilen BGA Butschen in Viersen (Nordrhein-Westfalen) konnten insgesamt 18 Isolate gewonnen werden, die sich nach ARDRA (Abbildung 3.10 und 3.11) und SAPD-PCR (Abbildung 3.12) in zwei Muster aufteilten. Zwölf der Isolate konnten *Methanoculleus thermophilus* und sechs *Methanothermobacter wolfeii* zugeordnet werden. Die Sequenzidentität lag bei den Datenbanken GenBank Nucleotide collection und EzTaxon Server 2.1 für das Isolat V2.5 bei 99 % und für die Isolate SIV6, V2.1 und V2.8 jeweils bei 100 % in Bezug auf die 16S rDNA.

Die Verteilung von *Methanoculleus* zu *Methanothermobacter* Isolaten stimmt mit Metagenom-Daten überein. So zeigten die von Metagenom-Daten abgeleiteten 16S rRNA Gensequenzen, dass unter den Archaea *Methanoculleus* mit 2,8 % und *Methanothermobacter* mit 0,8 % vorherrschten (Maus *et al.*, 2016). Des Weiteren zeigten Metatranskriptom-Daten, dass *Methanoculleus* mit 5,7 % an den Sequenz-Tags beteiligt war, wohingegen *Methanothermobacter* mit unter 0,1 % kaum einen Anteil hatte, was darauf schließen lässt, dass sie weniger transkriptionell aktiv waren (Maus *et al.*, 2016).

4.2.3 Charakterisierung der Gattung *Methanothermobacter* und Einordnung des Isolates SIV6 mittels SAPD-PCR

Die Familie Methanobacteriaceae setzt sich aus den drei mesophilen Gattungen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera*, sowie der einzigen thermophilen Gattung *Methanothermobacter* zusammen. Die Methanogenen der Gattung *Methanothermobacter* wurden vormals in der Gattung *Methanobacterium* klassifiziert (Wasserfallen *et al.*, 2000). Es ist die einzige Gattung von stäbchenförmigen Methanogenen, die auf H₂/CO₂ optimal bei einer Temperatur von 60 bis 65 °C wächst (Boone, 2001).

Zu der Gattung zählen acht Typstämme: *Methanothermobacter crinale* Tm2^T (Cheng *et al.*, 2011), *Methanothermobacter defluvii* ADZ^T (Kotelnikova *et al.*, 1993), *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T (Wasserfallen *et al.*, 2000), *Methanothermobacter tenebrarum* RMAS^T (Nakamura *et al.*, 2013), *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H^T (Zeikus & Wolfe, 1972; Wasserfallen *et al.*, 2000), *Methanothermobacter thermoflexus* IDZ^T (Kotelnikova *et al.*, 1993), *Methanothermobacter thermophilus* M^T (Laurinavichyus *et al.*, 1988) und *Methanothermobacter wolfeii*^T (Winter *et al.*, 1984; Wasserfallen *et al.*, 2000).

Bisher werden zur Differenzierung der einzelnen Arten die Morphologie, das Substratspektrum, die Wachstumstemperatur, die Zellwandstruktur und der G + C-Gehalt der chromosomalen DNA herangezogen. Die SAPD-PCR ist eine Fingerprint-Methode, die von Fröhlich und Pfannebecker (2007) zusammen mit der Methode der MALDI-TOF-MS zur Identifikation von *Pediococcus* in Most und Wein angewendet wurde, welche dort unerwünscht sind. Diese beiden Methoden wurden ebenfalls erfolgreich für die Identifikation von Milchsäurebakterien (Sebastian *et al.*, 2011), die biogene Amine erzeugen, für die Differenzierung von Stämmen der Gattung *Saccharomyces* (Blättel *et al.*, 2013) und für methanogene Archaea (Stantscheff *et al.*, 2014) angewendet. Mittels SAPD-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit eine genauere Differenzierung der einzelnen Arten der Gattung *Methanothermobacter* erfolgen. Bis auf *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H^T und *Methanothermobacter thermophilus* M^T konnten von allen bisher bekannten *Methanothermobacter* Arten speziesspezifische Bandenmuster generiert werden (Abbildung 3.13; Tabelle 7.6 Anhang). Des Weiteren konnte das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 aus der thermophilen Biogasanlage (BGA Butschen, Viersen) mittels Fragmentmuster und den resultierenden Fragmentlängen dem korrespondierenden Typstamm zugeordnet werden. Das leicht abweichende Muster, das mittels des Primers A-Not generiert werden konnte, ist auf mögliche Unterschiede auf Stammniveau zurückzuführen.

Zwei unabhängige Untersuchungen zeigten eine 100%ige Übereinstimmung auf 16S rDNA Ebene zwischen *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H^T und *Methanothermobacter thermophilus* M^T. Für *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H^T steht bereits eine Gesamtgenom-Sequenz zur Verfügung. Aufgrund der Tatsache, dass *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H^T und

Methanothermobacter thermophilus M^T auch in der SAPD-PCR ein identisches Muster zeigten, wurde eine DNA-Probe von *Methanothermobacter thermophilus* M^T zur Gesamtgenom-Sequenzierung an das Center for Biotechnology (CeBiTec) der Universität Bielefeld verschickt. Eine Average Nucleotide Identity (ANI) von 99,94 % und eine Average Amino Acid Identity (AAI) von 99,34 % weisen darauf hin, dass beide Stämme zur gleichen Art gehören. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der SAPD-PCR (Abbildung 3.13). Eine ANI, welche aus dem paarweisen Vergleich aller Gene, die zwischen zwei Stämmen geteilt werden, berechnet wird und bei 94 % liegt, stimmt im Allgemeinen mit der molekularen Artdefinition und der traditionellen taxonomischen Praxis überein (Doolittle & Papke, 2006).

4.2.4 Einsatz methanogener Archaea in einem Hochleistungs-Methanreaktor

Um einen geeigneten Stamm für den Einsatz im Methanreaktor zu finden, wurde die Methanproduktion verschiedener mesophiler (*Methanobacterium formicicum* MF^T), thermophiler (*Methanobacterium thermaggregans*^T, *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T, *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T) und hyperthermophiler (*Methanothermus fervidus* V24 S^T) Typstämme sowie des Isolates *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 aus der thermophilen BGA Butschen in Viersen überprüft (Abbildung 3.14). Von jedem Stamm wurden jeweils zwei parallele Batch-Kulturen (K1 und K2) aus derselben Vorkultur hergestellt (Abschnitt 2.8.1). Die Methanproduktion wurde über einen bestimmten Zeitraum und bei einer bestimmten Temperatur ermittelt. Es erfolgte keine Normierung der Methanproduktion.

Methanobacterium formicicum MF^T zeigt mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C die niedrigste und *Methanothermus fervidus* V24 S^T mit einer optimalen Wachstumstemperatur bei 83 °C die höchste Methanproduktion. Die thermophilen Stämme mit einer optimalen Wachstumstemperatur zwischen 55 und 65 °C weisen eine Methanproduktion auf, die meist zwischen den gemessenen Werten von *Methanobacterium formicicum* MF^T und *Methanothermus fervidus* V24 S^T liegt. Innerhalb der thermophilen Stämme sind deutliche Unterschiede in der Methanproduktion zu erkennen. Insgesamt lässt sich eine Abhängigkeit zwischen Wachstumstemperatur und Methanproduktion der Organismen feststellen. Je höher die Wachstumstemperatur der Organismen, desto höher ist auch die gemessene Methanproduktion. Dies ist auch aus Biogasanlagen bekannt. Thermophile Anlagen zeichnen sich im Gegensatz zu mesophilen Anlagen durch höhere Umsatzraten und

somit einem erhöhten Methanertrag aus. Dies ist auf die kürzeren Generationszeiten der Organismen und die höheren Stoffwechselraten in thermophilen Temperaturbereichen zurückzuführen.

Des Weiteren fällt auf, dass es zwischen zwei Kulturansätzen (K1 und K2) des gleichen Stammes zu erheblichen Unterschieden kommen kann (vgl. *Methanobacterium thermaggregans*^T nach 54 und 100 Stunden). Dies könnte auf ein unterschiedlich gutes Wachstum der Organismen zurückzuführen sein.

Die Typstämme *Methanobacterium formicicum* MF^T und *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T sowie das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 wurden ebenfalls in einem Methanreaktor auf ihre Methanproduktion überprüft. Die Ergebnisse des Reaktors bestätigen die vorher gewonnenen Erkenntnisse, auch wenn diese nicht direkt vergleichbar sind. Denn in dem einen Fall handelt es sich um Batch-Kulturen und im anderen Fall um einen Methanreaktor mit Festbett, bei dem der Zustrom von CO₂ und neuem Substrat kontinuierlich stattfindet. Im Falle des Methanreaktors fand eine Normierung der Methanproduktion statt (Tabelle 3.5, Angabe in Normliter = NI). Es besteht die gleiche Abhängigkeit zwischen Temperaturoptimum der Organismen und deren Methanproduktion wie in den Batch-Kulturen ermittelt wurde. Des Weiteren ließ sich die Methanproduktion auch durch Erhöhung des Druckes steigern, wie Versuche in dem Methanreaktor zeigten. Eine Erhöhung der Temperatur in Kombination mit Erhöhung des Druckes erzielte schon innerhalb des gleichen Stammes deutlich höhere Methanproduktionsraten. Allerdings wird auch in diesem Fall irgendwann eine Grenze erreicht. Bei dem Stamm *Methanobacterium formicicum* MF^T führte eine weitere Erhöhung der Temperatur (> 43 °C) oder des Druckes (> 6,50 bar) zu keiner weiteren Steigerung der Abbaugeschwindigkeit der Gase H₂ und CO₂.

Der Stamm *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T K1 weist im Vergleich zu den anderen drei getesteten thermophilen Stämmen in der Batch-Kultur die höchste Methanproduktion mit fast 87 mmol/l auf. Die deutlich höhere Methanproduktion könnte auf das verwendete Medium zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen wurde das Medium DSMZ 141 verwendet, denn ein Wachstum in Medium DSMZ 287 mod. war nicht möglich. Die Methanproduktion der anderen getesteten Stämme könnte sich durch die Verwendung des von der DSMZ

4. DISKUSSION

empfohlenen Mediums oder allgemein durch eine Optimierung des Mediums ebenfalls steigern. *Methanothermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T könnte sich aufgrund der Ergebnisse auch für den Einsatz im Reaktor eignen.

Die aus der thermophilen BGA Butschen erhaltenen *Methanoculleus thermophilus*-Isolate könnten im Anschluss dieser Arbeit ebenfalls auf ihre Methanproduktion und auf einen möglichen Einsatz in dem Hochleistungs-Methanreaktor überprüft werden. Vergleichbar mit dem Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 und dem korrespondierendem Typstamm könnten auch die Isolate der Gattung *Methanoculleus* bei einer höheren Temperatur ein optimales Wachstum zeigen und eine höhere Methanproduktion im Vergleich zu ihrem Typstamm erzielen.

Obwohl der einzige hyperthermophile Organismus *Methanothermus fervidus* V24 S^T unter den getesteten Stämmen insgesamt die höchste Methanproduktion in dem Batch-Versuch erzielte, ist er für den Einsatz in dem Methanreaktor aufgrund der optimalen Wachstumstemperatur von 83 °C aus technischen und wirtschaftlichen Gründen eher nicht geeignet.

In Folge der positiven Ergebnisse wurde am Prüf- und Forschungsinstitut (PFI) in Pirmasens eine Power-to-Gas Pilotanlage gebaut, welche aus zwei 25 Meter hohen Hochleistungs-Methanreaktoren besteht (Abbildung 3.16). Dadurch ist die Produktion von je 150 m³/h an Gas möglich und gewährleistet die Versorgung von 5000 Haushalten mit Strom. Das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 befindet sich seit September 2016 im Einsatz und es wird diskontinuierlich Methan in das Erdgasnetz eingespeist. Derzeit befindet sich die Anlage noch im Testbetrieb. Mit einer Kolonne wird rund 20 m³/h an einspeisefähigem Methan produziert, allerdings noch nicht im Dauerbetrieb.

Die Auswirkung des Reaktorfiltrats (Rf) sowie des Fermenterinhalts (Fi) auf die Methanproduktion wurde in einem weiteren Versuch ermittelt. Dazu wurde der Typstamm *Methanothermobacter marburgensis* Marburg^T in Medium 287 mod. sowie in Medien mit zusätzlich 20 % Fermenterinhalt (Fi) und in Medien mit zusätzlich 20 % Reaktorfiltrat (Rf) kultiviert und die Methanproduktion ermittelt.

Sowohl das Reaktorfiltrat als auch der Fermenterinhalt verbesserten die Methanproduktion etwa auf ein Dreifaches nach 360 Stunden (Abbildung 3.15). Das Reaktorfiltrat lieferte geringfügig bessere Ergebnisse als der Fermenterinhalt. Der Einsatz des Reaktorfiltrats oder des Fermenterinhalts im Methanreaktor scheint

aufgrund des Risikos möglicher Kontamination jedoch kritisch. Außerdem ist die Herstellung recht zeitaufwändig und mit zusätzlichen Kosten verbunden. Würde jedoch der Faktor gefunden werden, der für das verbesserte Wachstum und der damit verbundenen gesteigerten Methanproduktion verantwortlich ist, könnte dieser dem Medium im Methanreaktor zugesetzt werden.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Cellulase Cel1 aus der Hefe *S. flava* OO2 isoliert werden, die sich aufgrund ihres pH- und Temperatur-Optimums sowie durch ihre Aktivität als geeignetes Enzym für die Bioethanol-Herstellung aus Stroh erwiesen hat.

Weitere Untersuchungen zur Temperatur-Stabilität, Umsatzrate, zum Substratspektrum und zur Substrataffinität sind sinnvoll, um die gewonnene Cellulase weiter zu charakterisieren und mit kommerziell erhältlichen Cellulasen und Enzympräparaten vergleichen zu können. Des Weiteren sollte die potentielle Hemmung durch die bei der TDH anfallenden Substanzen wie Furanderivate und phenolische Komponenten überprüft werden.

Darüber hinaus könnte die Cellulase Cel1 durch gezielte Mutagenese verändert und verbessert werden. Die Methode der directed evolution wurde bereits erfolgreich für die Herstellung von Cellulasen angewendet (Kuhad *et al.*, 2016). Auch die Klonierung und heterologe Expression von Cellulasegenen zur optimierten Produktion der Enzyme und ihrer Eigenschaften ist eine weitere Möglichkeit.

Im Allgemeinen liefert die Termite als Modell für die Bioethanol-Herstellung aus lignocellulosehaltigem Material gute Ideen und Ansätze für die Nutzung von Biomasse als alternative Energiequelle. Termiten zerkleinern aufgenommene Nahrung zunächst über die Mandibeln und den Kaumagen. Eine mechanische Vorbehandlung und die damit verbundene Oberflächenvergrößerung des Materials ist wirtschaftlich momentan nicht zu bewerkstelligen. Die hier angewendete TDH zur Vorbehandlung stellt somit eine gute Alternative dar. Termiten nutzen darüber hinaus eine Kombination aus termiteneigenen Enzymen und ihrer Symbionten, um Lignocellulose innerhalb von 24 Stunden abzubauen. Als Quelle zur Isolierung von neuartigen Enzymen sind sie gut geeignet, um hocheffiziente Enzyme zu gewinnen, die als Mixtur in der Industrie zum Einsatz kommen können.

4. DISKUSSION

Die direkte Umwandlung von pflanzlicher Biomasse zu Bioethanol, auch consolidated bioprocessing (CBP) genannt, ist ein darüber hinausgehendes Ziel. CBP vereint die Enzymproduktion, Saccharifikation und Fermentation in einem Prozess (Hasunuma & Kondo, 2012).

Erkenntnisse aus der Bioethanol-Produktion der zweiten Generation leisten ebenfalls einen Beitrag zur Verbesserung der Biogasgewinnung aus lignocellulosehaltiger Biomasse.

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt neun Isolate aus den niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* und *Incisitermes marginipennis* erhalten werden. Um die aus Termiten erhaltenen Isolate möglicherweise doch noch zu vereinzeln, könnte die Methode der Mikromanipulation oder die serielle Verdünnung angewendet werden. Des Weiteren könnten verschiedene andere Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet werden, um den obligat syntrophen Charakter der Isolate auszuschließen. Für den Fall, dass eine Vereinzelung nicht erreicht werden kann, wäre es von Interesse zu überprüfen, welche bakteriellen Organismen an den Isolaten beteiligt sind.

Die Isolate oder später in Reinkultur erhaltenen Organismen aus Termiten sollten auf eine Methanolverwertung überprüft werden, um die in Termiten ablaufenden Stoffwechselwege weiter aufklären zu können.

Es sollte überprüft werden, ob die acht Typstämme, die der Gattung *Methanothermobacter* (*M'thermobacter*) (*M'* = *Methano*) zugehören, weiterhin aufrechterhalten werden können. *M'thermobacter thermautotrophicus* Delta H^T und *M'thermobacter thermophilus* M^T zeigten in der SAPD-PCR ein identisches Muster. Zwei unabhängige Untersuchungen zeigten zudem eine 100%ige Übereinstimmung auf 16S rDNA Ebene. Der Vergleich des Genoms weist zudem darauf hin, dass beide Stämme zur gleichen Art gehören.

Für den optimierten Einsatz von Archaea in dem Hochleistungs-Methanreaktor und zur Steigerung der Gasumsatzrate sollte der Faktor, der in Reaktorfiltrat bzw. Fermenterinhalt das Wachstum und eine höhere Methanproduktion fördert, ermittelt werden.

Der Stamm *Methanthermococcus thermolithotrophicus* SN-1^T K1 zeigte gute Ergebnisse bei der Methanproduktion in der Batch-Kultur. Der Einsatz dieses Stammes sollte in dem Hochleistungs-Methanreaktor überprüft werden. Sofern er einen ökonomischen Vorteil gegenüber dem Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 erbringt, wäre eine Neuisolation dieser Art wünschenswert.

5. Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich zum einen mit der Optimierung der Bioethanol-Herstellung und zum anderen mit der Verbesserung der Biogas-Produktion. Dabei kommen neu isolierte Mikroorganismen bzw. deren Enzyme zum Einsatz.

Die Bioethanol-Herstellung aus lignocellulosehaltiger Biomasse stellt eine erfolgversprechende Alternative zu fossilen Energieträgern dar.

Die Hefe *Saitozyma flava* OO2, die aus der höheren Termite *Odontotermes obesus* stammt, konnte als geeigneter Cellulaseproduzent identifiziert werden. Es konnte eine Cellulase Cel1 isoliert und charakterisiert werden, die der Glycosid-Hydrolasefamilie 5 (GHF 5) angehört. Ein 3D-Homologiemodell auf Grundlage der Struktur der β -1,4-Endoglucanase aus *Ganoderma lucidum* 5D8Z wurde angefertigt. Das aktive Zentrum liegt dabei hoch konserviert vor. Es konnte eine Aktivität in einem breiten Temperatur-Bereich zwischen < 30 und > 80 °C mit einem Temperatur-Optimum bei 60 °C ermittelt werden. Die Cellulase war in einem pH-Bereich zwischen < 2 und > 6 stabil. In einem pH-Bereich zwischen $< 3,5$ und $> 5,5$ zeigte die Endocellulase eine Aktivität mit einem Optimum zwischen 4 und 4,5. Bei einer Konzentration von 25,5 % Cellobiose zeigte die Cellulase Cel1 eine 50%ige Aktivität. Aufgrund der ermittelten Eigenschaften und ihrer Aktivität eignet sich die Cellulase Cel1 für den Einsatz in der Bioethanolproduktion der zweiten Generation.

Das Power-to-Gas Verfahren stellt eine weitere Alternative dar, um die Menschheit von fossilen Energieträgern unabhängig zu machen.

Im Rahmen dessen konnten insgesamt 18 methanogene Archaea aus der thermophilen Biogasanlage Butschen in Viersen (Nordrhein-Westfalen) und neun Isolate aus zwei verschiedenen niederen Termiten erhalten werden. Die Identifikation erfolgte jeweils über ARDRA und SAPD-PCR sowie über eine Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. Aus der niederen Termite *Incisitermes marginipennis* konnten sechs methanogene Isolate erhalten werden. Fünf der Isolate konnten als *Methanoculleus thermophilus* identifiziert werden und eines als *Methanosarcina barkeri* bzw. *Methanosarcina horonobensis*. Aus einer weiteren niederen Termite, *Mastotermes darwiniensis*, konnten drei methanogene Isolate erhalten werden. Die Archaea konnten *Methanobacterium beijingense* zugeordnet werden. Es konnten somit erstmals Arten aus niederen Termiten isoliert werden, die sich von den bereits in Kultur erhaltenen Stämmen unterscheiden. Eine aus *Mastotermes darwiniensis* erstellte archaeelle Klonbibliothek zeigte, dass ein großes Potential an neuartigen, noch nicht isolierten

Archaea besteht. Aus der thermophilen Biogasanlage Butschen in Viersen konnten 18 Isolate gewonnen werden, von denen 12 als *Methanoculleus thermophilus* und sechs der Muster als *Methanothermobacter wolfeii* identifiziert werden konnten. Das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 konnte über die SAPD-PCR in die Gattung *Methanothermobacter* eingeordnet werden. Die Methanproduktion diverser Archaea wurde in Batch-Kulturen und teilweise in einem Methanreaktor überprüft. Darüber hinaus kommt das Isolat *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 in einem Hochleistungs-Methanreaktor zum Einsatz.

Abstract

The work in hand is on the one hand about the optimisation of bioethanol production and on the other hand about the improvement of biogas production. In the course of this, newly isolated microorganisms respectively their enzymes are to be deployed. Bioethanol production from lignocellulosic biomass is a promising alternative to fossil energy sources.

Saitozyma flava OO2, a yeast isolated from the higher termite *Odontotermes obesus*, was identified as a suitable cellulase producing strain. Cellulase Cel1, belonging to glycoside hydrolase family 5 (GHF 5), was isolated and characterized. A 3D homology model was computed, based on the structure 5D8Z of β -1,4-endoglucanase from the fungus *Ganoderma lucidum*. The active site was highly conserved. Activity in a broad temperature range between < 30 and > 80 °C was observed with an optimum at 60 °C. The cellulase was stable in a pH range from < 2 to > 6 . In a range of pH < 3.5 and > 5.5 the endocellulase showed activity with an optimum between pH 4 and 4.5. Furthermore, cellulase Cel1 exhibited 50 % activity when cellobiose was present in a concentration of 25.5 %. In consequence of these investigated properties and activity, that the cellulase showed, Cel1 is suitable for 2nd generation bioethanol production.

Power-to-gas concept is another alternative to provide mankind with a higher degree of independency from fossil fuels.

Within this project it was possible to obtain 18 methanogenic archaea out of the thermophilic biogas plant Butschen in Viersen (North Rhine-Westphalia) and 9 isolates from two different lower termites. Identification was performed via ARDRA and SAPD-PCR as well as via 16S rRNA gene sequencing. From lower termite *Incisitermes marginipennis* six methanogenic isolates were obtained. Five isolates were identified as *Methanoculleus thermophilus* and one was identified as

Methanosarcina barkeri or *Methanosarcina horonobensis*, respectively. From another lower termite, *Mastotermes darwiniensis*, three methanogenic isolates were obtained. Isolates were all assigned to *Methanobacterium beijingense*. To our knowledge, this is the first time, that the enrichment of methanogenic archaea from lower termites belonging to genera other than *Methanobrevibacter* is described. An archaeal clone library, generated from *Mastotermes darwiniensis*, showed great potential for isolation of new archaea from this lower termite. Altogether 18 isolates were obtained from the thermophilic biogas plant Butschen, Viersen. Twelve were assigned to *Methanoculleus thermophilus* and six were identified as *Methanothermobacter wolfeii*. Furthermore, isolate *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 was classified to the genus *Methanothermobacter* via SAPD-PCR. Methane production of diverse archaea was investigated in Batch culture and to some extent in a methane reactor. Moreover, the isolate *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 is employed in a high performance methane reactor.

6. Literaturhinweise

Ahlert, S. (2015) Propionsäureabbau in NawaRo-Biogasanlagen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Ahlert, S., Zimmermann, R., Ebling, J., König, H. (2016) Analysis of propionate degrading consortia from agricultural biogas plants. *MicrobiologyOpen*. doi:10.1002/mbo3.386.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.

Ballmann, P., Müller, M., Gasser, E., Dröge, S., König, H. (2013) Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam injection. Konferenz: *21st European Biomass Conference and Exhibition*. 3.–7. Juni 2013, Kopenhagen, Dänemark.

Barnett, C. C., Berka, R. M., Fowler, T. (1991) Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Nat Biotechnol* 9:562-567.

Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A., Lebuhn, M. (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Sci Tech* 58:1433–1439.

Bayer. Landesamt für Umwelt (2007) Biogashandbuch Bayern - Materialienband, Kapitel 1. Grundlagen und Technik, Stand 2007. Augsburg. http://www.lfu.bayern.de/energie/biogas_handbuch/doc/kap1bis15.pdf (Stand: 16.11.2016).

Berchtold, M., Chatzinotas, A., Schonhuber, W., Brune, A., Amann, R., Hahn, D., König, H. (1999). Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Arch Microbiol* 172:407–416.

Bessarabov, D., Wang, H., Zhao, N., (eds.) (2015) PEM Electrolysis for Hydrogen Production: Principles and Applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.

BGR (2015). Energierohstoffe 2015 – Reserven, Ressourcen, Verfügbarkeit – Erdöl, Erdgas, Kohle, Kernbrennstoffe, Geothermische Energie, November 2009. Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover, Deutschland. ISBN: 978-3-9813373-1-0,
URL:http://www.bgr.bund.de/DE/Themen/Energie/Downloads/Energierohstoffe_2009_Teil1.pdf?__blob=publicationFile&v=2.
(Stand: 16.11.2016).

B-IBE (2016) Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung. Online-Handbuch Demografie.
URL: <http://www.berlin-institut.org/online-handbuchdemografie/bevoelkerungsdynamik/wachstum-der-weltbevoelkerung.html>
(Stand: 16.11.2016)

Bignell, D.E., Eggleton, P., Nunes, L., Thomas, K.L. (1997). Termites as Mediators of Carbon Fluxes in Tropical Forest: Budgets for Carbon Dioxide and Methane Emissions. In: Watt A. D., Stork N. E., Hunter M. D. (eds.), Forests and Insects. Chapman and Hall, London, pp.109–134.

BMU (2011). Erneuerbare Energien - Innovationen für eine nachhaltige Energiezukunft, 8.Auflage Oktober 2011. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Silber Druck, Niestetal.
URL: https://www.ifeu.de/energie/pdf/ee_innovationen_energiezukunft_2012.pdf
(Stand: 25.07.2016)

BMWi (2016 a) Bundesministerium für Wirtschaft und Energie.
URL:
<https://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/E/energiestatistiken-energiegewinnung-energieverbrauch,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf>
(Stand: 16.11.2016).

BMWi (2016 b) Bundesministerium für Wirtschaft und Energie.

URL: <http://www.bmwi.de/Redaktion/DE/Dossier/erneuerbare-energien.html>

(Stand: 30.01.2017)

BMWi (2016 c) Bundesministerium für Wirtschaft und Energie.

URL: <http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/RechtPolitik/>

Erneuerbare-Energien-Im-Verkehrssektor/erneuerbare-energien-verkehrssektor.html

(Stand: 16.11.2016).

Blättel, V.; Petri, A.; Rabenstein, A., Kuever, J., König, H. (2013) Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods. *Appl Microbiol Biot* 97:4597–4606.

Boone, D. R. (ed.) (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: the Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer New York.

Brauman, A., Kane, M. D., Labat, M., Breznak, J. A. (1992) Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* 257:1384–1387.

Brauman, A., Dore, J., Eggleton, P., Bignell, D., Breznak, J. A., Kane, M. D. (2001) Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol Ecol* 35:27–36.

Breznak, J. A. (1984) Biochemical Aspects of Symbiosis between Termites and their Intestinal Microbiota. In: Anderson J., M., Rayner A. D. M., Walton D. W. H. (eds.), *Invertebrate Microbial Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 173–203.

Brioukhanov, A. L. & Netrusov, A. I. (2012) The positive effect of exogenous hemin on a resistance of strict anaerobic archaeon *methanobrevibacter arboriphilus* to oxidative stresses. *Curr Microbiol* 65:375–383.

- Brugerolle, G., Breunig, A., König, H.** (1994) Ultrastructural study of *Pentatrichomonoides* sp., a trichomonad flagellate from *Mastotermes darwiniensis*. Eur J Protistol 30: 372-278.
- Brugerolle, G. & König, H.** (1997) Ultrastructure and organisation of the cytoskeleton in *Oxymonas*, an intestinal flagellate of termites. J Eukar Microbiol 44: 305 - 313
- Brune, A., Emerson, D., Breznak, J. A.** (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. Appl Environ Microbiol 61:2681–2687.
- Brune, A.** (2009). Symbionts aiding Digestion. In: Carde, R.T. Resh, V.H (eds.), Encyclopedia of insects. 2nd edn. Academic, New York, pp. 978–983.
- Brune, A.** (2010) Methanogens in the Digestive Tract of Termites. In: Hackstein, J. H. P., Steinbüchel, A. (eds.), (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea. Springer Heidelberg. pp. 81-100.
- Brune, A** (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nat Rev Microbiol 12:168–180.
- Budzianowski, W. M.** (2016) A review of potential innovations for production, conditioning and utilization of biogas with multiple-criteria assessment. Renew Sust Energ Rev 54:1148–1171.
- Cabrera, B.J. & Rust, M.K.** (1999) Caste differences in feeding and trophallaxis in the western drywood termite, *Incisitermes minor* (Hagen) (Isoptera, Kalotermitidae). Insectes Soc 46: 244 –249.
- Cardona, C.A. & Sanchez, O.J.** (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. Biores Technol 98:2415–2457.

Cavicchioli, R. (2011) Archaea - timeline of the third domain. *Nature Reviews* 9:51–61.

Cersosimo, L. M. & Wright, A.-D. G. (2015) Rumen Methanogens. In: Puniya, A. K., Singh, R., Kamra, D. N. (eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India, pp. 143–153.

Chen, S., Su, L., Chen, J., Wu, J. (2013) Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnol Adv* 31:1754–1767.

Cheng, L., Dai, L., Li, X., Zhang, H., Lu Y. (2011). Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field. *Appl Environ Microbiol* 77:5212–5219.

Cho, M. J., Kim, Y. H., Shin, K., Kim, Y. K., Kim, Y. S., Kim, T. J. (2010) Symbiotic adaptation of bacteria in the gut of *Reticulitermes speratus*: low endo-beta-1,4-glucanase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 395:432–435

Christy, P. M., Gopinath, L.R., Divya, D. (2014) A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev* 34:167–173.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kwon Kim, B., Lim, Y.-W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Micr* 57:2259–2261.

Cibis, K. G. (2014) Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäurebildenden Bakterien aus Biogasanlagen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Cibis, K. G., Gneipel, A., König, H. (2016) Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *J Biotechnol* 220:51–63.

Clément, J.-L., Bagnères, A.-G., Uva, P., Wilfert, L., Quintana, A., Reinhard, J., Dronnet, S. (2001) Biosystematics of Reticulitermes termites in Europe: morphological, chemical and molecular data. *Insectes Soc* 48:202–215.

Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., Chaves, G. M. (2011) Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 24:682–700.

Cui, Z., Mochizuki, D., Matsuno, Y., Nakamura, T., Liu Y., Hatano, T., Fukui, S., Miyakawa, T. (1992) Cloning and molecular analysis of cDNA encoding a carboxymethylcellulase of the yeast *Cryptococcus flavus*. *Biosci Biotech Biochem* 56:1230–1235.

Divya, D., Gopinath, L.R., Christy, P. M. (2015) A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renew Sust Energ Rev* 42:690–699.

Deevong, P., Hattori, S., Yamada, A., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. (2004) Isolation and detection of methanogens from the gut of higher termites. *Microbes Environ* 19:221–226.

Demirel, B. & Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* DOI 10.1007/s11157-008-9131-1.

Doolittle, W. F. & Papke, R. T. (2006) Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology* 7:116.1-116.7.

Dröge, S., Fröhlich, J., Radek, R., König, H. (2006) *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol* 172, 392 - 397.

Dröge, S., Rachel, R., Radek, R., König, H. (2008) *Treponema isopterocolens* sp. nov., a novel spirochete from the hindgut of the termite *Incisitermes tabogae*. *IJ Syst Evol Microbiol* 58: 1079-1083.

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2017) Liste der empfohlenen Medien für Mikroorganismen. URL: <https://www.dsmz.de/?id=441> (Stand: 17.06.2017)

Eckert, K. & Schneider, E. (2003) A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclo-bacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to a rabinofuranosidase belonging to family 51 of glycoside hydrolases. *Eur J Biochem* 270:2593–3602.

Eggleton, P. (2001) Termites and trees: a review of recent advances in termite phylogenetics. *Insectes Soc* 48:187–193.

Eggleton, P. (2011) An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and functional Morphology. In: Bignell, D. E., Roisin, Y., Lo, N., (eds), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer; 2011. pp. 1–26.

Elferink, S. J.W.H. O., Visser, A., Pol, L. W. H., Stams, A. J. M. (1994) Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews* 15:119–136.

Fang, Q.-H. & Zhong, J.-J. (2002) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Bioch* 37:769–774.

Ferry, J. G., & Kastead, K. A. (2007). Methanogenesis. In: Cavicchioli, R. (ed.), *Archaea – molecular and cellular biology*. ASM Press, Washington DC, pp 288–314.

Fischer, E., Gattermann, H., Grope, J., Scholwin, F., Weidele, T., Weithäuser, M. (2013) Gasaufbereitung und Verwertungsmöglichkeiten. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) *Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung*. 6. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp.106–127.

Fliegerova, K., Mrazek, J., Hoffmann, K., Zabranska, J., Voigt, K. (2010) Diversity of anaerobic fungi within cow manure determined by ITS analysis. *Folia Microbiol* 55:319–325.

FNR (2011) Biogas – Pflanzen, Rohstoffe, Produkte, 7. Auflage August 2011. Fachagentur
Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Druckerei Weidner, Rostock.

Friehe, J., Schattauer, A., Weiland, P. (2013 a). Grundlagen der anaeroben Fermentation. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. 6. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp.11–20.

Friehe, J., Weiland, P., Schattauer, A. (2013 b). Beschreibung ausgewählter Substrate. In:
Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. 6. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp.68–77.

Friedrich, M.W., Schmitt-Wagner, D., Lueders, T., Brune, A. (2001). Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl Environ Microbiol* 67:4880–4890.

Fröhlich, J. & Pfannebecker, J. (2006). Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.

Fröhlich, J. & Pfannebecker, J. (2007) Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the *NotI* identification sequence. Patent application WO 2007/131776.

Fuchs, G., Boll, M., Heider, J. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 9:803–816.

Fuchs, G. (Hrsg.) (2014) Allgemeine Mikrobiologie, 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

FvB. Fachverband Biogas e.V. (2016). Branchenzahlen 2015 und Prognose der Branchenentwicklung 2016.

URL: [http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/\\$file/16-09-23_](http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/$file/16-09-23_)

[Biogas_Branchenzahlen-2015_Prognose-2016.pdf](#) (Stand: 12.11.2016).

Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P. W., Brugère, J.-F. (2014) Archaea and the human gut: New beginning of an old story. *World J Gastroenterol* 20: 16062-16078.

Garcia, J.-L., Patel, B. K. C., Ollivier, B. (2000) Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6:205–226.

Gasser, E., Ballmann, P., Dröge, S., Bohn, J., König, H. (2014) Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw. *J Appl Microbiol* 117: 1035–1044.

Gay, F. J. & Calaby, J. H. (1970) Termites of the Australian region. In: Krishna, K., Weesner, F. M. (Hrsg.). *Biology of Termites*. Volume 2, Academic Press, New York, pp. 393-448.

Grieco, M. A. B., Cavalcante, J. J. V., Cardoso, A. M., Vieira, R. P., Machado, E. A., Clementino, M. M., Medeiros, M. N., Albano, R. M., Garcia, E. S., de Souza, W., Constantino, R., Martins, O. B. (2013). Microbial community diversity in the gut of the South American termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). *Microb Ecol* 65:197–204.

Griffith, G. W., Baker, S., Fliegerova, K., Liggenstoffer, A., van der Giezen, M., Voigt, K., Beakes, G. (2010) Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA Fungus* 1:181–185.

Grigorevski-Lima, A. L., Da Vinha, F. N. M., Souza, D. T., Bispo, A. S. R., Bon, E. P. S., Coelho, R. R. R., Nascimento, R. P. (2009) *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl Biochem Biotechnol* 155:321–329.

Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methe', B., DeSantis, T. Z.; The Human Microbiome Consortium, Petrosino, J. F., Knight, R., Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 21:494–504.

Hackstein, J. H. P. & Stumm, C. K. (1994) Methane production in terrestrial arthropods. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5441–5445.

Handel, S. (2016) Beschreibung neuer Hefearten aus dem Termitendarm und Charakterisierung einer Xylanase von einer symbiotischen Hefe. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Handel, S., Wang, T., Yurkov, M. A., König, H. (2016) *Sugiyamaella mastotermidis* sp. nov. and *Papiliotrema odontotermidis* sp. nov. from the gut of the termites *Mastotermes darwiniensis* and *Odontotermes obesus*. *Int J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijsem.0.001397.

Hansen, K. H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1999) Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Wat Res* 33:1805–1810.

Hasunuma, T. & Kondo, A. (2012) Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Bioch* 47:1287–1294.

Hatano, T., Kosaka, M., Cui, Z., Kawaguchi, M., Miyakawa, T., Fukuu, S. (1991) Purification and characterization of a carboxymethylcellulose-degrading enzyme secreted by a yeast strain newly isolated from soil. *J Ferment Bioeng* 71:313–317.

Hongoh, Y. & Ohkuma, M. (2010) Termite Gut Flagellates and their Methanogenic and Eubacterial Symbionts. In: Hackstein, J. H. P., Steinbüchel, A. (eds.), (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea. Springer Verlag Heidelberg, pp. 55–80.

Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V. G. G. (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5:45

Horváth, I. S., Tabatabaei, M., Karimi, K., Kumar, R. (2016) Recent updates on biogas production - a review. *Biofuel Research Journal* 10:394–402.

Jenkins, J., Leggio, L. L., Harris, G., Pickersgill, R. (1995) β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters* 362:281–285.

Karnholz, A., Küsel, K., Gößner, A., Schramm, A., Drake, H. L. (2002) Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Appl Environ Microb* 68:1005–1009.

Klocke, M., Hahnke, S., Langer, T., Maus, I., Schlüter, A., Pühler, A., Cibis, K. G. C., König, H., Kim, Y.-S., Off, S., Scherer, P., Köck, D., Schwarz, W. H., Liebl, W. (2017) Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen. Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 92.

Kiener, A. & Leisinger, T (1983) Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Syst Appl Microbiol* 4:305–312.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012) Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721.

Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Micr* 64:346–351.

König, H., Fröhlich, J., Hertel, H. (2006) Diversity and lignocellulolytic activities of cultured microorganisms. In: *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 271–301.

König, H. & Dröge, S. (2010) Intestinal Spirochetes of Termites. In Z. Dubinsky and J. Seckbach (eds.) *All Flesh is Grass: Plant-Animal Interactions*. Springer Verlag, Heidelberg. pp. 67 - 89.

König, H., Li, L., Fröhlich, J. (2013) The cellulolytic system of the termite gut. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7943–7962.

König, H. (2016) Zelloberflächenstrukturen der Bacteria und Archaea. *BIUZ* 6: 374–383. DOI:10.1002/ biuz.201610603.

Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological reviews of the Cambridge philosophical society* 28: 416–436.

Korish, M. (2003) Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Kotelnikova, S. V., Obrastsova, A. Y., Gongadze, G. M., Laurinavichius, K. S. (1993) *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov., thermophilic rod-shaped methanogens isolated from the pilot-scale plant for digesting metacrilic wastes. *Syst Appl Microbiol* 16:427–435.

Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., Pletschke, B. I, Singh, A., Karp, M. (2016) Revisiting cellulose production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew Sust Energ Rev* 55:249–272.

Kuhnigk, T. (1996) Charakterisierung Lignocellulose abbauender und Sulfat reduzierender Bakterien aus dem Termitendarm. Dissertation Universität, Ulm.

Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H., König, H. (1996) A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *System Appl Microbiol* 19: 139-149.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011) *The Yeasts, a taxonomic study*. Fifth edition.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680–685.

Laurinavichyus, K. S., Kotelnikova, S. V., Obratsova, A. Y. (1988) New species of thermophilic methane-producing bacteria *Methanobacterium thermophilum*. *Microbiology (Engl. Transl. of Mikrobiologiya)* 57:832–838.

Leadbetter, J. R. & Breznak, J. A. (1996) Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov., and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl Environ Microbiol* 62:3620–3631.

Leadbetter, J. R., Crosby, L. D., Breznak, J. A. (1998) *Methanobrevibacter filiformis* sp. nov., a filamentous methanogen from termite hindguts. *Arch Microbiol* 169:287–292.

Lee, D., Owens, V. N., Boe, A., Jeranyama, P. (2007) Composition of herbaceous biomass feedstocks. In North Central Sun Grant Center, South Dakota State University.

Lian, P., Yuan, C., Xu, Q., Fu, W. (2016) Thermostability mechanism for the hyperthermophilicity of extremophile cellulase TmCel12A: Implied from molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B* 120:7346–7352.

Limayema, A. & Ricke, S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energ Combust* 38:449–467.

Liu, Y & Whitman, W. B. (2008) Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann N Y Acad Sci* 1125:171–189.

Liu, X.-Z., Wang Q.-M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A.V., Lumbsch, H.T., Millanes, A.M., Wedin, M., Yurkov, A.M., Boekhout, T., Bai1, F.-Y. (2015) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol* 81:85–147.

Liu, G., Li, Q., Shang, N., Huang, J.-W., Koe, T.-P., Liu, W., Zheng, Y., Han, X., Chen, Y., Chen, C.-C., Jin, J., Guo, R.-T. (2016) Functional and structural analyses of a 1,4- β -endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Enzyme Microb Tech* 86: 67–74.

Lo, N. & Eggleton, P. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (eds.) Bignell, D. E., Roisin, Y. & Lo, N.) 27–50 (Springer, 2011).

Lo, N. & Eggleton, P. (2011) Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N, editors. *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer; 2011. pp. 27–51.

Lottspeich, F. (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Heidelberg.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G. (2015) Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew Sust Energ Rev* 45:540–555.

Martoglio, B. & Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8:410–415.

Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., Kreubel, J., Erhard, M., Bremges, A., Off, S., Stolze, Y., Jaenicke, S., Goesmann, A., Sczyrba, A., Scherer, P., König, H., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Liebl, W., Pühler, A., Schlüte, A., Klocke, M. (2016) Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnol Biofuels* 9:1–28.

May, T. (2015) Mikrobielle Prozesskontrolle in Biogasanlagen durch Monitoring der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse im Gasbereich. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev* 27:77–93.

Mori, K., Sunamura, M., Yanagawa, K., J, I., Iino, T., Suzuki, K. , Urabe, T. (2008). First cultivation and ecological investigation of a bacterium affiliated with the candidate phylum OP5 from hot springs. *Appl Environ Microbiol* 74:6223–6229.

Muyzer, G. & Stams, A. J. M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews* 6:441–453.

Nakamura, K., Takahashi, A., Mori, C., Tamaki, H., Mochimaru, H., Nakamura, K., Takamizawa, K., Kamagata, Y. (2013) *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic, thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:715–22.

Nalepa, C. A. (2011) Altricial Development in Wood-Feeding Cockroaches: The Key Antecedent of Termite Eusociality. In: Bignell D. E., Roisin, Y., Lo, N., (eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer; 2011. pp. 69–96.

Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., Klocke, M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol* 105:1835–1850.

Nettmann, E., Bergmann I., Pramschüfer S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M. (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol* 76:2540–2548.

Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., White, B. (2016) A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms and Microbiomes* 1–8.

Ni, J. & Tokuda, G. (2013) Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Adv* 31:838–850.

Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (1999) Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* 12:3–9.

Ohkuma, M., Kudo, T. (1998) Phylogenetic analysis of the symbiotic intestinal microflora of the termite *Cryptotermes domesticus*. *FEMS Microbiology Letters* 164:389–395.

Ohkuma, M.; Noda, S., Kudo, T. (1999) Phylogenetic relationships of symbiotic methanogens in diverse termites. *FEMS Microbiology Letters* 171:147–153.

Ohkuma, M., Hongoh, Y., Kudo, T. (2006) Diversity and molecular analyses of yet-uncultivated microorganism. In: *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, pp. 271–301.

Ohkuma, M. (2008) Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends Microbiol* 16: 345–352.

Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I. Inhibition and detoxification. *Bioresource Technol* 74:17–24.

Park, K. S., Ki, C.-S., Kang, C.-I., Kim, Y.-J., Chung, D. R., Peck, K. R., Song, J.-H., Lee, N. Y. (2012) Evaluation of the GenBank, EzTaxon, and BIBI services for molecular identification of clinical culture isolates that were unidentifiable or misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 50:1792–1795.

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. *Appl Environ Microbiol* 8245–8253.

Pfannebecker, J. (2005) Entwicklung einer PCR-Methode zur Stammanalyse von pro- und eukaryotischen Mikroorganismen aus Wein. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Pointing, S. B. (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers* 2:17–33

Rawat, R. & Tewari, L. (2011) Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles* 16:637–644.

Reineke, W. & Schlömann, M. (2015). *Umweltmikrobiologie*, 2. Auflage 2015. Springer Spektrum, Heidelberg, Deutschland.

Reuß, J., Rachel, R., Kämpfer, P., Rabenstein, A., Küver, J., Dröge, S., König, H. (2015) Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut. *Microbiological Res* 179:29–37.

Saadeddin, A. (2014) The complexities of hydrolytic enzymes from the termite digestive system. *CritRev Biotechnol* 34:115–122.

Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H., König, H. (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J Appl Bacteriol* 80:471–478.

Schieder, D. , A. Gronauer, M. Lebuhn, K. Bayer, J. Beck, G. Hiepp und S. Binder (2010): Prozessmodell Biogas. In: Biogas Forum Bayern Nr. III – 03/2010, Hrsg. ALB Bayern e.V.,

URL: https://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf
(Stand 16.11.2016).

Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol R* 61:262–280.

Schmitt-Wagner, D. & Brune, A. (1999) Hydrogen Profiles and Localization of Methanogenic Activities in the Highly Compartmentalized Hindgut of Soil-Feeding Higher Termites (*Cubitermes* spp.). *Appl Environ Microbiol* 65:4490–4496.

Schubert, C. (2006) Can biofuels finally take center stage? *Nat Biotechnol* 24:77–784.

Sebastian, P., Herr, P., Fischer, U., König, H. (2011) Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. *S Afr J Enol Vitic* 32:300–309.

Seedorf, H., Dreisbach, A., Hedderich, R., Shima, S., Thauer, R. K. (2004) $F_{420}H_2$ oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme F_{420} -dependent enzyme involved in O_2 detoxification. *Arch Microbiol* 182:126–137.

Shen, M.-Y. & Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15:2507–2524.

Shinzato, N., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Oshima, T., Yamagishi, A. (1999) Phylogenetic diversity of symbiotic methanogens living in the hindgut of the lower termite *Reticulitermes speratus* analyzed by PCR and In Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65:837–840.

Snyder, T.E. (1949) Catalog of the termites (Isoptera) of the world. *Smithson Misc Coll* 112:1–490.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846–849.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A., Kämpfer P., Maiden, M. C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin L., Ward A. C., Whitman W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043–1047.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33, 152–155.

Stantscheff, R., Kuever, J., Rabenstein, A., Seyfarth, K., Dröge, S., König, H. (2014) Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5719–5735.

Sugimoto, A., Bignell, D., MacDonald J. (2000). Global Impact of Termites on the Carbon Cycle and Atmospheric Trace Gases. In: Abe, Y., Bignell, D. E., Higashi, T. (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Springer Science & Business Media, Dordrecht, Niederlande, pp. 409–435.

Szuhaj, M., Ács, N., Tengölics, R., Bodor, A., Rákhely, G., Kovács, K. L., and Bagi, Z. (2016) Conversion of H₂ and CO₂ to CH₄ and acetate in fed-batch biogas reactors by mixed biogas community: a novel route for the power-to-gas concept. *Biotechnol Biofuels* 9:102.

Taechapoempol, K., Sreethawong, T., Rangsunvigit, P., Namprohm, W., Thamprajamchit, B., Rengpipat, S., Chavadej, S. (2011) Cellulaseproducing bacteria from Thai higher termites, *Microcerotermes* sp.: enzymatic activities and ionic liquid tolerance. *Appl Biochem Biotechnol* 164:204–219

Tholen, A. & Brune, A. (1999) Localization and in situ activities of homoacetogenic bacteria in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes* spp.). *Appl Environ Microbiol* 65:4497–4505.

Tholen, A., Pester, M., Brune, A. (2007) Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiol Ecol* 62:303–312.

Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K., Iefuji, H. (2008) An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expres Purif* 60: 140–146.

Tindall, B. J.; Rosselló-Móra, R.; Busse, H. J.; Ludwig, W.; Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249–266.

Tomme, P., Warren, R. A. J., Gilkes, N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* 37:1–81.

Tokuda, G. & Watanabe, H. (2007) Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol Lett* 3:336–339.

Twigg, R. S. (1945). Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature* 155:401–402.

Warburg, O., Christian, W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. *Biochem* 310:384–421.

Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S. G., Podar, M., Martin, H. G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N. C., Matson, E. G., Ottesen, E. A., Zhang, X., Hernández, M., Murillo, C., Acosta, L. G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B. D., Chang, C., Rubin, E. M., Mathur, E. J., Robertson, D. E., Hugenholtz, P., Leadbetter, J. R. (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450:560–565

Wasserfallen, A., Nölling, J., Pfister, P., Reeve, J., & Conway de Macario, E. (2000) Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:43–53.

Watanabe, H. & Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol* 55:609–632.

Weiland, P. (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:849–860.

Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., König, H. (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J Appl Microbiol* 92:32–40.

Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle G., König, H. (2003) Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *Europ J Protistol* 39:11–23.

Winter, J., Lerp, C., Zabel, H. P., Wildenauer, F. X., König, H., Schindler, F. (1984) *Methanobacterium wolfeii*, sp. nov., a new tungsten-requiring, thermophilic, autotrophic methanogen. *Syst Appl Microbiol* 5:457–466.

Wright, A. D. G. & Pimm, C. (2003). Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *J Microbiol Methods* 55:337– 349.

Wright, E. S., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a searchbased approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 78:717–725.

Yang, J.F., Bordeaux, M. and Smith, P.H. (1985) Isolation of methanogenic bacteria from termites. In: Abstracts of the 85th Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Abstr. I-83, p. 160. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Yang, B. & Wyman, C. E. (2008) Pretreatment: the key to unlock low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Biorefin* 2:26–40.

Zambare, V. P., Bhalla, A., Muthukumarappan, K., Sani, R. K., Christopher, L. P. (2011) Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles* 15:611–618.

Zeikus, J. G. & Wolfe, R. S. (1972) *Methanobacterium autotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J Bacteriol* 109:707–713.

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y. (2014) Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog Energy Combust Sci* 42:35–53.

Zimmerman, P. R., Greenberg, J. P., Wandiga, S. O., Crutzen, P. J. (1982) Termites: a potentially large source of atmospheric methane, carbon dioxide, and molecular hydrogen. *Science* 218:563–565.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Wachstum der Hefe *S. flava* OO2 und Bestimmung der Cellulase-Aktivität aus dem Überstand. Angegeben ist die Optische Dichte (OD) bei 590 nm (Doppelbestimmung) und die Aktivität in Units gegen die Zeit in Stunden. Die zugehörige Abbildung 3.1 kann dem Ergebnisteil entnommen werden. - nicht durchgeführt.

	Zeit [h]						
	0	20	43	77	100	172	196
	Optische Dichte [OD _{590 nm}]						
OO2 1	0,15	1,20	2,00	2,40	3,40	3,00	2,60
OO2 2	0,18	1,10	2,00	2,60	3,40	3,00	2,80
MW	0,17	1,15	2,00	2,50	3,40	3,00	2,70
	Aktivität [Units]						
	-	-	920	920	-	974	-

Tabelle 7.2: pH-Spektrum der Cellulase Cel1. Die zugehörige Abbildung findet sich im Ergebnisteil (Abbildung 3.6 A).

	pH-Wert						
	2	3	3,5	4	4,5	5	5,5
	Extinktion _{590 nm}						
Probe 1	0,02	0,05	0,61	0,90	0,88	0,48	0,21
Probe 2	0,02	0,07	0,56	0,88	0,83	0,48	0,22
MW	0,02	0,06	0,59	0,90	0,90	0,48	0,22
	relative Aktivität [%]						
	2	7	66	100	100	53	24

Tabelle 7.3: Temperatur-Spektrum der Cellulase Cel1. Die zugehörige Abbildung 3.6 B kann dem Ergebnisteil entnommen werden.

	Temperatur						
	30	40	50	60	70	80	90
	Extinktion _{590 nm}						
Probe 1	0,43	0,88	1,29	1,70	0,99	0,72	0,00
Probe 2	0,45	0,83	1,27	1,60	1,48	0,71	0,00
MW	0,44	0,90	1,28	1,70	1,24	0,72	0,00
	relative Aktivität [%]						
	26	53	75	100	73	42	0,00

Tabelle 7.4: pH-Stabilität der Cellulase Cel1. Die zugehörige Abbildung findet sich im Ergebnisteil (Abbildung 3.6 C).

	pH-Wert							
	2	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
	Extinktion_{590 nm}							
Probe 1	0,34	1,08	1,37	1,59	1,65	1,64	1,64	1,20
Probe 2	0,43	1,00	1,43	1,48	1,65	1,50	1,63	1,42
MW	0,39	1,04	1,40	1,50	1,65	1,57	1,64	1,31
	relative Aktivität [%]							
	24	63	88	91	100	95	99	79

Tabelle 7.5: Endproduktthemmung der Cellulase Cel1. Die zugehörige Abbildung 3.6 D kann dem Ergebnisteil entnommen werden.

	Endkonzentration an Cellobiose [%]									
	0	4,8	5,7	6,6	7,5	8,4	10,2	12	21	25,5
	Extinktion_{590 nm}									
Probe 1	1,61	1,4 6	1,48	1,39	1,31	1,12	1,12	1,09	0,9	0,82
Probe 2	1,61	1,5	1,36	1,44	0,39	1,16	1,15	1,07	0,9	0,82
MW	1,61	1,4 8	1,42	1,42	1,35	1,14	1,14	1,08	0,9	0,82
	relative Aktivität [%]									
	100	92	88	88	84	71	67	56	56	51

Tabelle 7.6: SAPD-PCR Fragmentmuster. Die zugehörige Abbildung findet sich im Ergebnisteil (Abbildung 3.13).

Stamm	DSM Nr.	Amplifikationsprodukte mit Primer A-Not in bp															
<i>M'thermobacter crinale</i> Tm2 ^T	DSM 24598 ^T	12000	3296	2088	1854	1354	1083	1037	878	794	718	261	215				
<i>M'thermobacter defluvii</i> ADZ ^T	DSM 7466 ^T	28000	4257	2574	2134	1677	1562	1473	1367	1101	953	849	814	775	700	353	334
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T	DSM 2133 ^T	27600	2375	1764	1643	1473	1367	1211	1056	807	688	611	515	412			
<i>M'thermobacter tenebrarum</i> RMAS ^T	DSM 23052 ^T	27600	3719	2181	2043	1729	1594	1244	944	462	369	231					
<i>M'thermobacter thermautotrophicus</i> Delta H ^T	DSM 1053 ^T	26800	2157	1712	1460	1037	908	849	787	573	466	361					
<i>M'thermobacter thermoflexus</i> IDZ ^T	DSM 7268 ^T	27600	3887	2612	2111	1927	1660	1460	1367	1092	953	849	775	700	584	445	365
<i>M'thermobacter thermophilus</i> M ^T	DSM 6529 ^T	26800	2694	2111	1694	1460	1037	900	849	775	688	617	567	353			
<i>M'thermobacter wolfeii</i> ^T	DSM 2970 ^T	27200	2277	1945	1764	1578	1316	1028	762	600	492						
<i>M'thermobacter wolfeii</i> SIV6	Isolat	30800	27200	1927	1578	1019	821	768	487								

Stamm	DSM Nr.	Amplifikationsprodukte mit Primer T-Not in bp													
<i>M'thermobacter crinale</i> Tm2 ^T	DSM 24598 ^T	3000	2654	2415	1886	1659	1248	1132	786	208					
<i>M'thermobacter defluvii</i> ADZ ^T	DSM 7466 ^T	3086	1984	1837	1659	1098	864	807	594	400	348	282	214		
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T	DSM 2133 ^T	2500	2359	1468	1192	425	276								
<i>M'thermobacter tenebrarum</i> RMAS ^T	DSM 23052 ^T	3336	2654	1724	1018										
<i>M'thermobacter thermautotrophicus</i> Delta H ^T	DSM 1053 ^T	2911	2387	2276	1063	850	779	578	378	200					
<i>M'thermobacter thermoflexus</i> IDZ ^T	DSM 7268 ^T	2956	2387	2170	1967	1756	1643	1548	1072	857	800	650	578	378	
<i>M'thermobacter thermophilus</i> M ^T	DSM 6529 ^T	2738	2387	2249	1054	850	786	578	374	200					
<i>M'thermobacter wolfeii</i> ^T	DSM 2970 ^T	3377	2170	1579	935	857	545	293							
<i>M'thermobacter wolfeii</i> SIV6	Isolat	935	857	545	293	200									

Tabelle 7.7: Methanproduktion methanogener Typstämme und des Isolats *Methanothermobacter wolfeii* SIV6. Aufgetragen ist die Methanproduktion in oder mmol/l gegen die Zeit in Stunden. Es wurden von jedem Stamm immer zwei Kulturen Kultur 1 (K1) und Kultur 2 (K2) auf die Entstehung von Methan überprüft. Die zugehörige Abbildung findet sich im Ergebnisteil (Abbildung 3.14). - nicht ermittelt.

Stamm	Zeit [h]		
	48	54	100
	Methanproduktion [mmol/l]		
<i>M'bacterium formicicum</i> MF ^T K1	8	-	24
<i>M'bacterium formicicum</i> MF ^T K2	7	-	20
<i>M'bacterium thermaggregans</i> ^T K1	11	11	17
<i>M'bacterium thermaggregans</i> ^T K2	12	40	47
<i>M'thermococcus thermolithotrophicus</i> SN-1 ^T K1	25	58	87
<i>M'thermococcus thermolithotrophicus</i> SN-1 ^T K2	19	42	70
<i>M'culleus thermophilus</i> CR-1 ^T K1	12	15	32
<i>M'culleus thermophilus</i> CR-1 ^T K2	11	15	32
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K1	8	20	38
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K2	11	27	47
<i>M'thermobacter wolfeii</i> ^T K1	10	11	39
<i>M'thermobacter wolfeii</i> ^T K2	7	9	36
<i>M'thermobacter wolfeii</i> SIV6 K1	24	49	66
<i>M'thermobacter wolfeii</i> SIV6 K2	4	33	50
<i>M'thermus fervidus</i> V24 S ^T K1	28	77	125
<i>M'thermus fervidus</i> V24 S ^T K2	3	45	83

Tabelle 7.8: Methanproduktion von *M'thermobacter marburgensis*^T in Medium 287 mod., 287 mod. mit Reaktorfiltrat (287 mod. + Rf) und in Medium 287 mod. mit Fermenterinhalt (287 mod. + Fi). Aufgetragen ist die Methanproduktion. Die zugehörige Abbildung findet sich im Ergebnisteil (Abbildung 3.15).

Stamm	Zeit [h]				
	48	54	100	240	360
	Methanproduktion [mmol/l]				
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K1 DSMZ 287 mod.	8	20	38	75	134
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K2 DSMZ 287 mod.	11	27	47	86	134
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K1 DSMZ 287 mod. + Rf	13	81	195	243	312
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K2 DSMZ 287 mod. + Rf	18	78	218	276	349
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K1 DSMZ 287 mod. + Fi	14	53	222	257	326
<i>M'thermobacter marburgensis</i> Marburg ^T K2 DSMZ 287 mod. + Fi	9	39	174	204	264

Neben den in Tabelle 7.9 aufgeführten kommerziell erhältlichen Cellulasen sind noch zahlreiche weitere rekombinante Cellulasen erhältlich.

Tabelle 7.9: Kommerziell erhältliche Cellulasen und ihre Eigenschaften.

Enzym	Bezeichnung	Hersteller	Quelle	pH-Optimum (Stabilität)	Temp.-Optimum (Stabilität) [°C]	Aktivität	Bemerkungen
Cellulase	C2730	Sigma-Aldrich	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	4,5-6,0	50-60	¹⁾	-
	C2605	Sigma-Aldrich	<i>Aspergillus</i> sp.	8,0-8,2	~ 60 40	-	-
	NATE-0118 nativ	Creative Enzymes	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	>0,3 units/mg solid ²⁾	-
	NATE-0119 nativ	Creative Enzymes	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	> 5,000 units/g solid ²⁾	-
pH-stabile Cellulase	NATE-0120 nativ	Creative Enzymes	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC26921	- (4,2 – 5,2)	-	Typ 1 > 25 units/mg Trockengewicht ³⁾ Typ 2 > 45 units/ mg Trockengewicht ³⁾	Aktivatoren: Nichtionische Detergentien wie TritonX-100 Inhibitoren: Kohlenhydrate, besonders Cellobiose und ein Überschuss an Cellulose
Thermostabile Cellulase	C9624 rekombinant	Sigma-Aldrich	<i>Dictyoglomus turgidum</i> rekombinant	-	-	⁴⁾	Molekulargewicht: 37 kDa; zeigt Endo-Cellulase, β -glucanase und β -Mannase Aktivität sowie Exo-Cellulase und Cellobiohydrolase Aktivität (bei unlösl. Azur-Cellulose Substraten)
	NATE-0121 rekombinant	Creative Enzymes	<i>Clostridium thermocellum</i>	-	-	> 40 U/mg Protein ⁴⁾	-
	NATE-1056 rekombinant	Creative Enzymes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6,0 (4,0 – 9,0)	60	82 U/mg protein (bei CMC, 4 M) bei pH 6 und 40 °C 168 U/mg protein (bei CMC, 4 M) bei pH 6 und 60 °C	Molekulargewicht: ~ 34,300

Fortsetzung Tabelle 7.9.

Enzym	Bezeichnung	Hersteller	Quelle	pH-Optimum (Stabilität)	Temp.-Optimum (Stabilität) [°C]	Aktivität	Bemerkungen
pH- & thermo-stabile Cellulase	NATE-1055 rekombinant	Creative Enzymes	<i>Thermotoga maritima</i>	6,0 pH Stability (3,0 – 9,0)	80 (bis zu 80)	245 U/mg protein (bei CMC, 4 M) bei pH 6 und 80 °C ~ 53 U/mg protein (bei CMC, 4 M) bei pH 6 und 40 °C ⁵⁾	Molekulargewicht: ~ 38,200
	NATE-1057	Creative Enzymes	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4,5-5 (2,5 – 7,5)	70 (< 65)	ca. ~ 70 U/mg	-
	NATE-1058		<i>Talaromyces emersonii</i>	4,5-4,6 (3,0 – 8,0)	70 (< 70)	64 U/mg	-
	ROHAMENT® CL	AB Enzymes	<i>Trichoderma reesei</i>	4,0-5,0	60	15,000 ECU/g	-
Enzymmischung	Cellic CTec2	Sigma-Aldrich		5,0-5,5	50-55	-	Enthält Cellulase, β-Glucosidase und Hemicellulase

¹⁾ Eine EGU (Endoglucanase Unit) wird relativ zu einem Novozymes-Cellulase-Standard gemessen. Es wird Carboxymethylcellulose (CMC) als Substrat verwendet und die Untersuchung bei 40 °C und pH 6,0 durchgeführt.

²⁾ Eine Unit setzt 1,0 µmol Glucose aus Cellulose innerhalb von einer Stunde bei 37 °C und pH 5,0 (2 h Inkubationszeit) frei.

³⁾ Eine Unit setzt 0,01 mg Glucose aus mikrokristalliner Cellulose innerhalb von einer Stunde bei 37 °C und pH 5,0 frei.

⁴⁾ Eine Unit produziert 1 µmol an Zucker (als Glucose gemessen) aus β-Glucan bei 70 °C und pH 5,8 innerhalb einer Minute.

⁵⁾ Eine Unit an Cellulase-Aktivität ist definiert als die Summe an Enzym, das für die Freisetzung von 1 µmol an Glucose aus CMC 4 M (10 mg/mL) in Natrium-Phosphat-Puffer (100 mM) bei pH 6 verantwortlich ist.

- = keine Angabe.

8. Eidesstattliche Erklärung

9. Danksagung

10. Lebenslauf