

Entwicklung einer biotechnologischen Produktionskette von Gemüseabfall hin zu Plattformchemikalien

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Annemarie Schmidt

Dekan: Professor Dr. Reinhard Fischer

Referent: Professor Dr. Johannes Gescher

Koreferent: Professor Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Fachzeitschriften

Schmidt, A., Sturm, G., Lapp, C. J., Siebert, D., Saravia, F., Horn, H., Ravi, P. P., Lemmer, A. and Gescher, J. (2018). „Development of a production chain from vegetable biowaste to platform chemicals.“

Microbial Cell Factories 2018, **17:90**.

Kongressbeiträge

Schmidt, A., Klessing, T. and Gescher, J. (2017). „Conversion of biomass from waste to platform chemicals.“

Posterpräsentation, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 05.03. - 08.03.2017, Würzburg, Deutschland.

Schmidt, A., Prokhorova, A., Weber, A., Kipf, E., Kerzenmacher, S., Gauert, M., Lemmer, A., Ravi, P. P. and Gescher, J. (2017). „Bioelectrochemical systems as tools to steer anaerobic digestion processes.“

Vortrag, European Fuel Cell Forum (EFCF), 04.07. - 07.07.2017, Luzern, Schweiz.

Zusammenfassung

Durch die Energiewende liegt ein Fokus auf einer effizienteren Abfallverwertung und der Vermeidung von Energieverschwendung. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein aus Gemüseabfällen gewonnenes Fermentat ein potentiell geeignetes Substrat für ein bioelektrochemisches System darstellt. Dieses System sollte es ermöglichen, die Oxidation organischer Reststoffe mit der Produktion von Strom zu koppeln. Es wurde gezeigt, dass das Fermentat ein geeignetes Substrat darstellt, und die enthaltenen organischen Säuren von Mikroorganismen im bioelektrochemischen System zu CO_2 oxidiert werden können. Dabei wurden anfallende Elektronen des Stoffwechsels auf die Anode des Systems übertragen und es konnte ein Strom gemessen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die organischen Säuren Acetat und Butyrat nahezu vollständig abgebaut werden, während die Säure Propionat zunächst nicht oder nur im geringen Maße abgebaut wird und daher im Fermentat verbleibt, bis Acetat und Butyrat vollständig oxidiert sind. Erst wenn kein anderes Substrat mehr zur Verfügung steht, wird auch Propionat abgebaut. Durch Einsatz eines Inhibitors konnte gezeigt werden, dass der Großteil des Acetat-Abbaus sowie ein Teil des Butyrat-Abbaus durch Methanogenese bedingt ist. Der Verdacht auf Beteiligung methanogener Organismen wurde zudem über eine 16S rRNA- sowie eine Metatranskriptomanalyse bestätigt.

Um die Produktionskette abzuschließen, wurden bakterielle Produktionsstämme entwickelt, die in der Lage sind, Propionat zu Plattformchemikalien umzusetzen und so auch diese eher reaktionsträge Säure zu einem wertvollen Endprodukt umzusetzen. Hierfür wurden zudem Filtrationsprozesse in die Kette integriert, um das Fermentat nach der Behandlung im bioelektrochemischen System von Schwebstoffen zu befreien und eine Aufkonzentrierung des Propionats zu erreichen. Insgesamt konnten so aus Gemüseabfallfermentat $190,83 \pm 52,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ Strom gewonnen werden. Bei der Veredelung zu Plattformchemikalien konnten aus Propionat 494,30 mg/l Acetoin mit einer Umsetzungsrate von 45,53 % und 456,68 mg/l 1-Propanol mit einer Umsetzungsrate von 97,97 % produziert werden.

Durch die Aneinanderreihung von biotechnologischen Prozessen bietet diese Arbeit einen innovativen Lösungsansatz für die Verwertung von Bioabfällen sowie eine Möglichkeit zur nachhaltigen Energiegewinnung.

Abstract

The energy revolution relies to a huge extent on efficient waste management and prevention of energy loss. In this work, a fermentate obtained from vegetable biowaste was used as substrate for a bioelectrochemical system. The working hypothesis was that the microbial community of the system would catalyse a direct conversion of chemical energy stored in the organic compounds into electrical energy. It could be shown that the vegetable fermentate is a suitable substrate for the system and that the organic acids acetate and butyrate can be degraded to CO₂. This was accompanied by a transfer of respiratory electrons onto the anode of the system. Further, it was shown that the organic acids acetate and butyrate are nearly completely degraded, while propionate was not or only poorly degraded until acetate and butyrate were depleted. From the timepoint where only propionate was available to the community, also this organic acid was oxidised completely. By addition of an inhibitor, it was shown that the major part of acetate degradation as well as one part of butyrate degradation was performed by methanogenic organisms. The suspicion of methanogenesis in the system was further affirmed by a 16S rRNA as well as a metatranscriptomic analysis.

To complete the production chain, bacterial production strains were developed to transform propionate to platform chemicals. For this purpose, filtration processes were integrated in the chain to clean the treated fermentate from suspended matter and to reach a concentration of propionate. All in all, $190,83 \pm 52,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ current could be measured in the bioelectrochemical system fed with vegetable fermentate. For refinement from propionate, 494,30 mg/l acetoin with a conversion rate of 45,53% as well as 456,68 mg/l 1-propanol with a conversion rate of 97,97% could be produced. With this concatenation of biotechnological processes, this work provides an innovative solution approach for the utilization of biowaste as well as a clean alternative for energy production.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt. Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2015 bis März 2019 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Abstract	III
Erklärung an Eides Statt	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Einführung: Aktueller Stand der Bioabfallentsorgung	1
1.2 Biogasproduktion	2
1.2.1 Daten und Fakten zur Biogasproduktion in Deutschland	2
1.2.2 Ablauf der Biogasproduktion	4
1.2.3 Zweiphasige Fermentation	6
1.3 Propionsäure	6
1.3.1 2-Methylcitratzyklus	8
1.3.2 Methylmalonyl-CoA Weg	9
1.4 Bioelektrochemisches System	10
1.4.1 Aufbau eines bioelektrochemischen Systems	11
1.4.2 Elektronenübertragung	12
1.5 Produktion von Plattformchemikalien	15
1.6 Ziele der Arbeit	17
2 Material	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.3 Medien und Puffer	20
2.4 Substrat für das Bioelektrochemische System	25
3 Methoden	25
3.1 Molekular- und Mikrobiologische Methoden	25
3.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	25
3.1.2 Konservierung von Bakterienstämmen	26
3.1.3 DNA-Gewinnung und -aufreinigung	26
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.1.5 Isothermale in vitro Ligation	30
3.1.6 Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation	31
3.1.7 Gen-Inaktivierung nach Datsenko und Wanner	32
3.1.8 Sequenzierung	33
3.1.9 Crossflow-Filtration und Nanofiltration	33
3.1.10 Zellsuspensionsassay zur Produktion von Plattformchemikalien	33
3.2 Elektrochemische Methoden	34
3.2.1 Bioelektrochemisches System	34
3.2.2 Coulomb'sche Effizienz (CE)	35

3.3	Analytische Methoden	37
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	37
3.3.3	Gaschromatographie (GC)	38
3.3.4	Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC)	38
3.3.5	Bioinformatische Analyse	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Repetitiver Chronoamperometrie-Versuch (Rep-CHR)	40
4.1.1	Stromentwicklung im Bioelektrochemischen System	40
4.1.2	Entwicklung der organischen Säuren und des gesamten organischen Kohlenstoffs im Bioelektrochemischen System	42
4.2	Open Circuit Potential-Versuch (OCP)	46
4.2.1	Entwicklung des Potentials, der organischen Säuren und des gesamten organischen Kohlenstoffs im bioelektrochemischen System	46
4.3	Chronoamperometrie- vs. Open Circuit Potential-Versuch (CHR-OPC)	47
4.4	16S rRNA Sequenzierung	48
4.4.1	16S rRNA Sequenzierung des Rep-CHR	48
4.4.2	16S rRNA des CHR-OCP-Versuchs	49
4.5	Isolierung von Organismen aus dem Fermentat	52
4.6	Metatranskriptomanalyse	54
4.6.1	Metatranskriptom des Rep-CHR	54
4.7	Coulomb'sche Effizienz	58
4.7.1	Coulomb'sche Effizienz des Rep-CHR	58
4.7.2	Inhibierung der Methanogenese und Coulomb'sche Effizienz	59
4.8	Ankonzentrierung des Effluenten durch Nanofiltration	61
4.9	Produktion von Plattformchemikalien	62
4.9.1	Produktion von Acetoin	62
4.9.2	Produktion von 1-Propanol	69
5	Diskussion	72
5.1	Repetitiver Chronoamperometrie-Versuch (Rep-CHR)	72
5.1.1	Coulombsche Effizienz	74
5.1.2	Metatranskriptom	75
5.2	OCP und CHR-OCP	79
5.3	Nanofiltration und Produktion von Plattformchemikalien	81
6	Ausblick	86
	Quellen- und Literaturverzeichnis	100

Abbildungsverzeichnis

1	Entwicklung der Anzahl an Biogasanlagen in Deutschland seit 1992. Nach Fachverband Biogas (2018).	2
2	Netto-Bilanz der vermiedenen Treibhausgas-Emissionen durch die Nutzung erneuerbarer Energien im Jahr 2017. Nach BMWi (2018).	3
3	Prozess der Biogasentstehung, unterteilt in die vier Schritte Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Nach Ersahin et al. (2011). . . .	4
4	A. Aufbau des <i>prp</i> -Operons im Genom von <i>E. coli</i> K-12 mit den repetitiven, nichtkodierenden, palindromischen Elementen REP25 und REP26. B. Ablauf des 2-Methylcitratzyklus in <i>E. coli</i> K-12. Nach Simonte et al. (2017).	8
5	Ablauf des Methylmalonyl-CoA-Weges.	10
6	Schematischer Aufbau des bioelektrochemischen Systems, bestehend aus zwei Kammern (Anodenkammer und Kathodenkammer) mit einem Drei-Elektroden-Setup und einer Protonenaustauschmembran. Das angelegte Potential von 0 mV vs. SHE wird über einen Potentiostaten kontrolliert, dieser wird auch zur Stromaufzeichnung genutzt.	11
7	Mechanismen der Elektronenübertragung auf einen externen Elektronenakzeptor bei Mikroorganismen. A. Es ist ein direkter Transfer über äußere Membrancytochrome oder über sogenannte Nanowires möglich. B. Ein vermittelter Elektronentransfer inkludiert ein Shuttle, das Elektronen in der Zelle aufnimmt und zum Elektronenakzeptor, wie zum Beispiel der Anode, transportiert. Nach Sayed und Abdelkareem (2017).	13
8	Zusammenfassung der für die Produktion der Plattformchemikalien Acetoin bzw. 2,3-Butandiol (gelb) und 1-Propanol (grün) relevanten Stoffwechselwege. Diese stehen in Zusammenhang mit Glykolyse (blau), Citratzyklus (lila), 2-Methylcitratzyklus (orange) und Methylmalonyl-CoA-Weg (braun).	16
9	Graphische Zusammenfassung des Projekts. Die Schritte, die nicht in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind abgetrennt und ausgeblendet.	17
10	Aufbau des bioelektrochemischen Systems, bestehend aus zwei Kammern (Anodenkammer und Kathodenkammer) mit einem Drei-Elektroden-Setup. Nach Golitsch (2016).	34
11	Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf 2. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.	41
12	Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf 11. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.	42
13	Potentialverlauf im bioelektrochemischen System, OCP. Potential in mV, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.	46

14	Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung des Rep-CHR-Experimentes. A. Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm. B. Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm.	48
15	Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung des CHR-OCP-Experimentes. A. Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm, CHR-Experiment. B. Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm, OCP-Experiment. C. Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm, CHR-Experiment. D. Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm, OCP-Experiment. Für nicht zuzuordnende Familien wurde die Ordnung angegeben.	50
16	Ergebnisse der Metatranskriptomanalyse, Acetatabbau. A. Verteilung für das Enzym Acetat Kinase. B. Verteilung für das Enzym Phosphat-Acetyltransferase. C. Verteilung für das Enzym Acetyl-CoA Synthetase.	55
17	Ergebnisse der Metatranskriptomanalyse, Butyratabbau und Elektronentransfer. A. Verteilung für das Enzym Butyrat Kinase. B. Verteilung für das Enzym Phosphat-Butyryltransferase. C. Verteilung für das Enzym Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase. D. Verteilung für das Enzym Cytochrom C.	56
18	Coulomb'sche Effizienzen [in %] für alle Experimentläufe, sowie der Durchschnitt [Ø] der Coulomb'schen Effizienzen aller Läufe.	58
19	Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf mit Zugabe von 2-Bromoethansulfonat. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt. Die Zugabe des Inhibitors nach 7,1 Tagen ist markiert durch den grünen gestrichelten Pfeil.	59
20	Coulomb'sche Effizienzen (CE) [in %], berechnet vor und nach Zugabe des Inhibitors 2-Bromoethansulfonat. Die CE wurde wie in 4.7.1 beschrieben berechnet. In A. ist die CE, berechnet aus den Elektronen aus dem TOC gezeigt. In B. findet sich die CE, berechnet aus den Elektronen aus Acetat und Butyrat, und in C. die CE, berechnet aus Butyrat.	60
21	Wachstumskurve der Stämme <i>E. coli</i> K-12 Wildtyp, <i>E. coli</i> K-12 Δrnr und <i>E. coli</i> K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ in M9-Minimalmedium mit 30 mM Propionat als einziger Kohlenstoffquelle.	63
22	Wachstumskurve des Stamms <i>E. coli</i> K-12 Δrnr in sterilem Fermentat, das 20 mM Propionat enthielt. Vor dem Autoklavieren wurde dem Fermentat 50 mM HEPES zugegeben und der pH auf 7 eingestellt.	64
23	Wachstumskurve der Stämme <i>S. oneidensis</i> $\Delta \lambda \Delta ack\Delta pta$ mit dem Plasmid pBAD_alsS_alsD und <i>Corynebacterium glutamicum</i> (ATCC 13032 TM) in sterilem Fermentat, das ca. 20 mM Propionat enthielt. Vor dem Autoklavieren wurde dem Fermentat 50 mM HEPES zugegeben und der pH auf 7 eingestellt.	65
24	Adaptierungsversuch mit dem Stamm <i>E. coli</i> K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ in Minimalmedium M9 mit 30 mM Propionat. Der Stamm wurde immer mit einer Start-OD ₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei einer End-OD ₆₀₀ > 1 in frisches Medium überführt.	66
25	Wachstumskurve des Stamms <i>E. coli</i> K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ mit dem Plasmid pMAL_alsS_alsD in M9-Medium mit 30 mM Propionat. Es wurde zum Einen der bereits adaptierte und zum Anderen der nicht adaptierte Stamm von LB-Agarplatte in LB-Flüssigmedium vorinkubiert, bevor beide in M9 Medium mit 30 mM Propionat überführt wurden.	67

26	Produktionsergebnisse des Zellsuspensionsassays des <i>E. coli</i> K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ -pMAL_alsS_alsD in M9-Medium mit 30 mM Propionat Startkonzentration, 100 mg/ml Ampicillin und 50 μ M IPTG.	68
27	Graphische Darstellung der Hypothese für Stoffwechselverteilungen im bioelektrochemischen System. Ack Acetat Kinase; Pta Phosphat Acetyltransferase; Acs Acetyl-CoA Synthetase; Buk Butyrat Kinase; Ptb Phosphat Butyryltransferase; BcAct Butyryl-CoA:Acetat CoA-Transferase; Cyt c Cytochrom c; HS Huminstoffe.	77

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.	19
2	Zusammensetzung des Lysogeny Broth-Mediums (LB, Lennox). Durch Zugabe von 2 % Agar wurde LB-Agar hergestellt.	20
3	Zusammensetzung des Super Optimal Broth (SOB)-Mediums.	20
4	Zusammensetzung des Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)-Mediums.	20
5	Zusammensetzung des Geobacter-Mediums.	21
6	Zusammensetzung des R2A-Mediums.	22
7	Zusammensetzung des DM630-Mediums.	22
8	Zusammensetzung des M9 Mediums.	23
9	Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung.	23
10	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100x).	23
11	Zusammensetzung der NB-Spurenelementlösung (100x).	24
12	Zusammensetzung der Vitaminlösung (100x).	24
13	Zusammensetzung eines präparativen sowie eines analytischen Ansatzes für eine PCR. Der analytische Ansatz wurde für Kolonie-PCRs genutzt, daher wurde hier keine DNA-Lösung, sondern Zellmaterial des zu testenden Stammes zugegeben.	27
14	Temperaturprotokoll einer PCR. Schritte 2 bis 4 wurden im Thermocycler 30 mal wiederholt.	27
15	In dieser Arbeit verwendete Primer.	28
16	Zusammensetzung des Reaktionspuffers für die isothermale in vitro Ligation.	31
17	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die isothermale in vitro Ligation.	31
18	Zusammensetzung des Tris-Acetat EDTA (TAE) Puffers.	37
19	Sequenzierungsprimer.	39
20	Durchschnitt, Maxima und Minima im Stromverlauf im bioelektrochemischen System, gegeben in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	40
21	Start- und Endkonzentrationen für die gemessenen organischen Säuren im bioelektrochemischen System, gegeben in mM.	43
22	Gemessener TOC im bioelektrochemischen System zu Beginn und Ende des Experimentes, sowie die Abbaurate in [%] und $[\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{h}]$	45
23	Konzentrationen an Säuren und TOC im bioelektrochemischen System für das CHR-OCP-Experiment zu Beginn und Ende des Experimentes.	47
24	Organismen, die aus Fermentat isoliert werden konnten. Gegeben sind die Parameter der BLAST-Suche (Query Coverage, E-Value und Identity) sowie die Wachstumsparameter, mit denen die Organismen isoliert wurden (Medium, Temperatur, Stoffwechsel im Bezug auf Sauerstoff, Kultivierung).	53
25	Ergebnisse des Nanofiltrationsprozesses. Untersucht wurden die beiden Membranen NF90 und NF270, beide mit einem durch das bioelektrochemische System und durch Crossflow Filtration vorbehandelten Fermentat. Gegeben sind Volumen in der Rührzelle zu Beginn sowie zum Ende des Experiments und die darin gemessene Konzentration an Propionat. Die letzte Spalte gibt den Faktor an, um den das zu Beginn gemessene Propionat ankonzentriert wurde.	62

- 26 Ergebnisse der Zellsuspensionsassays zur Produktion von 1-Propanol. Es wurde der Stamm *Escherichia coli* K12 Δrnr $\Delta prpC$ mit verschiedenen Plasmiden in M9 Medium mit 30 mM Propionat und 50 mM Glycerin verwendet. Zur Erhaltung des Plasmids wurde dem Medium 50 mg/ml Kanamycin zugesetzt. Die Induktion des Plasmids wurde durch die Zugabe von 1 mM Arabinose erreicht. Die Konzentrationen aller Substanzen wurden über die HPLC bestimmt. 70

Abkürzungsverzeichnis

Ag/AgCl	Silber-Silberchlorid
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CE	Coulomb'sche Effizienz
CH ₄	Methan
CHR-OCP	Chronoamperometrie- vs. Open Circuit Potential-Versuch
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CO ₂	Kohlendioxid
Δ	Gen-Deletion
DIET	Direkter Interspezies-Elektronentransfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GC	Gaschromatographie
<i>G. sulfurreducens</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Proton
H ₂	Wasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
NF	Nanofiltration
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ = 600 nm
OCP	Open Circuit Potential
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEM	Protonenaustauschmembran
PHB	Polyhydroxybutyrat
RNA	Ribonukleinsäure
Rep-CHR	Repetitiver Chronoamperometrie-Versuch
<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
TAE	Tris-Acetat EDTA
TC	gesamter Kohlenstoff
TIC	gesamter anorganischer Kohlenstoff
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff

1 Einleitung

1.1 Einführung: Aktueller Stand der Bioabfallentsorgung

Weltweit werden jährlich etwa 1,3 Milliarden Tonnen Nahrungsmittel weggeworfen. Das bedeutet, dass etwa ein Drittel aller Nahrungsmittel nicht für den Konsum verwendet werden (FAO, 2011). Diese Nahrungsmittelabfälle werden in vielen Ländern häufig in Mülldeponien entsorgt, was zu Grundwasserverschmutzung, Freisetzung von Treibhausgasen sowie zur Verbreitung von pathogenen Mikroorganismen führen kann (Kjeldsen et al., 2002; Gollapalli und Kota, 2018). In Deutschland sammelten im Jahr 2006 mehr als die Hälfte aller Einwohner ihre Bioabfälle nicht separat (Kern, 2014). Seit Januar 2015 besteht die gesetzliche Pflicht zur getrennten Sammlung von Bioabfällen für alle Landkreise und kreisfreien Städte in Deutschland. Dennoch wird fast in jedem fünften Kreis noch immer nicht flächendeckend die Biotonne angeboten, was zur gemischten Sammlung von Rest- und Bioabfall führt. Dieser Mischabfall wird nach Sortierung und mechanischer Trennung häufig verbrannt, obwohl der enthaltene Bioabfall viel mehr Potential bietet und für die Verbrennung auch zu viel Feuchtigkeit enthält.

Ein Großteil des tatsächlich getrennt gesammelten Bioabfalls wird in Deutschland über Kompostierung entsorgt. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland 225 Kompostierungsanlagen untersucht. In diesen Anlagen wurden hauptsächlich Bioabfälle aus getrennter Sammlung sowie Grünabfälle verarbeitet. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um kleine Anlagen, die unter 10.000 Tonnen pro Jahr Material umsetzen, wobei der Großteil Grünabfall darstellt. Bei größeren Anlagen, die 10.000 bis 30.000 Tonnen Material pro Jahr umsetzen, ist im Schnitt mehr Bioabfall verwendet worden. Als Hauptendprodukt der Kompostierung wird zu über 75 % Kompost gewonnen, unabhängig von der Anlagengröße. Andere Produkte sind Brennstoffe, Störstoffe, Prozessabwasser und Rückgut. Zwischen 40 % und 60 % des Komposts wird in der Landwirtschaft eingesetzt, der Rest fließt in Landschaftsbau, Gartenbau und an Privatverbraucher.

Insbesondere in größeren Anlagen muss der Rottekörper aktiv belüftet werden. Dies geschieht durch Saug- oder Druckbelüftung. Durch die Belüftung werden aerobe Bedingungen beibehalten und so die Entstehung von Treibhausgasen wie Methan verhindert. Zusätzlich muss jedoch die entstehende Abluft behandelt werden, um Gase und Gerüche zu entfernen. Dies erfolgt zumeist durch sogenannte Biofilter, die durch enthaltene Mikroorganismen gasförmige organische Materialien abbauen (Rettenberger et al., 2012). Zuvor wird das Rohgas durch einen Befeuchter geleitet, der zur Kühlung, Befeuchtung und Abreinigung von Staubpartikeln dient. Beim Kompostierungsprozess kann der Rottekörper eine Temperatur

von ca. 70 °C erreichen (Kern, 2014), welche zur teilweisen Abtötung der Organismen führt, jedoch eine vollständige Entfernung aller pathogenen Organismen nicht garantieren kann. Schritte wie die oben beschriebene Belüftung und Abluftbehandlung fallen gerade bei großen Anlagen an und führen zu steigenden Kosten. Unter Gesichtspunkten der Energiegewinnung hat daher der anaerobe Vergärungsprozess einige Vorteile. Dieser wird in Deutschland in Biogasanlagen eingesetzt, um aus Biomasse Biogas zu gewinnen.

1.2 Biogasproduktion

1.2.1 Daten und Fakten zur Biogasproduktion in Deutschland

Deutschland ist derzeit Vorreiter im Bereich Biogas. So stieg die Anzahl der Biogasanlagen kontinuierlich bis auf einen Stand von 9300 im Jahre 2017 (vgl. Abb. 1) (Fachverband Biogas, 2018).

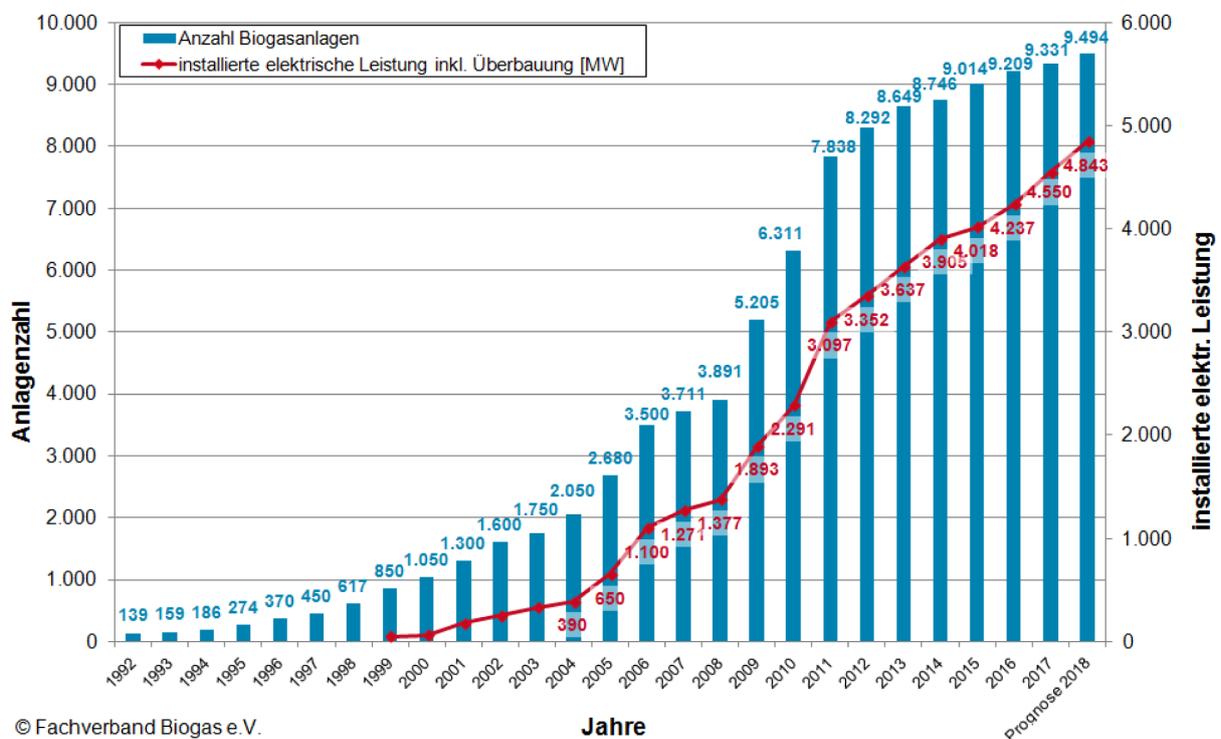


Abbildung 1: Entwicklung der Anzahl an Biogasanlagen in Deutschland seit 1992. Nach Fachverband Biogas (2018).

Davon sind 196 Biomethan-Anlagen mit einer Produktionsrate von $122.000 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ Biome- than. In diesen Anlagen wird Biogas für die Einspeisung ins Erdgasnetz aufbereitet und zum direkten Ersatz für Erdgas zur Verfügung gestellt. Damit ist Deutschland auch im Bereich Biomethanproduktion führend in Europa (Horschig et al., 2019).

Im Bezug auf die Vermeidung von Treibhausgas-Emissionen stellten im Jahr 2017 Wärme und Strom aus Biomasse neben Windkraft den zweitgrößten Anteil der Erneuerbaren Energien (vgl. Abb. 2) (BMW, 2018).

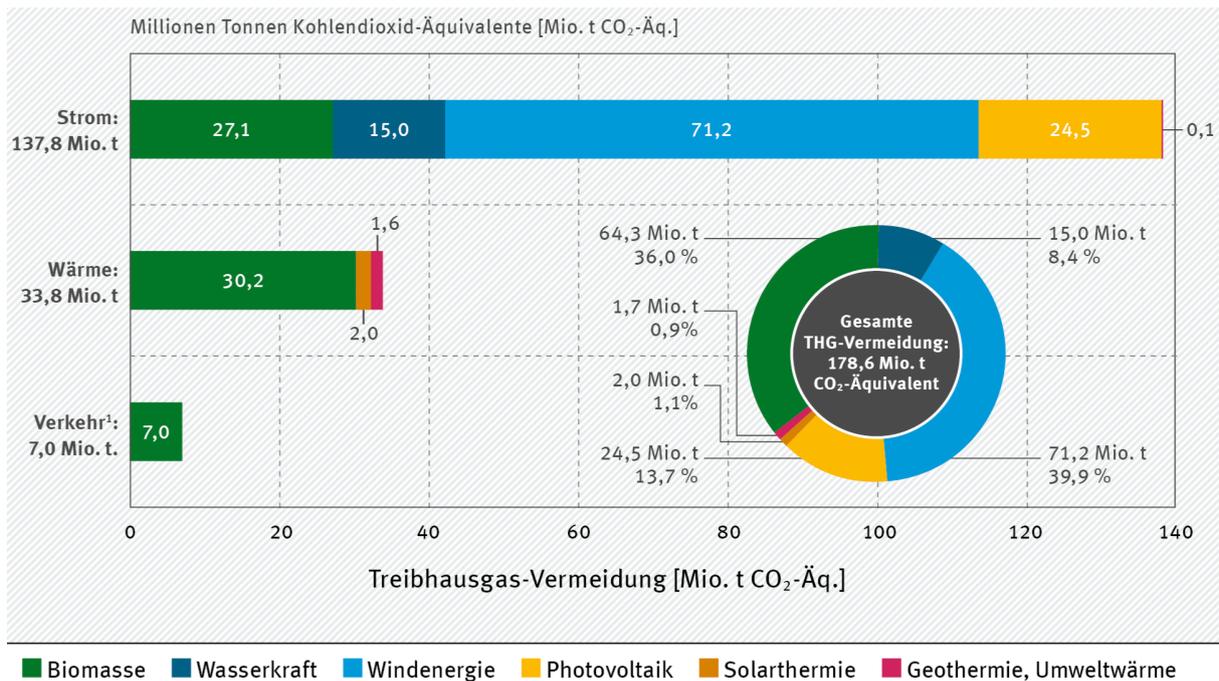


Abbildung 2: Netto-Bilanz der vermiedenen Treibhausgas-Emissionen durch die Nutzung erneuerbarer Energien im Jahr 2017. Nach BMWi (2018).

Wärme und Strom aus Biomasse stellen daher weiterhin eines der Hauptstandbeine für die Einhaltung des Pariser Übereinkommens zur Eindämmung des globalen Klimawandels dar. Die umfassendere Verwendung organischen Abfalls für die Biogasproduktion ist daher unabdingbar für die Zukunft.

Ein weiterer Vorteil ist die simultane Reduktion von Treibhausgasemissionen und Abfallgerüchen, sowie eine kontrollierte Abfallentsorgung (Angelidaki et al., 2011). Gemüse- und tierische Nebenprodukte (z.B. Dung), industrielle und kommerzielle Abfälle, sowie Bioabfälle aus Haushalten und Energiepflanzen eignen sich als Substrat für Biogasanlagen (Wilken et al., 2017). Das entstehende Roh-Biogas besteht zu ca. 50 - 70 Vol.-% aus Methan, abhängig vom verwendeten Ausgangsmaterial. Der Großteil des verbleibenden Gas-Anteils besteht aus CO₂ (30 - 45 Vol.-%), während außerdem geringe Mengen Wasser, Sauerstoff, Schwefelwasserstoff (H₂S), Ammoniak (NH₃) und andere Spurengase enthalten sein können. Zumeist wird das entstandene Gas mit einer Elektrizitätseffizienz von 33 % und einer Wärmeeffizienz von 45 % in Blockheizkraftwerke eingeschleust (Appels et al., 2011). Das enthaltene Wasser und insbesondere der Schwefelwasserstoff können jedoch zu Korrosion und Schäden in der Anlage führen. Daher ist eine Entschwefelung und Trocknung des Rohgases vor der Einschleusung in ein Blockheizkraftwerk nötig.

Für die Entfernung von Schwefelwasserstoff stehen verschiedene Strategien zur Verfügung, die je nach H₂S-Menge ausgewählt werden (Wilken et al., 2017). Anschließend wird das Rohbiogas getrocknet, ebenfalls um Korrosion zu verhindern. Um eine Trocknung zu erreichen, muss dem Biogas Wasserdampf entzogen werden. Dies gelingt in der Regel durch eine

Kühlung des Gases durch Kompressorkälte. Mithilfe eines Kondensatabscheiders wird das kondensierte Wasser gesammelt und abgeleitet. Da Ammoniak gut wasserlöslich ist, kann er in diesem Schritt ebenfalls abgereinigt werden. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Adsorptionstrocknern wie Silicagelen oder Aluminiumoxiden (Wilken et al., 2017). Der nach der Biogasproduktion zurückbleibende Gärrest bzw -schlamm ist zumeist reich an Stickstoff und kann daher als Dünger für die Landwirtschaft eingesetzt werden und ersetzt so synthetische Dünger (Angelidaki et al., 2011; Appels et al., 2011).

1.2.2 Ablauf der Biogasproduktion

Der mikrobiell katalysierte, anaerobe Abbau von Biomasse, wie er in einem Biogasfermenter abläuft, lässt sich in vier Schritte einteilen (vgl. Abb. 3).

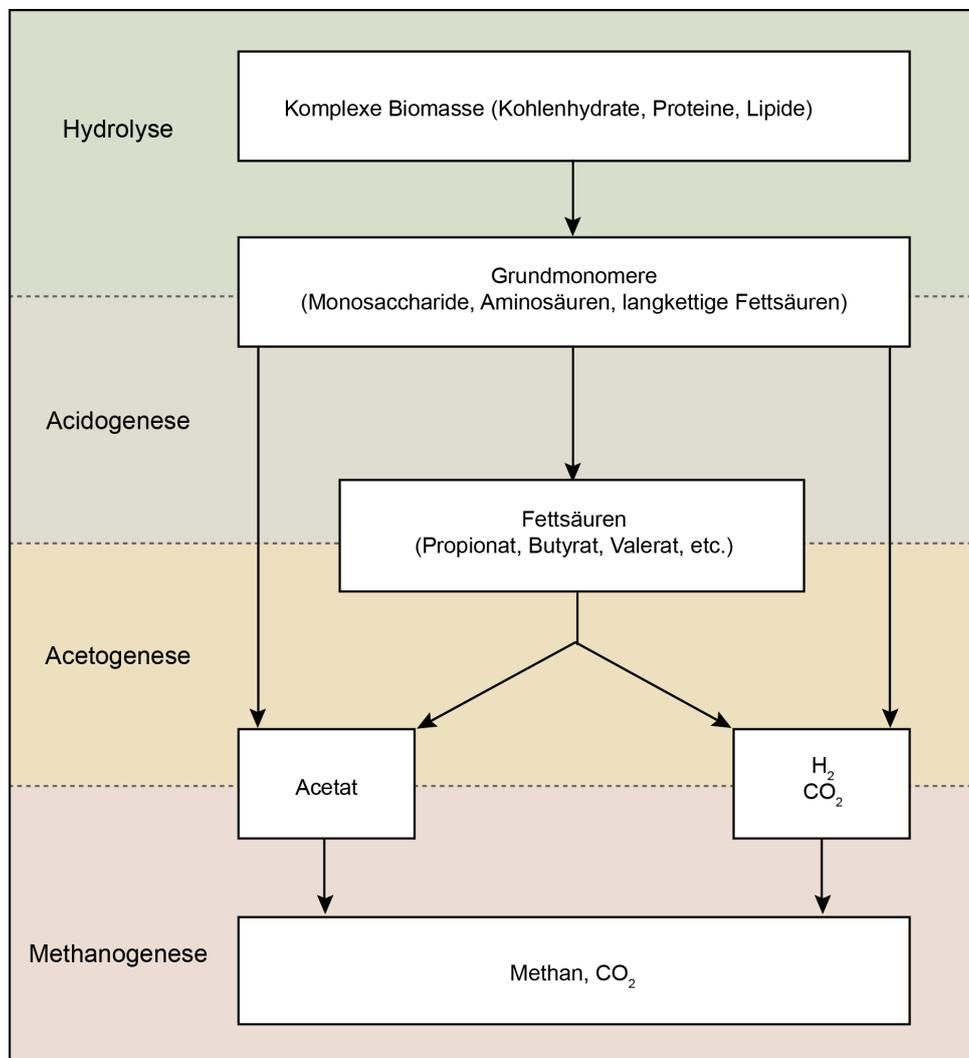


Abbildung 3: Prozess der Biogasentstehung, unterteilt in die vier Schritte Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Nach Ersahin et al. (2011).

Im ersten Schritt, der Hydrolyse, wird komplexe Biomasse, die zumeist aus Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Cellulose und Hemicellulosen besteht, zersetzt (Ramaraj und Dussadee,

2015). Dieser Schritt wird von hydrolytischen Bakteriengruppen wie *Acetivibrio*, *Clostridium* und *Bacteroides* katalysiert (Goswami et al., 2016). Dabei werden Enzyme sekretiert bzw. sogenannte Cellulosomen gebildet, große Multi-Enzymkomplexe auf der Zelloberfläche zum Abbau von Cellulose (Goswami et al., 2016). Hierdurch entstehen kleinere Bausteine wie Aminosäuren, Zucker, Alkohole und Fettsäuren. In der anschließenden Acidogenese setzen Bakteriengattungen wie *Campylobacter* und *Peptococcus* diese Monomere zu Fettsäuren wie Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat, Laktat und Succinat, Wasserstoff und CO₂ um (Ersahin et al., 2011; Goswami et al., 2016). Die organischen Säuren werden im nächsten Schritt, der Acetogenese, von Gattungen wie *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Clostridium* und *Syntrobacter* zu Acetat, CO₂ und Wasserstoff oxidiert. Über diese Gattungen ist bekannt, dass sie diesen Schritt in Syntrophie mit H₂-verstoffwechselnden Organismen durchführen (McInerney et al., 1981). Solche Organismen finden sich im letzten Schritt, der Methanogenese. Hier verwenden methanogene Archaea das entstandene Acetat, Wasserstoff sowie CO₂ zur Produktion von Methan. Es existieren sechs Arten der Methanogenese mit den Hauptsubstraten CO₂, Formiat, Acetat, Methanol, Methylamin und Dimethylsulfat. Diese lassen sich in drei Hauptwege der Methanproduktion kategorisieren:

- Methylo trope Methanogenese (Decarboxylierung von Methylalkoholen, Methylaminen oder Methylsulfiden)
- Hydrogenotrophe Methanogenese (Reduktion von CO₂ mit H₂)
- Acetoklastische Methanogenese (Decarboxylierung von Acetat).

Es wurde gezeigt, dass in einem anaeroben Vergärungsprozess von Maissilage die Ordnung Methanobacteriales die wichtigste Gruppe der methanogenen Organismen darstellt, während an zweiter Stelle die Familie Methanosarcinaceae zu finden war (Bauer et al., 2008). Die Ordnung der Methanobacteriales sind hydrogenotroph, während Methanosarcinaceae als acetoklastische Gruppe mit weitem Substratspektrum bekannt sind. Eine steigende Acetat-Konzentration im Reaktor kann das Vorkommen von Organismen der Familie Methanosarcinaceae begünstigen (Bauer et al., 2008). Der biotechnologische Prozess der Biogasproduktion kann zum Einen unter mesophilen (37-43 °C) und zum Anderen unter thermophilen Bedingungen (50-60 °C) ablaufen (Önen, Nsair und Kuchta, 2018). Schwankungen in den Bedingungen, wie zum Beispiel eine Substratüberlastung, kann zu einer Ansäuerung des Reaktors durch eine Ansammlung von organischen Säuren führen (Akuzawa et al., 2011). Diese Übersäuerung kann zu einer Hemmung der Methanogenese führen. Besitzt der Reaktor wenig Pufferkapazität, sind pH und organische Säuren Anzeichen für Prozessungleichgewichte. Besteht eine hohe Pufferkapazität, ergeben sich durch Ungleichgewichte nur kleine pH-Änderungen und nur die Konzentration an organischen Säuren kann verlässlich für die Prozessüberwachung herangezogen werden (Murto, Björnsson und Mattiasson,

2004). Die Pufferkapazität des Reaktors wird dabei maßgeblich durch die Konzentrationen an Bicarbonat, Fettsäuren und Ammonium bestimmt (Jantsch und Mattiasson, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere eine hohe Propionat-Konzentration zu einer Inhibierung der methanogenen Organismen führen kann (Wang et al., 2009). Zudem wurde beschrieben, dass am verlässlichsten Propionat als Indikator für den gesamten Prozess herangezogen werden kann, da eine erhöhte Propionatkonzentration bereits mehrere Tage vor einem Einbruch der Methanproduktion beobachtet werden konnte (Nielsen, Uellendahl und Ahring, 2007).

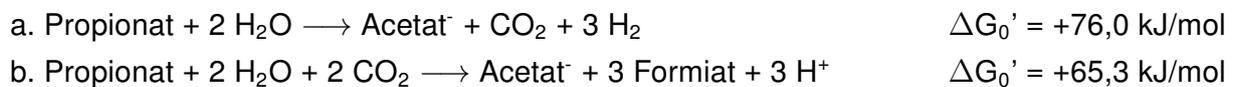
1.2.3 Zweiphasige Fermentation

Eine Zweistufige Fermentation unterteilt sich in die zwei Teilschritte Azidifikation und Methanisierung. Hierbei teilt man die bei der Biogasproduktion auftretenden Schritte entsprechend der Aktivität und Bedürfnisse der dort vorkommenden Mikroorganismen auf. Es werden Hydrolyse und Acidogenese zur Azidifikation und Acetogenese und Methanogenese zur Methanisierung zusammengefasst. Das Ziel ist hierbei, die für die jeweiligen Prozesse bzw. dort vorhandenen Mikroorganismen besten Bedingungen zu erreichen (Ravi et al., 2018). Für die Azidifikation konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert eine wichtige Rolle spielt, da ein leicht saurer pH (5.2 bis 6.5) das Wachstum von säurebildenden Mikroorganismen begünstigt (Demirer und S. Chen, 2004). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei pH 6 mehr organische Säuren produziert wurden als bei pH 5.5 (Ravi et al., 2018). Zudem zeigt die Literatur, dass nicht nur eine pH-Kontrolle, sondern auch die organische Beladungsrate des Reaktors, sprich, die definierte Menge des zugegebenen Substrats, einen großen Einfluss auf die Performance des Prozesses nimmt. Ein Vorteil der Trennung der Teilschritte ist, dass für die spätere Methanogenese eine stabilere Umgebung geschaffen werden kann (Zuo et al., 2013), da der pH auf diese Organismen auch einen großen Einfluss nimmt, wie bereits unter 1.2.2 beschrieben. Hierbei würde ein niedrigerer pH, wie er für die Azidifikation von Vorteil ist, eher zu einer Hemmung der methanogenen Organismen und so zum Erliegen des Prozesses und folglich einer niedrigen Effizienz führen. Wie bereits gezeigt, eignet sich der Zweistufige Prozess auch für die Fermentation von Obst- und Gemüseabfall gut und stellt eine hocheffiziente Technologie zur Verfügung (Bouallagui et al., 2005). Daher wurde auch für diese Arbeit ein Fermentationseffluent aus einem zweistufigen Fermentationsprozess als Substrat eingesetzt.

1.3 Propionsäure

Propionsäure ist eine in der Natur häufig auftretende Fettsäure und kommt als Produkt von Fermentationen vor. Beispielsweise im Verdauungstrakt von Säugern wird sie unter anderem von Bakterien der Ordnungen *Clostridiales* und *Bacteroidales* gebildet (Shimizu

et al., 2018). Es handelt sich dabei um einen C3-Körper, der in der Industrie als Baustein für die Synthese von Kunststoffen, Herbiziden, Arzneimitteln und Duftstoffen genutzt wird (Samel et al., 2011). Das US-Energieministerium stufte Propionsäure im Jahr 2004 als eine der Top 30 aus Biomasse zu gewinnenden Basischemikalien ein (Werpy und Petersen, 2004). Nicht nur in der Biogasproduktion, sondern auch in anderen Systemen wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Propionat sich während anaerober Fermentationsprozesse akkumuliert und der Abbau langsamer vonstatten geht als bei geradzahlig organischen Säuren wie Acetat und Butyrat (H. S. Shin et al., 2001). Dies kann zum Einen darauf zurückgeführt werden, dass der anaerobe Abbau organischer Säuren nur bei einem niedrigen Wasserstoffpartialdruck (≤ 10 Pa) exergon ist (Frigon und Guiot, 1995). Die Gleichungen a. und b. zeigen die anaerobe Propionatoxidation und die freie Gibbs-Energie ($\Delta G_0'$).



Da für beide Reaktionen die Gibbs-Energie positiv ist, ist die Reaktion endergon. Daher kann die Reaktion nur ablaufen, wenn die Produkte stetig aus der Reaktion abgezogen werden. Der Abbau funktioniert deshalb nur in Syntrophie mit Organismen, die Wasserstoff, Acetat und/oder Formiat verbrauchen, wie die innerhalb eines Biogasreaktors vorhandenen methanogenen Archaeae (N. Müller et al., 2010; A. J. M. Stams et al., 1992).

Ist das Gleichgewicht gestört, wie z.B. durch einen pH-Abfall aufgrund vermehrter Säurenproduktion, wird die Methanogenese gehemmt und Propionat akkumuliert weiter, da der Abbau durch steigenden Wasserstoffpartialdruck thermodynamisch ungünstig wird. Dies kann zum kompletten Erliegen des Prozesses führen.

Zusätzlich zu den ungünstigen Abbaubedingungen wirken Propionat oder abgeleitete Intermediate (wie z.B. 2-Methylcitrat) antimikrobiell bzw. toxisch (Dolan et al., 2018). Grundlegend sind in einer prokaryotischen Zelle drei Verwendungsmöglichkeiten für Propionat bekannt:

- 2-Methylcitratzyklus (Enterobakterien, Mycobakterien (Limenitakis et al., 2013))
- Methylmalonyl-CoA-Weg (Mesophile, syntrophe Bakterien (Kosaka et al., 2006))
- Einlagerung in Zellwandlipiden (Dolan et al., 2018).

Im Folgenden werden die beiden für diese Arbeit wichtigen Stoffwechselwege beschrieben.

1.3.1 2-Methylcitratzyklus

Der 2-Methylcitratzyklus wurde unter Anderem bereits in *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* nachgewiesen (Horswill und Escalante-Semerena, 1999; London et al., 1999). Das zugehörige *prp*-Operon kodiert für fünf Enzyme, welche für die Umsetzung von Propionat zu Pyruvat und Succinat verantwortlich sind (siehe Abb. 4).

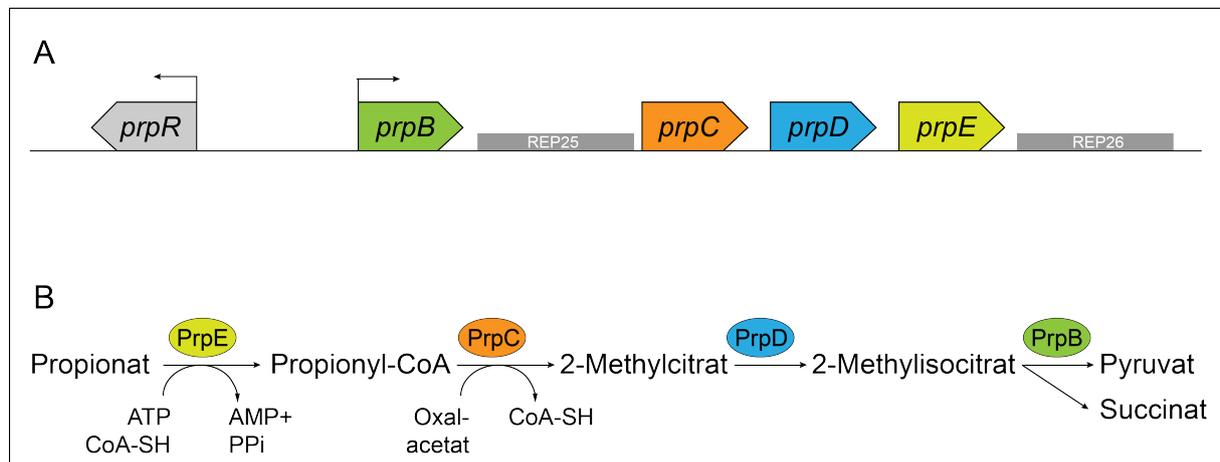


Abbildung 4: A. Aufbau des *prp*-Operons im Genom von *E. coli* K-12 mit den repetitiven, nichtkodierenden, palindromischen Elementen REP25 und REP26. B. Ablauf des 2-Methylcitratzyklus in *E. coli* K-12. Nach Simonte et al. (2017).

Das Operon wird aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten gebildet (Suvorova, Ravcheev und Gelfand, 2012). Die erste Einheit besteht aus dem Gen *prpR*, das für den Transkriptionsregulator PrpR aus der σ^{54} -Familie kodiert und 2-Methylcitrat als Co-Aktivator benötigt (Dolan et al., 2018). Das Cluster aus den Genen *prpB*, *prpC*, *prpD* und *prpE* bildet die zweite Einheit. Diese vier Gene kodieren für die Enzyme, die die Umsetzung von Propionat zu Pyruvat und Succinat katalysieren. Der Aufbau des Operons sowie der Ablauf des Abbaus von Propionat ist Abb. 4 zu entnehmen. Der erste Schritt von Propionat zu Propionyl-CoA wird durch die Propionyl-CoA-Synthetase katalysiert (*prpE*). Für den ersten Teilschritt wird Pyrophosphat von ATP abgespalten und mit der freiwerdenden Energie wird zwischen der Thiolgruppe des Conzym A und der Carboxylgruppe (-COOH) des Propionats eine Thioesterverbindung gebildet. Es konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass auch die Acetyl-CoA Synthetase Propionat zu Propionyl-CoA umsetzen kann. Diese Aktivität scheint einen Einfluss auf den Propionat-Abbau zu nehmen, da für die Aktivierung des Promoters des *prpBCDE* Operons, wie oben bereits genannt, PrpR und 2-Methylcitrat benötigt werden. Da 2-Methylcitrat aus Propionyl-CoA hergestellt wird, muss zunächst Propionat zu Propionyl-CoA umgesetzt werden, um den Promoter aktivieren zu können. Für die Synthese dieses anfänglichen Propionyl-CoA ist daher vermutlich die Acetyl-CoA Synthetase verantwortlich (F. Liu et al., 2014). Das entstandene Propionyl-CoA wird mit Oxalacetat in einer Aldolkondensation zu 2-Methylcitrat umgesetzt. Diese Reaktion wird von der Methylcitrat-Synthase, kodiert von

prpC, durchgeführt. 2-Methylcitrat stellt nicht nur den Co-Aktivator des Operons dar, sondern wirkt nach Akkumulation auch toxisch bzw. inhibierend auf das Zellwachstum (Rocco und Escalante-Semerena, 2010). Durch Isomerisierung durch die Methylcitrat-Dehydratase (*prpD*) wird 2-Methylcitrat zu 2-Methylisocitrat umgesetzt und im Anschluss in Pyruvat und Succinat gespalten. Dieser letzte Schritt erfolgt durch die 2-Methylisocitrat-Lyase, kodiert durch *prpB*. Succinat kann wieder in den Citratzyklus einfließen und das benötigte Oxalacetat wird regeneriert (Textor et al., 1997). Zur transkriptionellen Aktivierung des *prp*-Operons werden nicht nur PrpR und 2-Methylcitrat benötigt, sondern auch der σ^{54} -Faktor RpoN sowie der globale Regulationsfaktor IHF (integration host factor) (Horswill und Escalante-Semerena, 1997; Arimori et al., 2002).

Die genomische Struktur des *prp*-Operons in *E. coli* (vgl. Abb. 4) weist zwei längere nicht-codierende Regionen auf, zum Einen zwischen *prpB* und *prpC* und zum Anderen downstream von *prpE*. Diese Regionen enthalten repetitive palindromische Elemente, REP25 und REP26, die möglicherweise zu der Bildung von Sekundärstrukturen in der mRNA führen können. Es wurde gezeigt, dass das *prp*-Operon zumindest teilweise auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird. Dabei wurde insbesondere der RNase R eine direkte Rolle zugesprochen, für die gezeigt wurde, dass sie unter anaeroben Bedingungen hochreguliert ist. Zudem bietet die Struktur des Operons mit dem REP26-Bereich nach *prpE* einen Angriffspunkt für 3'-5'-Hydrolyse. Das dadurch zuerst betroffene Gen *prpE* kodiert für das Enzym, das den ersten Schritt des Stoffwechsels katalysiert. Daher wird der Abbau direkt am Anfang unterbunden. Da dieser erste Schritt bereits ATP-abhängig ist, macht es Sinn, bereits hier zu unterbrechen, um einen nutzlosen Einsatz von Energie zu vermeiden. Zudem ist eine Anhäufung von CoA-Estern und wie bereits genannt des Intermediats 2-Methylcitrat toxisch für die Zelle (Simonte et al., 2017).

1.3.2 Methylmalonyl-CoA Weg

Der Methylmalonyl-CoA Weg ist unter anderem eine Möglichkeit für die syntrophe Propionat-Oxidation (Kosaka et al., 2006). Dabei wird entstehender Wasserstoff von Methanogenen aus der Reaktion entfernt und so die Propionat-Oxidation erst ermöglicht (Plugge, Dijkema und A. J. Stams, 1993), wie unter 1.3 bereits beschrieben.

Der Ablauf des Methylmalonyl-CoA-Weges ist Abb. 5 zu entnehmen. Hierbei wird Succinat zu Succinyl-CoA umgesetzt, hierfür dient Propionyl-CoA als CoA-Donor. Dieser Schritt wird durch das Enzym YgfH (oder ScpC), einer Propionyl-CoA:Succinat-CoA Transferase katalysiert. Das Succinyl-CoA, das jedoch auch aus dem Citratzyklus stammen kann, wird durch das Enzym Sbm (ScpA), einer Methylmalonyl-CoA Mutase, zu Methylmalonyl-CoA umgesetzt. Dieser Schritt ist Coenzym-B₁₂-abhängig (Aldor et al., 2002). Im Anschluss kann eine Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (YgfG oder ScpB) das entstandene Methylmalonyl-CoA dann zu Propionyl-CoA umsetzen. Die CoA-Gruppe des Propionyl-CoA kann dann

durch YgfH/ScpC wieder auf Succinat übertragen werden, wodurch Propionat entsteht. Über diesen Weg ist auch eine Propionat-Produktion möglich (Haller et al., 2000).

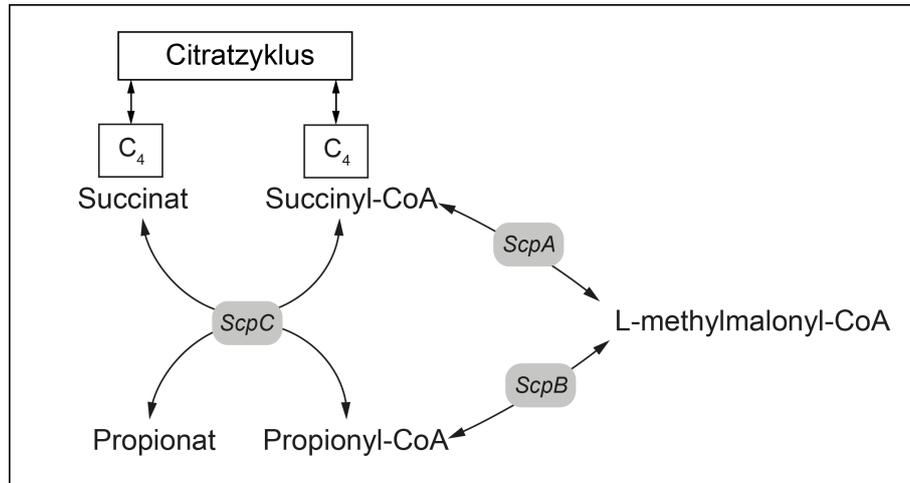


Abbildung 5: Ablauf des Methylmalonyl-CoA-Weges.

1.4 Bioelektrochemisches System

Es gibt viele Publikationen, die bioelektrochemische Systeme mit Abwasser oder Abfall als Substrat beschreiben, teilweise in Kombination mit vorgeschalteten fermentativen Methoden. Es wurde Haushalts- und Industrieabwasser aus der Lebensmittelverarbeitung (Brown et al., 2015; Oh und Logan, 2005), Gemüseabfälle (Du und F. Li, 2016; Venkata Mohan, Mohanakrishna und Sarma, 2010) oder Papier- und Zellstoffabfall genutzt (Krishna, Sarkar und Venkata Mohan, 2014). Es wurden Stromdichten von $2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bis $175 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht (Krishna, Sarkar und Venkata Mohan, 2014; Dhiman et al., 2018). Auch in dieser Arbeit wurde ein Fermentationseffluent aus der Fermentation von Gemüseabfällen als Substrat für ein bioelektrochemisches System verwendet. Im Folgenden wird zunächst das System erklärt. Hierzu ist in Abbildung 6 der Aufbau eines solchen Systems abgebildet.

1.4.1 Aufbau eines bioelektrochemischen Systems

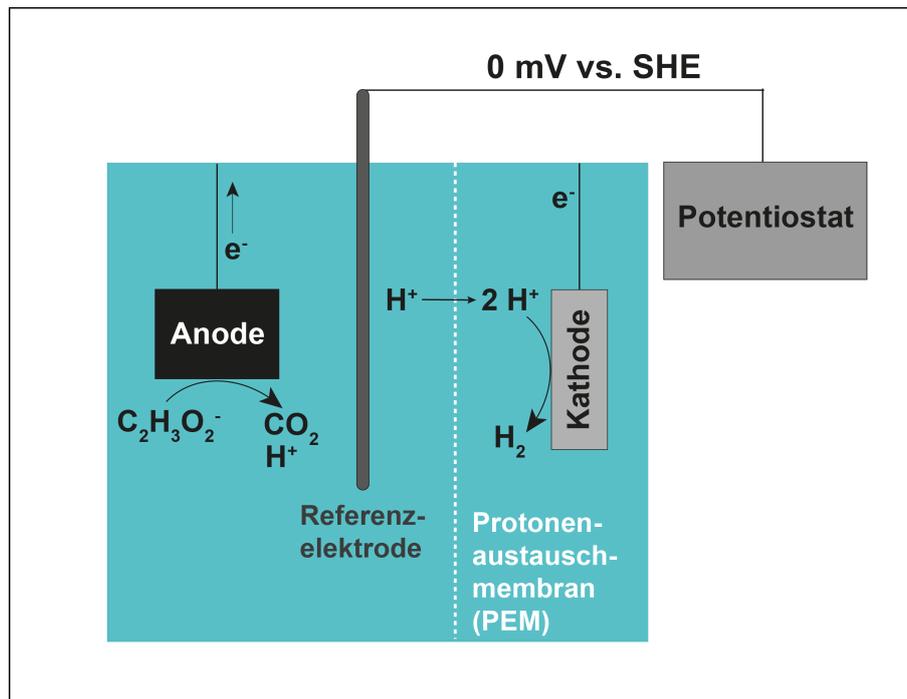


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des bioelektrochemischen Systems, bestehend aus zwei Kammern (Anodenkammer und Kathodenkammer) mit einem Drei-Elektroden-Setup und einer Protonenaustauschmembran. Das angelegte Potential von 0 mV vs. SHE wird über einen Potentiostaten kontrolliert, dieser wird auch zur Stromaufzeichnung genutzt.

Eine normale Brennstoffzelle nutzt Metallkatalysatoren an der Anode, an denen die Oxidation des Substrates stattfindet, um elektrochemisch Strom zu produzieren. Das Besondere an einem mikrobiellen System ist daher, dass die Metallkatalysatoren durch Mikroorganismen ersetzt werden, die als Biokatalysator fungieren und Elektronen auf die Anode übertragen (Logan, 2009). Der Elektronentransfer von den Mikroorganismen zur Anode ist über eine direkte Übertragung, sowie eine indirekte Übertragung durch Shuttles oder Mediatoren möglich (siehe 1.4.2) (Logan et al., 2006). Die übertragenen Elektronen fließen durch einen Stromkreis auf die Kathode, wo sie sich mit Protonen und einem Katholyten wie zum Beispiel Sauerstoff aus Luft verbinden und Wasser bilden (Logan, 2009; Logan et al., 2006). Die Reduktion des Katholyten wird meist durch ein Edelmetall wie Platin katalysiert, kann aber auch an einem Nicht-Edelmetall stattfinden (Cheng, H. Liu und Logan, 2006; Zhao et al., 2005). Die Reaktion im Anodenraum stellt bei Mikroorganismen im chemischen Sinne keine richtige Katalyse-Reaktion dar, da die Mikroorganismen durch die Oxidation des Substrates Energie gewinnen (Logan, 2009). Nahezu jede Quelle organischen Materials kann als Substrat für das System eingesetzt werden, wie bereits oben genannt, auch Abfallströme, da hier zumeist viele organische Substanzen wie zum Beispiel Kohlenhydrate und Proteine enthalten sind (Takeuchi et al., 2017; Yu et al., 2015; Srikanth, Kumar und Puri, 2018; Moqsud et al., 2013). Eine mikrobielle Brennstoffzelle bzw. ein bioelektrochemisches System

besitzt einen definierten Aufbau. In der Regel handelt es sich um ein Zweikammersystem, da für beide Elektroden je ein Kompartiment benötigt wird. Die beiden Kammern werden zumeist von einer Membran getrennt. Wie bereits beschrieben, fließen die Elektronen von Anode zu Kathode, wo der Katholyt reduziert wird. Ist beispielsweise Sauerstoff der Katholyt, der reduziert werden soll, ist es wichtig, dass beide Kompartimente getrennt bleiben, da der Sauerstoff die Elektronenübertragung inhibieren würde, da er als Elektronenakzeptor mit hohem Oxidationspotential (Ucar, Zhang und Angelidaki, 2017) mit der Anode kompetitiert (Ringeisen, Ray und Little, 2007). Daher wird als Trennungsmembran häufig eine Protonen-Austausch-Membran genutzt, sodass Protonen (H^+) vom Anodenraum in den Kathodenraum wandern können, jedoch kein Sauerstoff. Im Anodenraum befindet sich die Anode, auf die Elektronen des Stoffwechsels der Mikroorganismen übertragen werden. Für die Elektroden, insbesondere die Anode, werden meist Materialien verwendet, die biokompatibel, leitfähig sowie (bio)chemisch stabil sind (Mathuriya, Jadhav und Ghangrekar, 2018). Dafür kommen beispielsweise Graphitplatten oder Graphitvlies, verschiedene Kohlenstoffmaterialien, rostfreier Edelstahl oder Titan in Frage (Choudhury et al., 2017). Auch in dieser Arbeit wurde ein Graphitvlies verwendet, da es eine hohe Porosität und größere Oberfläche aufweist als beispielsweise Graphitstäbe (Chaudhuri und Lovley, 2003). Als Kathode wurde ein Platinnetz verwendet, da Platin gute katalytische Eigenschaften zeigt (Daubinger et al., 2014). Um die Elektrodenpotentiale zu kontrollieren, wird neben Anode und Kathode eine Referenzelektrode im System eingesetzt, über die das Potential der Arbeitselektrode (hier Anode) bestimmt werden kann. Die Standard-Wasserstoff-Elektrode (standard hydrogen electrode, SHE) hat ein Potential von 0 mV, wird jedoch aus praktischen Gründen in experimentellen Aufbauten nicht genutzt. Hier werden häufig Silber-/Silberchlorid-Elektroden eingesetzt, da sie einfach und stabil im Umgang und nicht toxisch für die Organismen sind. Zur Kontrolle eines solchen Drei-Elektroden-Setups wird ein sogenannter Potentiostat verwendet, um das Potential einzustellen und den Strom aufzuzeichnen (Logan et al., 2006).

1.4.2 Elektronenübertragung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für Mikroorganismen, Elektronen aus der Zelle herauszutransportieren und auf einen externen Elektronenakzeptor zu übertragen. Exoelektrogene Organismen besitzen bestimmte Proteine in der äußeren Membran (direkter Elektronentransfer), während andere Organismen die Elektronen nur durch ein lösliches Redox-Shuttle oder einen Primärmetaboliten an die externe Anode abgeben können (vermittelter Elektronentransfer) (Schröder, 2007). Modellorganismen der dissimilatorischen Eisenreduktion, also der Reduktion von Eisen als terminalen Elektronenakzeptor für katabole Reaktionen der Zelle, wie beispielsweise *Geobacter* spp. und *Shewanella* spp. (Dolch, Wuske und Gescher, 2015) haben ein Set an Proteinen zur Verfügung, mit denen sie die Elektronen bis zur Zelloberfläche transportieren können. Sie lagern sich daher in der Regel als Biofilm auf dem

Elektronenakzeptor (wie z.B. einer Anode) an und geben die Elektronen direkt an ihn ab. In Abb. 7 sind die möglichen Wege der Elektronenübertragung aufgezeigt.

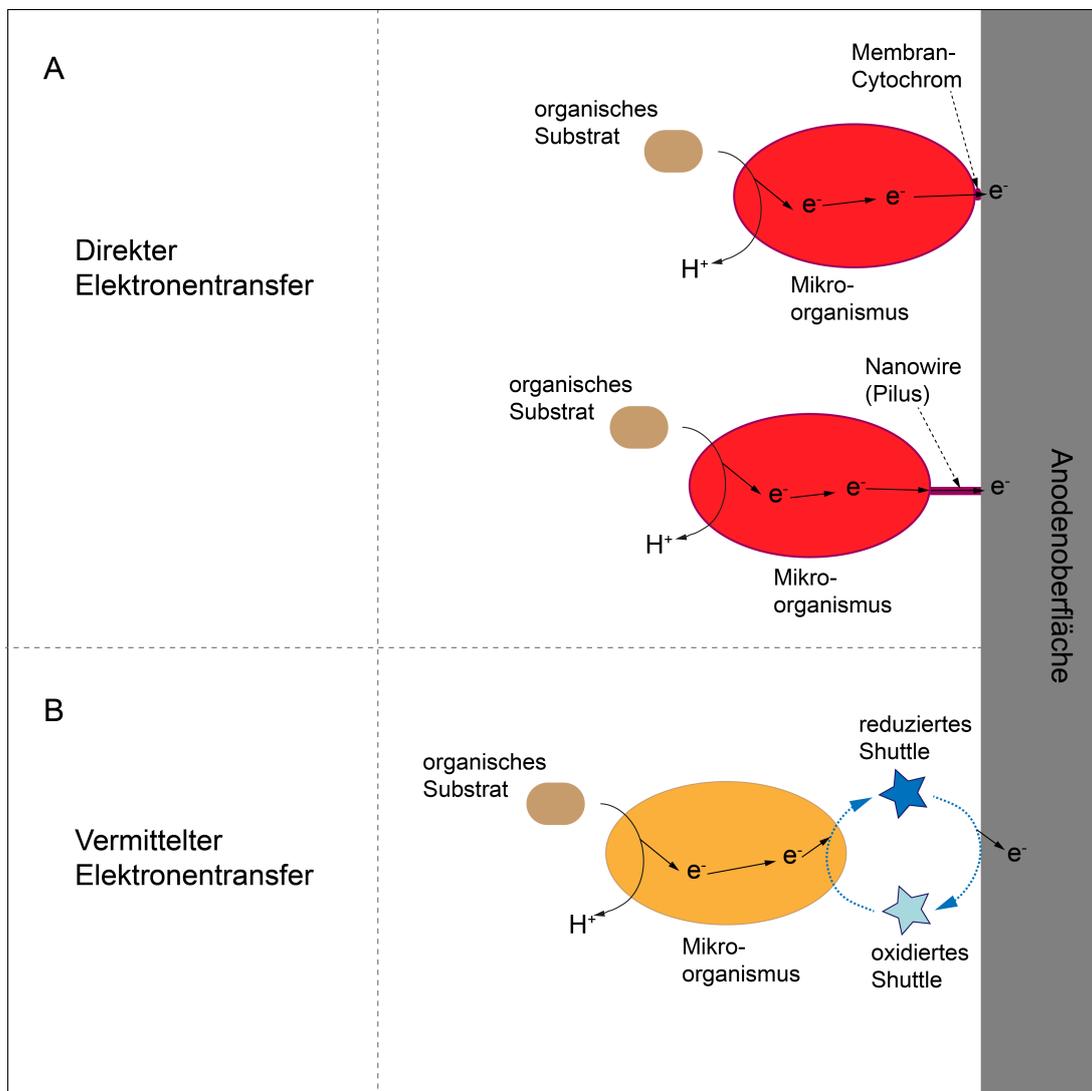


Abbildung 7: Mechanismen der Elektronenübertragung auf einen externen Elektronenakzeptor bei Mikroorganismen. **A.** Es ist ein direkter Transfer über äußere Membrancytochrome oder über sogenannte Nanowires möglich. **B.** Ein vermittelter Elektronentransfer inkludiert ein Shuttle, das Elektronen in der Zelle aufnimmt und zum Elektronenakzeptor, wie zum Beispiel der Anode, transportiert. Nach Sayed und Abdelkareem (2017).

Durch die Expression von äußeren Membranproteinen sind Mikroorganismen in der Lage, einen direkten Kontakt zur Anode herzustellen. Solche Membranproteine sind sogenannte Cytochrome, die als prosthetische Gruppe *c*-Hämgruppen enthalten. *C*-Häme bestehen aus dem organischen Pigment Protoporphyrin IX, das mit einem Eisen-Ion gekoppelt ist. Multi-Häm-Cytochrome enthalten zwei oder mehr *c*-Hämgruppen und ermöglichen einen schnellen Elektronentransfer durch Protein-interne Transferschritte, die das Eisen-Redoxpaar involvieren. In *S. oneidensis* durchspannt der MtrABC-Komplex die äußere Membran. Dabei

bildet das β -Fass-Protein MtrB eine Pore, durch die die beiden Cytochrome MtrA und MtrC interagieren und Elektronen transportieren können. Über das Decahäm-Cytochrom MtrC werden die Elektronen auf den terminalen Elektronenakzeptor übertragen, wie zum Beispiel auf unlösliche Metalloxide von Eisen(III) oder Mangan(III/IV) (Breuer et al., 2015). Dabei werden die Elektronen über den Quinon-Pool in der Periplasma-Membran auf im Periplasma befindliche Cytochrome verteilt, die die Elektronen an MtrA weiterleiten und so die Verbindung nach außen herstellen (Barchinger et al., 2016).

Eine weitere Möglichkeit des direkten Elektronentransfers ist die Übertragung über sogenannte Nanowires. Diese Strukturen werden als Ausstülpungen der äußeren Membran gebildet und enthalten die Cytochrome MtrC und OmcA. Sie entstehen vermutlich durch das Zusammenschmelzen von einzelnen Membranvesikeln (Pirbadian et al., 2014). Nanowires führen zu einer vergrößerten Zelloberfläche, die für den Elektronentransfer bereit ist, sobald ein möglicher Elektronenakzeptor in Berührungsnähe kommt (Barchinger et al., 2016). Zudem scheinen diese Strukturen auch in Biofilmen von exoelektrogenen Bakterien eine Rolle zu spielen, da sie im Biofilm dazu führen, dass auch weiter entfernte Zellen von der Anode noch in der Lage sind, ihre Elektronen über Nanowires abzugeben. Eine Deletionsmutante von *G. sulfurreducens*, die keine Pili bzw. Nanowires mehr ausbilden kann, bildete auf einer Anode einen dünneren Biofilm und erreichte auch eine niedrigere maximale Stromdichte (Strycharz-Glaven et al., 2011).

Die zweite Möglichkeit des Elektronentransfers ist der vermittelte Transfer. Hierzu wird zusätzlich ein Shuttle benötigt, das Elektronen vom Mikroorganismus aufnimmt und an der Anode wieder abgeben kann. Dabei handelt es sich um Redoxmoleküle. Zum Beispiel sind endogene Elektronen-Shuttles wie Wasserstoff oder Formiat wichtig für Interspezies-Elektronentransfer, wie zum Beispiel bereits für Syntrophien von Mikroorganismen beschrieben (Hattori et al., 2001; Rotaru, Shrestha, F. Liu, Ueki, et al., 2012). Für *Shewanella*-Spezies ist bekannt, dass sie selbst Flavine produzieren, um sie als endogene Elektronenshuttles zu nutzen, insbesondere wenn kein direkter Kontakt zum Elektronakzeptor möglich ist (Von Canstein et al., 2008). Auch Organismen in der Umgebung können von diesen Shuttles profitieren. Weitere Shuttles können Enzyme, Quinone oder Schwefelverbindungen sein. Quinone kommen beispielsweise in Huminstoffen in der Umwelt vor (B. Huang et al., 2018). Roller et al. (2008) testeten verschiedene Redox-Mediatoren wie Thionin, Methylenblau und Benzyl-Viologen mit verschiedenen Organismen und konnten zeigen, dass *E. coli* am schnellsten Methylenblau reduziert. Dies wurde in anderen Studien genutzt, um Elektronen aus dem Stoffwechsel von *E. coli* zu einer Anode zu übertragen (Sturm-Richter et al., 2015; Förster et al., 2017). Es gibt also auch die Möglichkeit, exogene Mediatoren einzusetzen, um den Elektronentransfer zu ermöglichen oder auch zu verbessern.

1.5 Produktion von Plattformchemikalien

Plattformchemikalien sind der grundlegende Ausgangsstoff für die Herstellung von chemischen Intermediaten, Basischemikalien und Polymeren (J. H. Shin et al., 2012). Viele kommerzielle Plattformchemikalien werden noch immer mithilfe petrochemischer Prozesse aus Erdöl als Ausgangsmaterial hergestellt. Aufgrund der Limitierung fossiler Ressourcen und steigenden Preisen gewann die biobasierte Herstellung von Plattformchemikalien deutlich an Interesse (Lee, H. U. Kim, et al., 2011; Lee, T. Y. Kim, et al., 2011). Hierfür werden erneuerbare Ressourcen genutzt, wie zum Beispiel Agrarprodukte, Lignocellulose oder marine Biomasse (Hatti-Kaul et al., 2007). Eine große Herausforderung bleibt die Entwicklung von effizienten Mikroorganismen, die in der Lage sind, das gewünschte Produkt in möglichst großen Mengen zu produzieren (J. H. Shin et al., 2012). Beispiele für Plattformchemikalien sind Carboxylsäuren, Hydroxysäuren, Aminocarboxysäuren, Alkohole, Amine und Aromaten. Darunter befinden sich auch einwertige und zweiwertige Alkohole wie Ethanol, Propanol oder auch Butandiol (J. H. Shin et al., 2012). Auch in dieser Arbeit sollten Plattformchemikalien hergestellt werden. Aufgrund des Ausgangsstoffes Propionat wurde zum einen Acetoin, ein Vorläufer von 2,3-Butandiol, und zum anderen 1-Propanol gewählt. Beide Stoffe befinden sich, wie auch Propionat, unter den Top 30 Chemikalien, die aus Biomasse produziert werden können (Werpy und Petersen, 2004). 1-Propanol wurde als potentieller Biokraftstoff vorgeschlagen und ist unter anderem ein Vorläufer für Polypropylen, ein thermoplastisches Polymer (Jain et al., 2015; Matsubara et al., 2016). Acetoin wurde bisher in einer Vielzahl an Industriezweigen wie zum Beispiel Kosmetik, Kraftstoffe, Pharmazeutika und Lebensmittelproduktion eingesetzt (Xu et al., 2017). Zudem stellt es den direkten Vorläufer für die 2,3-Butandiol-Synthese dar (T. Chen et al., 2013). In Abb. 8 sind die stoffwechselbezogenen Zusammenhänge für die Produktion der beiden genannten Chemikalien abgebildet. Es werden zwei verschiedene, teilweise synthetische Produktionswege benötigt, um 1-Propanol und Acetoin herzustellen. Beide sollen aus Propionat als Ausgangsstoff hergestellt werden. Für die Produktion von 1-Propanol wird neben Propionat zusätzlich ein Co-Substrat benötigt, um ATP für die Umsetzung von Propionat zu Propionyl-CoA bereitzustellen. Dieses Co-Substrat fließt in die Glykolyse und den Citratzyklus ein, während ATP und Coenzym A zur Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA eingesetzt werden. Im Anschluss kann eine Alkohol-Dehydrogenase Propionyl-CoA über Propionaldehyd zu 1-Propanol umsetzen, wofür Reduktionsäquivalente (NADH/H^+) benötigt werden. Als Co-Substrat sollte ein Stoff gewählt werden, der in seiner Gewinnung günstig und möglichst ebenfalls auf Biomasse-Basis hergestellt wurde. Es bietet sich daher Glycerin an, das als Nebenprodukt bei der Biodiesel-Herstellung anfällt (Milazzo et al., 2013). Es gibt diverse Studien, die Glycerin als Ausgangsstoff für die Produktion von verschiedenen Metaboliten nutzen (Blankschien, Clomburg und Gonzalez, 2010; Zhong et al., 2014; J. Chen et al., 2010).

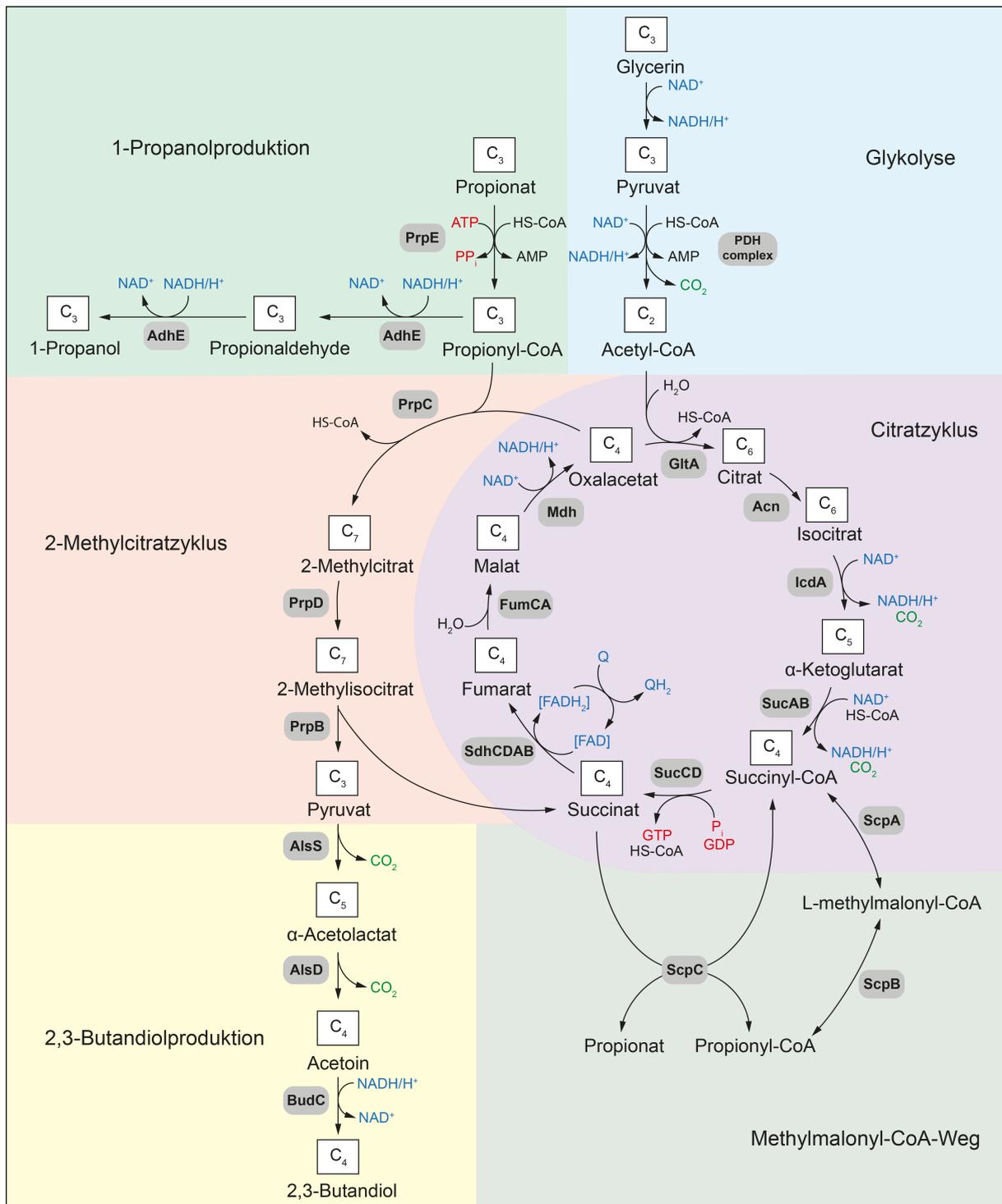


Abbildung 8: Zusammenfassung der für die Produktion der Plattformchemikalien Acetoin bzw. 2,3-Butandiol (gelb) und 1-Propanol (grün) relevanten Stoffwechselwege. Diese stehen in Zusammenhang mit Glykolyse (blau), Citratzyklus (lila), 2-Methylcitratzyklus (orange) und Methylmalonyl-CoA-Weg (braun).

Die Produktion von Acetoin funktioniert über die Umsetzung von Propionat über den 2-Methylcitratzyklus und greift erst am Ende des Zyklus an einem der beiden Endprodukte, Pyruvat, an, daher ist hier keine Zugabe eines Co-Substrates nötig. Die Umsetzung erfolgt über die zwei Enzyme Acetolaktat-Synthase (AlsS) und Acetolaktat-Decarboxylase (AlsD).

Das erst genannte Enzym katalysiert hierbei die Reaktion von Pyruvat zu 2-Acetylactat, während die Decarboxylierung zu Acetylactat von AlsD durchgeführt wird (T. Chen et al., 2013). Die Umsetzung von Propionat zu Pyruvat erfolgt hierfür über den 2-Methylcitratzyklus (vgl. 1.3.1). Eine Umsetzung von Acetylactat zu 2,3-Butandiol ist durch das Enzym Acetylactat-Reduktase (BudC) möglich (T. H. Yang et al., 2014), welches in dieser Arbeit jedoch nicht eingesetzt wurde.

1.6 Ziele der Arbeit

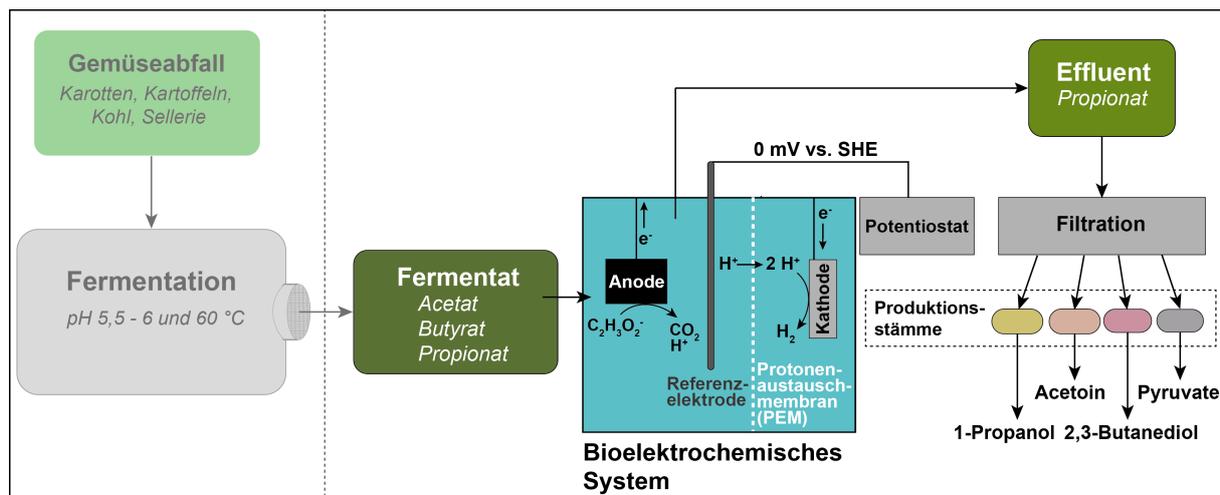


Abbildung 9: Graphische Zusammenfassung des Projekts. Die Schritte, die nicht in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind abgetrennt und ausgeblendet.

Diese Arbeit befasst sich mit der Verwendung eines Effluenten einer zweiphasigen Fermentation von Gemüseabfällen als Substrat für ein bioelektrochemisches System. Es wurde ein Effluent der Azidifikation genutzt, der von einem Kooperationspartner aus Gemüseabfällen hergestellt wurde. In Abb. 9 sind die Schritte der Fermentation daher transparent dargestellt. Im bioelektrochemischen System sollen die enthaltenen organische Säuren, durch das Mikrobiom oxidiert werden und anfallende Elektronen auf die Anode des Systems übertragen werden, um einen messbaren Strom zu erzeugen. Dieser Prozess soll durch das Überwachen der Konzentrationen an organischen Säuren sowie des gesamten organischen Kohlenstoffs überprüft werden. Die Erzeugung des Stroms soll über einen angeschlossenen Potentiostaten über den Zeitverlauf des Prozesses verfolgt werden. Anhand der Veränderung der Konzentrationen der gelösten Stoffe sollen Aussagen über Stoffwechselprozesse im System getroffen werden können. Durch die Isolation von genomischer DNA sowie RNA aus dem Biofilm auf der Anode sollen durch Sequenziermethoden Aussagen über das Mikrobiom getroffen und mit den Daten zu den Stoffwechselprozessen korreliert werden. Im Anschluss an das bioelektrochemische System sollen im Fermentat verbleibende Stoffe für die Produktion von Plattformchemikalien genutzt werden. Hierfür werden zunächst Filtrationsmethoden implementiert, um den Effluenten des Systems von Schwebstoffen und Mikroorganismen

zu befreien. Da gezeigt werden konnte, dass Propionat im System zurückbleibt, während andere organische Säuren bereits oxidiert sind, soll dieses für die Herstellung der Plattformchemikalien 1-Propanol und Acetoin als Ausgangsstoff verwendet werden. Insgesamt soll durch die Implementierung dieser Arbeit eine Produktionskette entwickelt werden, mit der eine Verwertung und Veredelung von Gemüseabfällen unter Generierung von Strom erreicht werden kann.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien sowie Biochemikalien wurden von Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) und Promega (Mannheim) bezogen. Enzyme wurden bei New England Biolabs (Frankfurt am Main) erworben.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

In Tab. 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie Plasmide für die biochemischen Transformationen aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.

Bakterienstämme	Quelle
<i>Stämme für das Bioelektrochemische System</i>	
<i>Geobacter sulfurreducens</i> barcode	Dolch, Wuske und Gescher (2015)
<i>Shewanella oneidensis</i> barcode	Dolch, Wuske und Gescher (2015)
<i>Escherichia coli</i>	Brunner et al. (2019)
<i>Enterococcus faecium</i>	unveröffentlicht
<i>Shewanella putrefaciens</i>	unveröffentlicht
<i>Stämme für die biochemischen Transformationen</i>	
<i>Escherichia coli</i> K12 Δrnr	Baba et al. (2006)
<i>Escherichia coli</i> K12 $\Delta rnr \Delta prpC$	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> K12 $\Delta rnr \Delta scpC$	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> K12 $\Delta rnr \Delta prpC \Delta scpC$	diese Arbeit
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC® 13032™	
<i>Shewanella oneidensis</i> $\Delta \lambda \Delta ack \Delta pta$	Bursac, Gralnick und Gescher (2017)
<i>Plasmide für die biochemischen Transformationen</i>	
pMAL- <i>alsS-alsD</i>	Förster et al. (2017)
pBAD- <i>prpE-adhE</i>	diese Arbeit
pBAD- <i>prpE^{mut}-adhE</i>	diese Arbeit
pBAD- <i>prpE-adhE^{mut}</i>	diese Arbeit
pBAD- <i>prpE^{mut}-adhE^{mut}</i>	diese Arbeit
pBAD- <i>atoDA-adhE^{mut}</i>	diese Arbeit
pBAD- <i>acs-adhE^{mut}</i>	diese Arbeit

2.3 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mithilfe eines Sterilfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilisiert.

In Tab. 2 ist die Zusammensetzung des LB-Mediums dargestellt, das für alle Übernachtskulturen verwendet wurde.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysogeny Broth-Mediums (LB, Lennox). Durch Zugabe von 2 % Agar wurde LB-Agar hergestellt.

Substanz	Menge
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

pH Wert $7,0 \pm 0,2$.

In Tab. 3 findet sich die Zusammensetzung des SOB-Mediums, das zum Anziehen der Zellen für die Elektroporation eingesetzt wurde.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Super Optimal Broth (SOB)-Mediums.

Substanz	Menge
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,58 g/l
KCl	0,19 g/l

Tab. 4 gibt die Zusammensetzung des SOC-Mediums wieder, das zum Aufnehmen der Zellen nach der Elektroporation eingesetzt wurde.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)-Mediums.

Substanz	Menge
SOB-Medium	47,2 ml
MgCl ₂ -Lösung (1M)	1 ml
Glucoselösung (19%)	1 ml

Alle Lösungen steril verwenden.

In Tab. 5 findet sich die Zusammensetzung des *Geobacter*-Mediums, das zur Kultivierung von *Geobacter sulfurreducens* sowie für die Isolationsstudie eingesetzt wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung des *Geobacter*-Mediums.

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	0,42 g/l
K ₂ HPO ₄	0,22 g/l
NH ₄ Cl	0,2 g/l
KCl	0,38 g/l
NaCl	0,36 g/l
NaHCO ₃	1,8 g/l
Na ₂ CO ₃	0,5 g/l
Dinatrium-Fumarat	6,4 g/l
Natrium-Acetat	0,82 g/l
NB-Spurenelemente	10 ml/l
Selenit-Wolframat	1 ml/l
Auf 1 l auffüllen, anaerobisieren und autoklavieren. Danach sterile Zugabe von:	
Vitaminlösung	10 ml/l
10 % Hefeextrakt	10 ml/l
Cystein (0,5 M)	2 ml/l
Natrium-Ascorbat (200 mM)	1 ml/l
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (0,4 M)	1 ml/l
MgCl ₂ ·6 H ₂ O (1 M)	1 ml/l
2 % Casiton	10 ml/l
pH-Wert auf 7 einstellen.	

Tab. 6 gibt die Zusammensetzung des R2A-Mediums wieder, das für die Isolationsstudie eingesetzt wurde. Bei Bedarf wurden 15 g/l Agar zugefügt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des R2A-Mediums.

Substanz	Menge
Hefeextrakt	0,5 g/l
Pepton	0,5
Caseinhydrolysat	0,5
Glucose	0,5g/l
Stärke (löslich)	0,5 g/l
Pyruvat	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,05 g/l

pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Tab. 7 gibt die Zusammensetzung des DM630-Mediums wieder. Bei Bedarf wurden 15 g/l Agar zugefügt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des DM630-Mediums.

Substanz	Menge
Peptongemisch	23 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Stärke (löslich)	3 g/l
Glucose	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄	1 g/l
NaCl	0,2 g/l
Cystein-HCl	0,06 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l

pH-Wert auf 7,2 einstellen.

In Tab. 8 ist die Zusammensetzung des M9-Mediums zu finden, das für die Biotransformationen eingesetzt wurde.

Tabelle 8: Zusammensetzung des M9 Mediums.

Substanz	Menge
Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
NaCl	0,5 g/l
Spurenelemente	10 ml/l
Vitamine	10 ml/l

pH Wert auf 7,0 einstellen.

Tab. 9 zeigt die Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung, die zur Komplementierung anderer Medien benötigt wurde.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung.

Substanz	Menge
NaOH	0,5 g/l
Na ₂ SeO ₃ (17 µM)	0,003 g/l
Na ₂ WO ₄ ·2 H ₂ O (12 µM)	0,004 g/l

Tab. 10 zeigt die Zusammensetzung der Spurenelementlösung, die zur Komplementierung anderer Medien genutzt wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100x).

Substanz	Menge
CoCl ₂	64,5 mg/l
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5 mg/l
Fe(II)Cl ₂ ·4 H ₂ O	107,4 mg/l
H ₃ BO ₃	350 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	22 mg/l
Na ₂ EDTA	2,5 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	94,4 mg/l
Na ₂ SeO ₄ ·6 H ₂ O	39,5 mg/l
NaCl	58,4 mg/l
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	118,9 mg/l
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	28,8 mg/l

Tab. 11 zeigt die Zusammensetzung der NB-Spurenelementlösung, die dem *Geobacter*-Medium zugesetzt wurde.

Tabelle 11: Zusammensetzung der NB-Spurenelementlösung (100x).

Substanz	Menge
Nitritotriessigsäure	2,14 g/l
pH Wert mit KOH auf 6,5 einstellen. Dann Zugabe von:	
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,1 g/l
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,3 g/l
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,17 g/l
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g/l
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,3 g/l
AlK(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O	0,005 g/l
H ₃ BO ₃	0,005 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,11 g/l
NiSO ₄ ·6 H ₂ O	0,11 g/l
Na ₂ WO ₄ ·2 H ₂ O	0,2 g/l

Tab. 12 zeigt die Zusammensetzung der Vitaminlösung, die für die Komplementierung anderer Medien eingesetzt wurde.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Vitaminlösung (100x).

Substanz	Menge
Biotin	2 mg/l
Folsäure	2 mg/l
Pyridoxin-HCl	10 mg/l
Thiamin-HCl	5 mg/l
Riboflavin	5 mg/l
Nicotinsäure	5 mg/l
DL-Ca-Pantothenat	5 mg/l
Vitamin B ₁₂	0,1 mg/l
P-Aminobenzoesäure	5 mg/l
Liponsäure	5 mg/l

2.4 Substrat für das Bioelektrochemische System

Für Experimente mit dem bioelektrochemischen System wurde ein Gemüsehydrolysat als Substrat eingesetzt. Dieses wurde von einem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt. Es wurde aus einer sauren Hydrolyse von Kartoffeln, Kohl, Sellerie, Karotten und Karottenmousse gewonnen und wies einen pH von 5,5 bis 6 auf (Ravi et al., 2018). Aus dem Reaktor wurde es durch einen 100 µm Filter entnommen, um grobe Partikel zurückzuhalten. Die relevanten organischen Hauptkomponenten des Hydrolysats waren Essigsäure (47,35 - 114,41 mM), Propionsäure (8,38 - 20,20 mM) sowie Buttersäure (9,14 - 25,93 mM).

Vor Verwendung für das bioelektrochemische System wurde der pH des Hydrolysats mithilfe von Natriumhydroxidlösung auf 7 eingestellt. Anschließend wurde das Hydrolysat mit Stickstoff begast, um eine anoxische Atmosphäre zu generieren und in einer Anaerobkammer in die bioelektrochemischen Reaktoren eingefüllt. Nach Start des Experimentes wurde eine Begasung mit Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch angeschlossen und die Reaktoren über die gesamte Experimentlaufzeit begast, um die anoxische Atmosphäre beizubehalten. Die Probenahme an den Reaktoren erfolgte alle zwei bis drei Tage. Während des Experiments wurde der pH gemessen, jedoch nicht mehr eingestellt. Nach Ende des Experimentlaufes wurden die Reaktoren vom Potentiostaten abgenommen und in der Anaerobkammer entleert. Frisches Substrat, das wie oben beschrieben vorbereitet wurde, wurde anschließend eingefüllt und die Reaktoren verschlossen, bevor sie aus der Anaerobkammer entnommen und wieder an den Potentiostaten angeschlossen wurden.

3 Methoden

3.1 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Falls nicht anders angegeben, wurden die Bakterienstämme in LB-Medium (Lennox) kultiviert (siehe Tabelle 2). Aus Kryokulturen wurden Bakterienstämme zunächst auf LB-Agarplatten (gegebenenfalls mit zugesetztem Antibiotikum) ausgestrichen, um sie für Flüssigkulturen weiterverwenden zu können. Für die Kultivierung wurde entsprechend Zellmaterial von der Agarplatte in 5 ml flüssigem LB-Medium resuspendiert. Bei Bedarf, beispielsweise wenn die Kultur zur Plasmidextraktion verwendet werden sollte, wurde auch hier ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt, um den Selektionsdruck zu erhalten. Die Flüssigkultur wurde in der Regel über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 180 rpm inkubiert, die Agarplatten im Inkubator, ebenfalls bei 37 °C.

3.1.2 Konservierung von Bakterienstämmen

Alle verwendeten und hergestellten Bakterienstämme wurden als Gefrier- oder Kryokulturen konserviert. Hierfür wurde der entsprechende Stamm in LB-Medium über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit 10 % sterilen Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen verschlossen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Gelagert wurden die Kryokulturen bei -80°C . Zur Wiederverwendung dieser Kryokulturen wurde steril gefrorenes Zellmaterial aus dem Röhrchen entnommen und auf eine Agarplatte ausgestrichen, die dann bei 37°C inkubiert wurden.

3.1.3 DNA-Gewinnung und -aufreinigung

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur wurde das Kit „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System“ von Promega verwendet. Die Aufreinigung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem Kit „Wizard SV Gel and PCR Clean-up System“ des gleichen Herstellers. Die Konzentration von DNA wurde mithilfe eines Nanodrop-Spektrometers (Thermo Scientific, Nano Drop 2000 Spectrophotometer) durchgeführt. Hierbei wurden $1,5\ \mu\text{l}$ Probe eingesetzt, nachdem mit gleichem Volumen an deionisiertem Wasser der Leerwert gemessen wurde. Über die Messung der Absorption bei 230, 260 und 280 nm können Aussagen über die DNA bzw. Verunreinigungen getroffen werden. RNA und einzel- oder doppelsträngige DNA absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm, während Verunreinigungen wie Proteine und Phenole bei 280 nm und EDTA oder Kohlenhydrate bei 230 nm absorbieren. Über das Verhältnis der Absorptionen 260/280 nm und 260/230 nm wird die Reinheit der Probe bestimmt: Reine DNA zeigt einen A_{260}/A_{280} -Quotienten von etwa 1,8 und einen A_{260}/A_{230} -Quotienten von 2,0 - 2,2.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR können DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Dazu wird die gewünschte DNA mit kurzen Oligonukleotiden, die am Anfang und am Ende der DNA-Sequenz komplementär binden, versehen. Diese kurzen Oligonukleotide, die sogenannten Primer, bilden den Startpunkt für die Reaktion. Als erstes wird die DNA denaturiert, das heißt in ihre Einzelstränge gespalten. Im nächsten Schritt wird die Schmelztemperatur der Primer angelegt, sodass diese an die DNA-Sequenz binden können. Im Anschluss erfolgt das Auffüllen des Stranges durch eine DNA-Polymerase mit zugefügten Desoxyribonukleotiden. Es handelt sich dabei um eine Kettenreaktion, da auch die neu gebildeten Sequenzen im nächsten Zyklus als Vorlage verwendet werden. Präparative PCR-Reaktionen, deren Produkte für weitere Klonierungen verwendet werden sollten, wurden mit dem Enzym PCR BIO HiFi-Polymerase (PCRBiosystems, London) durchgeführt, da dieses Enzym eine 3'-5'-Proofreading-Aktivität besitzt und daher weniger fehleranfällig ist wie beispielsweise die Taq-Polymerase. Diese

wurde daher nur für analytische Zwecke eingesetzt (Kontrolle von Fragmenten oder Plasmiden). Der Ansatz für eine präparative sowie eine analytische PCR, das Temperaturprotokoll sowie die verwendeten Primer sind in Tab. 13 - 15 angegeben.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines präparativen sowie eines analytischen Ansatzes für eine PCR. Der analytische Ansatz wurde für Kolonie-PCRs genutzt, daher wurde hier keine DNA-Lösung, sondern Zellmaterial des zu testenden Stammes zugegeben.

Substanz	Menge
Präparativer Ansatz (50 µl)	
5x PCRBIO HiFi Puffer	10 µl
Forward Primer (2 µM)	10 µl
Reverse Primer (2 µM)	10 µl
Template DNA	<100 ng cDNA oder <500 ng gDNA
PCRBIO HiFi Polymerase (2 u/ µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	Auffüllen auf 50 µl
Analytischer Ansatz (15 µl)	
MangoMix™ (Bioline)	7,5 µl
Forward Primer (2 µM)	3,75 µl
Reverse Primer (2 µM)	3,75 µl

Tabelle 14: Temperaturprotokoll einer PCR. Schritte 2 bis 4 wurden im Thermocycler 30 mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95 °C	2:30 min	Initiale Denaturierung der DNA
2	95 °C	0:30 min	Denaturierung der DNA
3	55 - 75 °C	0:30 min	Anlagern der Primer (Temperatur abhängig von der Sequenz)
4	72 °C	1 kb/min	Synthese der DNA-Stränge
5	72 °C	10:00 min	Finale Elongation der DNA-Stränge
6	12 °C	∞	Abkühlen der Reaktion

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')
1	pMAL_for	CAGTCCGTTTAGGTGTTTTTC
2	pMAL_rev	GACGTTGTAAAACGACGGC
3	pBAD_test_for	GATTAGCGGATCCTACCTGAC
4	pBAD_test_rev	CTCTCATCCGCCAAAACAGC
5	prpB_U1_for	ACAACCTGTTTGCCCGTAGC
6	prpD_U2_rev	CATTTGCCCCGTTTTTCGCCA
7	prpC_H1_P1_for	CCGACAACAATCTCGACCCT- ACAAATGATAACAATGACG- AGGACAACATGATTCCGGG- GATCCGTCGACC
8	prpC_H2_P2_rev	TACGTTTCCTTATTGTTATT- CGTAGAGGTTTACTGGCG- CTTATCCAGCGCTGTAGGC- TGGAGCTGCTTCG
9	prpC_in-gene_for	TCCACCTTTACCAGTCGGGT
10	scpB_U1_for	ACTATCAACAAAGTGGCGGT
11	yglf_U2_rev	TATCTCCCCACAGCATGTAT
12	scpC_P1_H1_for	AAACCTAATTTTCGTTGGTCA- TTAATCCCTGCGAACGAAGG- AGTAAAAATGATTCCGGGG- ATCCGTCGACC
13	scpC_P2_H2_rev	ATTGCTGAAGATCGTGACG- GGACGAGTCATTAACCCAG- CATCGAGCCGGTTGTAGGC- TGGAGCTGCTTCG
14	scpC_in-gene_for	GTCACGTTCTTATTGCAGGA
15	pFLP3_flp_for	GTGTTTATGCTTAAATGCGT
16	pFLP3_flp_rev	TGCATGTACTAAGGAGGTT
17	kan1_for	ATAGCGTTGGCTACCCGTGA
18	kan2_rev	TCAGAGCAGCCGATTGTCTG
19	prp-K12_pBAD_OH_for_NEU	TTTGGGCTAGAAATAATTTT- GTTTAACTTTAAGAAGGAG- ATATACATACCATGTCTTTT- AGCGAATTTTA

Nummer	Name	Sequenz
20	pBAD_prpE_rev	CTCCTTTTATTTAGTGCTGT- TCATAAAACAGTGTCGTGA- TGCGCAGAGTGCTACTCTT- CCATCGCCTGGC
21	pBAD_adhE_for	TCACGACACTGTTTTATGAA- CAGCACTAAATAAAAGGAG- TGAAGGGAAATATGGCTGT- TACTAATGTCCG
22	pBAD_adhE-K12_rev	GGCTGAAAATCTTCTCTCAT- CCGCCAAAACAGCCAAGCT- GGAGACCGTTTTTAAGCGG- ATTTTTTCGCTT
23	atoDA_for_OH_pBAD	TTTGGGCTAGAAATAATTTT- GTTTAACTTTAAGAAGGAG- ATATACATACCATGAAAACA- AAATTGATGAC
24	atoDA_rev_OH_pBAD	CTCCTTTTATTTAGTGCTGTT- CATAAAACAGTGTCGTGATG- CGCAGAGTGCATAAATCA- CCCCGTTGCG
25	acs_pBAD_OH_for	GTTTAACTTTAAGAAGGAG- ATATACATACCATGAGCCA- AATTCACAAACA
26	acs_pBAD_OH_rev	TCATAAAACAGTGTCGTGAT- GCGCAGAGTGTTACGATGG- CATCGCGATAG
27	seq0.2	GTGCTGGTGTATATGCCGAT
28	prpE-K12-Seq1	CTGGCTGGAGAACCGCTGGA
29	prpE-K12-Seq2	ACGACCATTGATGATCCTGC
30	adhE_K12_seq1	AAACTGCTGATATCAAACGT
31	adhE_K12_seq2	TCATCGTGACTIONGACCGCTTC
32	adhE_K12_seq3	TCCATATTCCGCACGGTCTG
33	adhE-aerob-Punktmut-for	GAAACTCACTTCGAAAAGCTG
34	adhE-aerob-Punktmut-rev	AGCGCAGCGCCAGCTTTTTCGA

Nummer	Name	Sequenz
35	atoDA_OH_pBAD_for	TTTGGGCTAGAAATAATTTT- GTTTAACTTTAAGAAGGAG- ATATACATACCATGAAAACA- AAATTGATGAC
36	atoDA_OH_pBAD_rev	CTCCTTTTATTTAGTGCTGT- TCATAAAACAGTGTCTGTGA- TGCGCAGAGTGTGATAAAT- CACCCCGTTGCG
37	prpE-PM-for	TACTCTGCTGGCCGCCGCGC
38	prpE-PM-rev	GCGCCAATGCGCGCGGCCGCC
39	atoDA_seq1	GCGCCGTGTGGCGCAAGAGC
40	atoDA-adhEmut_seq2	TAAAGGAGTGAAGGGAAAT
41	adhE - PM(aerob)_for	AACTCACTTCGAAGAGCTGG
42	adhE - PM(aerob)_rev	AGCGCAGCGCCAGCTCTTCG
43	Bacteria 27F degeneriert	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
44	Bacteria 1525R degeneriert	AGAAAGGAGGTGWTCARCC
45	Arch 915 F	AGGAATTGGCGGGGGAG
46	Arch 915 R	CTCCCCGCCAATTCCT

3.1.5 Isothermale in vitro Ligation

Die isothermale in vitro Ligation nach Gibson (Gibson et al., 2009) dient der einfachen Integration eines oder mehrerer Fragmente in einen Vektor. Dies erreicht man, in dem das Insert mithilfe einer PCR mit Überhängen versehen wird, die komplementär zu den Enden des Vektors sind. Durch die Aktivität der T5 Exonuklease werden die Einzelstränge der Doppelstrang-DNA in 5'-3'-Richtung abgebaut. Dadurch entstehen Einzelstrangüberhänge beim Insert, sowie beim Vektor, die homolog sind und sich deshalb aneinander anlagern können. Eine DNA-Polymerase, die ebenfalls im Ansatz enthalten ist, füllt Lücken an den homologen Bereichen auf und eine DNA-Ligase versiegelt anschließend den Strangbruch. Tabelle 16 zeigt den Ansatz für den Reaktionspuffer, Tabelle 17 ist die Zusammensetzung für den Mastermix der in vitro Ligation zu entnehmen. Der Mastermix wurde in 15 µl-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt und erst kurz vor Verwendung zum Auftauen auf Eis gestellt. Insert(s) und Vektor werden in äquimolarer Konzentration und in einem Gesamtvolumen von 5 µl dem fertigen Reaktionsansatz zugegeben und der Ansatz bei 50 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend direkt zur Transformation in kompetente Zellen verwendet werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Reaktionspuffers für die isothermale in vitro Ligation.

Substanz	Konzentration
TRIS (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	50 mM
dNTPs	1 mM
DTT	50 mM
NAD	5 mM
PEG-8000	25 % (w/v)
ddH ₂ O	250 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die isothermale in vitro Ligation.

Substanz	Menge
Reaktionspuffer (5x)	80 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	5 µl
Tag DNA-Ligase (40 U/µl)	40 µl
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16 µl
ddH ₂ O	239 µl

3.1.6 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Elektroporation

Um Bakterienstämme mit Plasmid-DNA zu transformieren, müssen die Zellen zunächst vorbereitet werden. Sie wurden elektrokompetent gemacht, indem alle Salze im Flüssigmedium entfernt wurden. Dies erreicht man durch mehrfaches Waschen mit kaltem, sterilen und doppelt destillierten Wasser. Eine Übernachtskultur wurde am Morgen in SOB-Medium (siehe Tabelle 3) überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 herangezogen. Anschließend wurde ca. 1 ml der Kultur abzentrifugiert und anschließend in 500 µl kaltem Wasser resuspendiert. Dieser Prozess wurde drei bis viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in ca. 100 µl kaltem, doppelt destilliertem Wasser aufgenommen. Diese Menge Zellen reicht für einen Transformationsansatz, bei dem ca. 100 ng DNA eingesetzt wurden. Die eingesetzte DNA sollte zuvor ebenfalls von Salzen befreit werden, insbesondere wenn es sich um einen Ansatz der isothermalen in vitro Ligation nach Gibson handelt, da diese mit salzhaltigem Puffer angesetzt wird. Dazu wurde der Ansatz auf eine Filtrationsmembran mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm pipettiert, die auf ddH₂O aufgelegt wurde, und für mindestens eine Stunde dialysiert. Fertige Plasmide, die bereits in Wasser vorliegen, können direkt in die Trafo eingesetzt werden. 100 µl Zellen wurden in eine gekühlte Küvette pipettiert und die vorbereitete DNA wurde zugegeben. Anschließend wurde mithilfe eines MicroPulsersTM (BioRad Laboratories GmbH, München) die Elektroporation durchgeführt. Dabei wurde durch das angelegte elektrische Feld die Zellmembran permeabilisiert und so die Aufnahme von DNA-Molekülen ermöglicht. Dabei muss das elektrische Feld für eine bestimmte Zeit aufrecht erhalten werden (zwischen 3 und 5 ms), damit die Transformationseffizienz hoch

genug ist. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 4) aufgenommen und für mindestens eine Stunde darin geschüttelt. Erst danach wurden sie auf ein entsprechendes Selektionsmedium ausplattiert.

3.1.7 Gen-Inaktivierung nach Datsenko und Wanner

Um gezielt Gene im Genom von *Escherichia coli* str. K-12 auszuschalten, wurde die Methode von Datsenko und Wanner verwendet (Datsenko und Wanner, 2000). Für diese Arbeit wurde hierfür ein fertiger Deletionsstamm der Keio Collection als Ausgangsstamm verwendet (*E. coli* str. K-12 Δrnr) (Baba et al., 2006). Die weiteren Schritte erfolgten wie bei Datsenko und Wanner (2000). Zunächst wurde der Ausgangsstamm mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Dieses Plasmid trägt die Gene des Red Rekombinase Systems γ , β und *exo* aus dem Bakteriophagen Lambda, die für die Rekombination im Genom verwendet werden können. Der Stamm wurde mit diesem Plasmid vorinkubiert, wobei Ampicillin zur Selektion sowie Arabinose (1 mM) zur Induktion der Red-Gene zugegeben wurde. Sobald eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war, wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gestellt und anschließend drei- bis viermal mit kaltem, doppelt destilliertem H₂O gewaschen. Anschließend wurde das PCR-Produkt zugegeben und die Zellen in einem Elektroporator transformiert. Nach Inkubation wurde die Zellsuspension auf Kanamycin-Platten ausplattiert. Sofern die Rekombination erfolgreich war, besitzen die Zellen eine Kanamycin-Resistenz statt des Gens, das ausgeschaltet werden sollte. Kolonien wurden anschließend für eine Kolonie-PCR verwendet. Dabei wurden die Kolonien auf Kanamycin- und auf Ampicillinplatten ausgestrichen, um auf das pKD46-Plasmid zu testen. Klone, die auf Kanamycin, aber nicht auf Ampicillin wuchsen, und in der PCR positiv für die Größe der Kanamycin-Resistenz waren, wurden weiterverwendet. Diese wurden mit dem pFLP3-Plasmid transformiert, das das Enzym Flp Rekombinase trägt. Dieses erkennt die sogenannten FLP sites, die die Kanamycin-Resistenz flankieren, und hydrolysiert den DNA-Strang vor diesen FLP sites. Dadurch wird die Resistenz aus dem Genom entfernt. Klone, die das Plasmid besaßen, wurden in LB-Medium resuspendiert und über Nacht bei 43 °C inkubiert, um das pFLP3-Plasmid zu induzieren. Am nächsten Tag wurde die Suspension 1:10⁶ verdünnt und auf LB-Platten ausgestrichen. Klone wurden auf Kanamycin-, Ampicillin- und LB-Platten ausgestrichen, bevor sie als Template in eine weitere Kolonie-PCR eingesetzt wurden. Hierdurch kann nachvollzogen werden, ob sie zum Einen noch die Kanamycin-Resistenz, und zum Anderen noch das pFLP3-Plasmid besitzen. Waren die Klone auf beide Antibiotika negativ, und zeigten in der PCR eine entsprechend kleine Bande, hatte der Knockout funktioniert und das gewünschte Gen war ausgeschnitten. Die entsprechenden Bereiche wurden nochmals amplifiziert und zur Sequenzierung gegeben, um den Knockout zu überprüfen.

3.1.8 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Klonierungsarbeiten wurden Plasmide und Genomabschnitte sequenziert. Dafür wurden die zu überprüfenden Bereiche mithilfe der PCR BIO HiFi-Polymerase in einer PCR amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde mithilfe des „Wizard SV Gel and PCR Clean-up System“ Kits (Promega) aus dem Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit den passenden Primern zur Sequenzierung bei MWG Eurofins Genomics gegeben. Plasmide wurden mithilfe des Kit „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System“ von Promega aus den Zellen aufgereinigt und ebenfalls bei MWG Eurofins sequenziert.

3.1.9 Crossflow-Filtration und Nanofiltration

Um das Fermentat von Partikeln zu befreien, wurde es abzentrifugiert und anschließend mithilfe einer Crossflow-Apparatur filtriert. Dabei wird das Filtriergut nicht wie bei einer Dead-End-Filtration auf die Filtrationsmembran gepresst, sondern an ihr vorbeigeschert, so dass sich Partikel nicht oder nur schwer in der Membran festsetzen können. Das Fermentat wurde bei ca. 30.000 g für eine Stunde abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Crossflow-Filtration eingesetzt. Das Pellet wurde verworfen. Für die Filtration wurde ein System von SpectrumLabs (KrosFlo Research Ili TFF System) mit einem Crossflow-Modul mit einer Porengröße von 0,2 µm oder 1 kDa verwendet (D02-E20U-05-N oder D02-E001-05-S).

Die Nanofiltration wurde in einer 350 ml Rührzelle durchgeführt, in die eine Nanofiltrationsmembran (NF90 oder NF270, Dow Filmtec, Sterlitech, USA) eingesetzt wurde. Die Filtration erfolgte unter Stickstoffbegasung mit 4 - 4,5 bar, bis die Hälfte des Volumens abfiltriert war. Im Ausgangsfermentat sowie im Überstand über der Membran nach der Filtration wurde die Konzentration an Propionat mithilfe der HPLC bestimmt.

3.1.10 Zellsuspensionsassay zur Produktion von Plattformchemikalien

Für die Produktion von bestimmten Substanzen wurde ein Zellsuspensionsassay verwendet. Das Prinzip eines Zellsuspensionsassays ist, dass durch eine hohe Zelldichte des Produktionsstammes die Produktionsrate gesteigert bzw. beschleunigt werden soll. Zunächst wird der entsprechende Produktionsstamm über Nacht vorgezogen. Hier wurde als Anzuchtmedium für die Vorkultur ebenfalls LB-Medium (siehe Tabelle 2) verwendet, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie dem Induktor versetzt wurde. Durch diese Vorinduktion sollte erreicht werden, dass die Zellen die gewünschten Proteine bereits in der Vorkultur produzieren und so bereits mit dem Set an benötigten Enzymen in den Zellsuspensionsassay starten, um eine mögliche Verzögerung zu vermeiden. Es wurde die OD_{600} bestimmt und berechnet, wieviel der Vorkultur eingesetzt werden muss, um die gewünschte OD_{600} im Zielvolumen zu erhalten. Um eine möglichst hohe Produktivität zu erreichen, wurde eine

Ziel-OD₆₀₀ von 2,5 bis 5 gewählt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Minimalmedium mindestens einmal gewaschen, bevor der Assay gestartet wurde. Es wurde zum Waschen und für den Assay M9-Minimalmedium (siehe Tabelle 8) verwendet. Für die Produktion von Acetoin wurde dem Medium nur Propionat (30 mM) zugegeben, während für die Produktion von 1-Propanol zusätzlich Glycerin (50 mM) als Energiequelle zugesetzt wurde. Während des Zellsuspensionsassays wurden alle zwei Stunden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und die Flüssigphase mit einem Membranfilter (0,2 µm) filtriert. Die Analyse der Proben erfolgte mithilfe von HPLC und GC zur Messung der produzierten Substanzen.

3.2 Elektrochemische Methoden

3.2.1 Bioelektrochemisches System

Das bioelektrochemische System basiert auf einem Zweikammerreaktor mit 280 ml Volumen und einem Drei-Elektroden-Setup, wie zuvor entwickelt und beschrieben (Golitsch, 2016). Der schematische Aufbau ist Abb. 10 zu entnehmen.

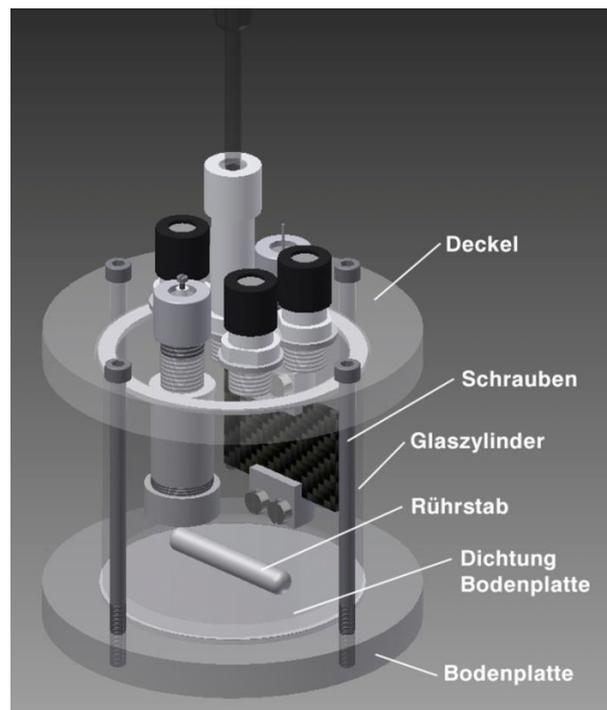


Abbildung 10: Aufbau des bioelektrochemischen Systems, bestehend aus zwei Kammern (Anodenkammer und Kathodenkammer) mit einem Drei-Elektroden-Setup. Nach Golitsch (2016).

Ein Graphitvlies (SIGRACELL®Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden) mit einer Fläche von 35 cm² wurde als Arbeitselektrode eingesetzt und auf ein Potential von 0 mV gegen Standardwasserstoffelektrode eingestellt. Ein Platinnetz mit einer Fläche von 1,25 cm² diente als Gegenelektrode, während eine Silber-Silberchlorid-Elektrode als Referenzelektrode (Sensortechnik Meinsberg GmbH; Ziegra-Knobelsdorf) genutzt wurde. Arbeits- und

Gegenelektrode wurden im System durch eine Protonenaustauschmembran (Fumapem F-950, Fumatech) getrennt. Der produzierte elektrische Strom im System wurde über eine chronoamperometrische Messung mithilfe eines Potentiostaten gemessen (PG8850RM, uniscan instruments). Das Gemüsefermentat wurde als Substrat für das bioelektrochemische System genutzt. Für das repetitive Chronoamperometrie-Experiment wurde ein Starter-Biofilm auf der Anode entwickelt, bevor das Fermentat zugegeben wurde. Hierfür wurden die Stämme für das bioelektrochemische System, wie in Tab. 1 beschrieben, eingesetzt. Alle Stämme, bis auf *G. sulfurreducens*, wurden in LB-Medium über Nacht vorinkubiert. *G. sulfurreducens* wurde in *Geobacter*-Medium (vgl. Tab. 5) für 2 - 3 Tage bei 30 °C kultiviert. Die Zellen aller Stämme wurden gewaschen und mit einer OD₆₀₀ von je 0,1 in *Geobacter*-Medium ohne Elektronenakzeptor (Natrium-Fumarat) im bioelektrochemischen System inokuliert (Gesamt-OD₆₀₀ = 0,5). Nach 4 Tagen Inkubation in Medium wurde dieses gegen Gemüsefermentat getauscht. Nachdem im Fermentat kein Acetat und Butyrat mehr gemessen werden konnte und die Strommessung absank, wurde es unter strikt anoxischen Bedingungen in einer Anaerobkammer gegen frisches Fermentat ausgetauscht. Hierfür wurde das Fermentat gegebenenfalls aufgetaut, der pH auf 7 eingestellt, und anschließend anaerobisiert. Dabei wurde durch Zyklen von Vakuum und Begasung der Austausch der Gasphase durch Stickstoff erreicht. Anschließend wurden die Systeme in einer Anaerobkammer entleert und mit dem vorbereiteten Fermentat befüllt. Im Inkubator wurden die Reaktoren auf Magnetrührern platziert, um eine konstante Durchmischung zu erreichen. Über Kanülen wurden Schläuche für die Begasung angeschlossen, um das System sauerstofffrei zu halten. Hierfür wurde ein Gasgemisch aus Stickstoff (80 %) und Kohlendioxid (20 %) verwendet.

3.2.2 Coulomb'sche Effizienz (CE)

Um zu bestimmen, wieviele Elektronen des Stoffwechsels durch die Bakterien auf die Anode des bioelektrochemischen Systems übertragen wurden, wurde die Coulomb'sche Effizienz berechnet. Diese gibt das Verhältnis der aus dem Substrat verfügbaren Elektronen zu den im gemessenen Strom vorhandenen Elektronen an. Für alle Versuche wurde mangels genauerer Informationen bezüglich der spezifischen Stoffwechselreaktionen als Substrat der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) gewählt. Dieser wurde über die gesamte Laufzeit des Systems bei jeder Probenahme gemessen (siehe 3.3.4). Die Anzahl Elektronen wurde aus der Differenz von Start- und Endwert des TOC berechnet ($\text{TOC}_0 - \text{TOC}_{\text{end}} = \Delta\text{TOC}$). Aus Gleichung 1 geht daher die Berechnung der Elektronen aus dem TOC hervor:

$$n[\text{TOC}] = \frac{\Delta\text{TOC} \cdot V_R}{M_C} \cdot E_C \quad (1)$$

V_R = Reaktorvolumen [l]

M_C = molare Masse von Kohlenstoff [g/mol]

E_C = Elektronenanzahl, die pro Mol Kohlenstoff verfügbar ist (4 Elektronen)

Um die Coulomb'sche Effizienz zu berechnen, muss berechnet werden, wieviele Elektronen auf die Anode übertragen wurden. Dies bestimmt man, indem man den Strom in Ampere über die Zeit in Sekunden integriert (Coulomb). Gleichung 2 wurde zur Berechnung der auf die Anode übertragene Stoffmenge an Elektronen genutzt:

$$n[C] = \frac{\int_0^t I(t)dt}{e \cdot N_A} \quad (2)$$

I = Strom [A]

t = Zeit [s]

e = Elementarladung ($1,6021766208 \times 10^{-19}$)

N_A = Avogadro-Konstante ($6,022140857 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Die Coulomb'sche Effizienz wurde schließlich mithilfe von Gleichung 3 aus den Werten der zuvor genannten Gleichungen wie folgt errechnet:

$$CE [\%] = \frac{n[\text{TOC}]}{n[C]} \cdot 100 \quad (3)$$

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von Restriktionsreaktionen oder PCR-Amplifikationen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die vernetzte Struktur der Agarose wird hierbei ausgenutzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Dafür wird eine Spannung angelegt, welche die negativ geladene DNA zum Pluspol wandern lässt. Dabei bewegen sich kleine DNA-Stücke schneller durch die Gelstruktur als große. Sie sind daher als Bande weiter unten im Gel zu erkennen. Es wurde Agarose eingewogen und in TAE-Puffer (vgl. Tab. 13) aufgekocht. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Stücke wurden entweder 1%ige oder 1.5%ige Gele verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde der Agaroselösung vor dem Gießen Midori Green (Nippon Genetics, Düren), ein DNA-Farbstoff, zugesetzt. Nach dem Auftrennen wurde das Gel unter einer UV-Lampe überprüft und Banden für die Gelaufreinigung ausgeschnitten, oder die Gele wurden mithilfe des MolecularImager ChemiDoc XRS+ mit der Software ImageLab fotografiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Tris-Acetat EDTA (TAE) Puffers.

Substanz	Menge
TRIS	4,85 g/l
EDTA	0,37 g/l

pH Wert mit Essigsäure auf 8,0 einstellen.

3.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Bestimmung von diversen Metaboliten in Fermentat und Medien wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Dieses System beruht auf einem chromatographischen Trennverfahren. Proben werden zusammen mit einem Laufmittel, in diesem Fall Schwefelsäure, durch eine Säule mit einer selektiven stationären Phase gepumpt. Die Moleküle in der Probe interagieren unterschiedlich stark mit der stationären Phase der Säule, dabei spielen ionische sowie polare Wechselwirkungen sowie die Größe des Moleküls eine Rolle. Je nach Stärke der Interaktion ergibt sich eine spezifische Zeit, die das Molekül in der Säule gehalten wird. Diese Zeit, nach der das Molekül die Trennsäule verlässt und detektiert werden kann, nennt man Retentionszeit, und wird in Minuten angegeben. Für diese Arbeit wurde ein HPLC System von Thermo Fisher Scientific mit einer Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, München) verwendet. Die Trennung erfolgte mit 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und 60 °C. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben über einen Membranfilter (0,2 µm) filtriert, und anschließend 150 µl Probe mit 15 µl 0,5 M H₂SO₄ angesäuert. Auf die Säule wurden als Probenvolumen 50 µl injiziert.

3.3.3 Gaschromatographie (GC)

Bestimmte Substanzen konnten mittels HPLC-Analyse nicht bestimmt beziehungsweise nicht chromatographisch voneinander getrennt werden. Für diese Substanzen wurde die Gaschromatographieanalyse verwendet. Je nach Struktur des zu messenden Stoffes liegt eine bestimmte Bindungsaffinität zur Säule vor. Diese bestimmt die Zeit, in der dieser Stoff von der Säule abgewaschen wird (Retentionszeit). Verhalten sich zwei Stoffe durch verschiedene Eigenschaften in ihrer Bindungsaffinität ähnlich, kann sich eine überlappende bis überdeckende Retentionszeit ergeben. In dieser Arbeit war es nicht möglich, Acetoin und Propionat mittels HPLC-Analyse voneinander zu trennen. Für diese beiden Stoffe sowie 2,3-Butandiol wurde die GC verwendet. Bei der Gaschromatographie wird die Probe vor Einspritzung auf die Säule verdampft und als Gas injiziert. Hierfür wird als mobile Phase ein Inertgas verwendet, in diesem Fall Helium. Anhand der verschiedenen Siedepunkte der enthaltenen Stoffe werden diese nacheinander aufgetrennt.

3.3.4 Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC)

Um einen Überblick über die grobe Zusammensetzung des Gemüsefermentats zu bekommen und die Konzentrationen an organischen Säuren, die per HPLC-Analyse gemessen wurden, in Relation setzen können, wurde zusätzlich der gesamte organische Kohlenstoff (total organic carbon, TOC) bestimmt. Dieser Wert ist auch im Bezug auf organische Belastung von Abwässern ein wichtiger Kennwert. Bestimmen lässt sich dieser Wert aus der Subtraktion der Messung des gesamten Kohlenstoffs (total carbon, TC) und des gesamten anorganischen Kohlenstoffs (total inorganic carbon, TIC) einer Probe:

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC} \quad (4)$$

Anorganischer Kohlenstoff kann zum Beispiel in Form von Carbonaten in der Probe enthalten sein. Dieser wird durch Ansäuerung mit ortho-Phosphorsäure bestimmt. Hierbei wird anorganischer Kohlenstoff zu CO_2 umgesetzt und ausgetrieben. Das entstehende CO_2 wird mit einem NDIR-Detektor (Nichtdispersive Infrarot-Detektion) gemessen und kann nach der Gesamtmessung des TC abgezogen werden. Die Messung des TC erfolgt durch thermische Oxidation einer Probe bei $800\text{ }^\circ\text{C}$ mit Sauerstoff und Platin als Katalysator. Das hierbei entstehende CO_2 wird ebenfalls mit dem NDIR-Detektor gemessen. Es wurde der multi N/C 2100S und der TOC-Gas-Generator TG 600 (Analytik Jena, Jena) für die Messungen verwendet. Die Proben wurden mit Reinstwasser 1:100 verdünnt und 2 ml für die Analyse eingesetzt.

3.3.5 Bioinformatische Analyse

Genomische DNA sowie Gesamt-RNA wurden aus dem Biofilm auf der Anode isoliert, um zum Einen eine 16S-Analyse und zum Anderen ein Metatranskriptom zu erstellen. Genomische DNA wurde mithilfe des Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) isoliert, während RNA mit dem RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MoBio/Qiagen, Hilden) gewonnen wurde. Mit der genomischen DNA wurde eine PCR auf die 16S rRNA-Sequenz durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Material für die Sequenzierung geeignet ist. Sowohl genomische DNA als auch die totale RNA wurde für die Durchführung der Sequenzierungen zu IMG M (Martinsried) gegeben. Für die Amplikonsequenzierung der 16S rRNA wurde eine Illumina MiSeq Sequenzierung (paired-end, 2 x 250 bp Reads) durchgeführt, während für das Metatranskriptom eine Illumina RNA TruSeq Sequenzierung (paired-end, 2 x 150 bp) genutzt wurde. Die genutzten Primer für die Sequenzierungen sowie deren Sequenzen sind Tabelle 19 zu entnehmen. Die Rohdaten der Sequenzierungen wurden von IMG M zur Verfügung gestellt. Die 16S rRNA-Datenanalyse erfolgte anschließend mit dem Programm CLC Genomic Workbench (Qiagen, Hilden). Die Metatranskriptom-Rohdaten wurden mithilfe der Software Diamond v0.9.10.111 analysiert (Buchfink, Xie und Huson, 2014). Insgesamt wurden 192 Millionen Reads aus der Sequenzierung von acht Lanes gewonnen. Das Alignment der paired-end Illumina reads wurde mithilfe des BLASTX Algorithmus mit einem E-value Schwellenwert von 10^{-6} durchgeführt. 18 Millionen Reads konnten Sequenzen aus der NCBI nr-Datenbank zugeordnet werden. mRNAs, zugehörig zu den Genen für die Enzyme Acetat Kinase, Phosphat-Acetyltransferase und Acetyl-CoA Synthetase wurden genutzt, um die Transkriptomdaten vermeintlichen Acetat-oxidierenden Mikroorganismen zuzuordnen. Das gleiche Prinzip wurde für Butyrat-Oxidierer genutzt, und hierfür wurden die Gene der Enzyme Butyrat Kinase und Butyryl-CoA:Acetate-CoA-Transferase als Repräsentanten für den Butyrat-Stoffwechsel gewählt. Transkripte, die c-Typ Cytochromen zugeordnet werden konnten, wurden zur Identifizierung von potentiellen Anodenreduzierenden Mikroorganismen genutzt.

Tabelle 19: Sequenzierungsprimer.

Name		Sequenz	Amplikongröße
<i>Bacteria Primer</i>			
Bakt_341F	forward	CCTACGGGNGGCWGCAG	464 bp
Bakt_805R	reverse	GACTACHVGGGTATCTAATCC	464 bp
<i>Archeae Primer</i>			
A519F	forward	CAGCMGCCGCGGTAA	387 bp
A906R	reverse	CAATTCMTTAAAGTTTC	387 bp

4 Ergebnisse

4.1 Repetitiver Chronoamperometrie-Versuch (Rep-CHR)

4.1.1 Stromentwicklung im Bioelektrochemischen System

Untersucht wurde die anaerobe Oxidation der organischen Säuren des Gemüsefermentats im bioelektrochemischen System. Das Substrat wurde nach Ende eines Experimentlaufes gegen frisches Substrat ausgetauscht, was 10 Mal wiederholt wurde. Hierdurch entstanden 11 eigenständige Experimentläufe, diese wurden alle mit demselben System durchgeführt. Daraus resultiert die Bezeichnung "repetitiver Chronometrie-Versuch" (Rep-CHR).

Die Strommessung aller Läufe erfolgte mit Hilfe eines Potentiostaten über die Zeit. Als Beispielkurven wurden der zweite sowie der elfte Experimentlauf ausgewählt, um den beobachteten Prozess zu veranschaulichen (vgl. Abb. 11 und 12). Die Stromwerte aller Experimentläufe sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Gegeben ist in beiden Fällen die Stromdichte des Systems in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Es wurden zum Einen die Experimentläufe 1 - 9 zusammengefasst, sowie separat die beiden Läufe 10 und 11, da diese beiden Gruppen Unterschiede im Stromverlauf sowie den Konzentrationen der organischen Säuren aufweisen.

Tabelle 20: Durchschnitt, Maxima und Minima im Stromverlauf im bioelektrochemischen System, gegeben in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Experiment	Stromdichte [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]		
	Durchschnitt	Maximum	Minimum
1	71,84 ± 39,45	189,65 ± 82,59	16,18 ± 1,57
2	119,92 ± 19,31	261,46 ± 0,77	50,00 ± 61,71
3	82,17 ± 50,07	158,54 ± 47,28	27,07 ± 35,68
4	94,82 ± 48,70	252,24 ± 86,03	53,65 ± 27,25
5	116,06 ± 75,99	151,16 ± 4,68	69,47 ± 71,02
6	84,04 ± 40,89	106,12 ± 59,49	52,40 ± 2,27
7	117,46 ± 39,13	151,14 ± 4,67	50,92 ± 7,16
8	96,81 ± 22,13	225,72 ± 30,41	37,50 ± 3,54
9	106,05 ± 27,60	139,00 ± 34,69	59,30 ± 9,56
10	135,48 ± 29,22	228,11 ± 50,63	91,50 ± 18,68
11	119,34 ± 39,31	235,97 ± 34,18	22,41 ± 31,58
\emptyset	104,00 ± 19,64	190,83 ± 52,40	48,22 ± 21,82

Wie Tabelle 20 entnommen werden kann, konnte im Schnitt eine Stromdichte von $104,00 \pm 19,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen werden. Der Maximalwert lag im Schnitt bei $190,83 \pm 52,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, während der niedrigste gemessene Stromwert durchschnittlich $48,22 \pm 21,82 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ betrug. Zur besseren Veranschaulichung des Prozesses wurden die Stromverläufe von Lauf 2 und 11 zusammen mit den Konzentrationen an organischen Säuren sowie des TOC über die Zeit aufgetragen (siehe Abb. 11 und 12).

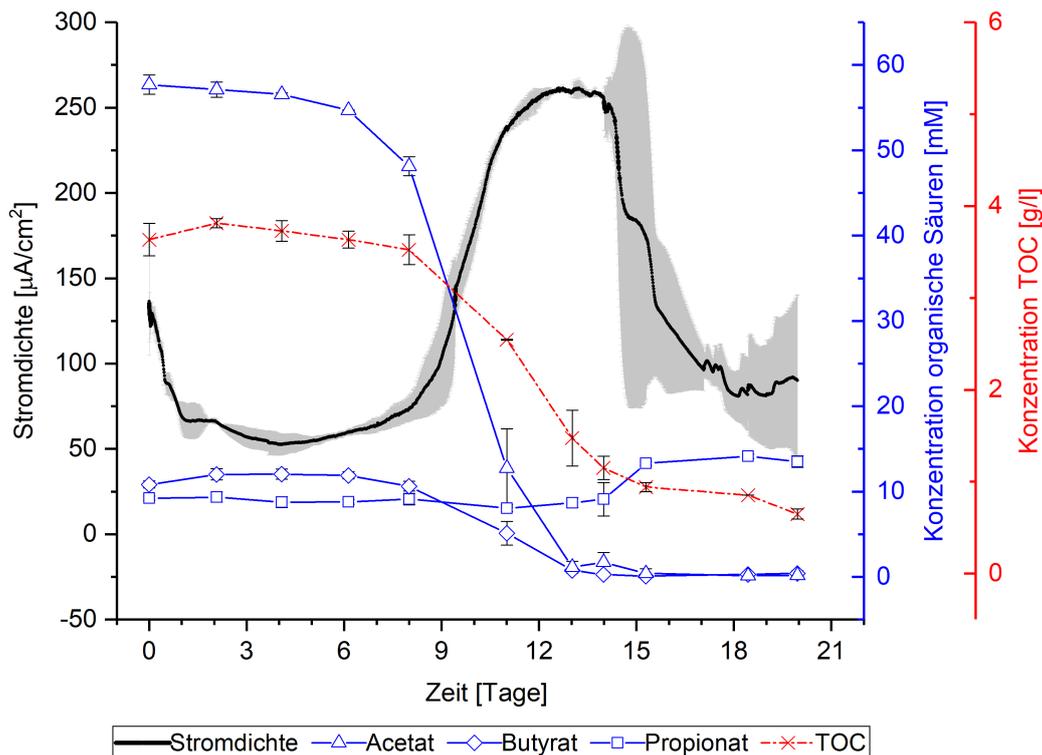


Abbildung 11: Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf 2. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.

Bei näherer Betrachtung der Stromdichte des zweiten Experimentlauf ist zu beobachten, dass das System zu Beginn eine Art Verzögerungs-, eine so genannte Lag-Phase aufwies. Diese Phase erstreckte sich über etwa acht Tage und zeichnete sich dadurch aus, dass die Stromdichte nicht signifikant zunahm. Ab Tag acht konnte eine deutliche Stromzunahme gemessen werden, die schließlich zum Maximalwert von $261,46 \pm 0,77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ führte. Anschließend sank der Strom bis zum Minimum von $50 \pm 61,71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Experiment gestoppt und das Substrat getauscht, ehe das System wieder in Betrieb genommen wurde. Eine wie oben beschriebene Lag-Phase trat bei den späteren Experimentläufen nicht mehr auf, wie bei Lauf elf zu sehen ist. Hier begann die Zunahme des Stroms bereits ab Tag eins. Die Stromdichte erreichte dann ihren Maximalwert, ehe sie wieder absank.

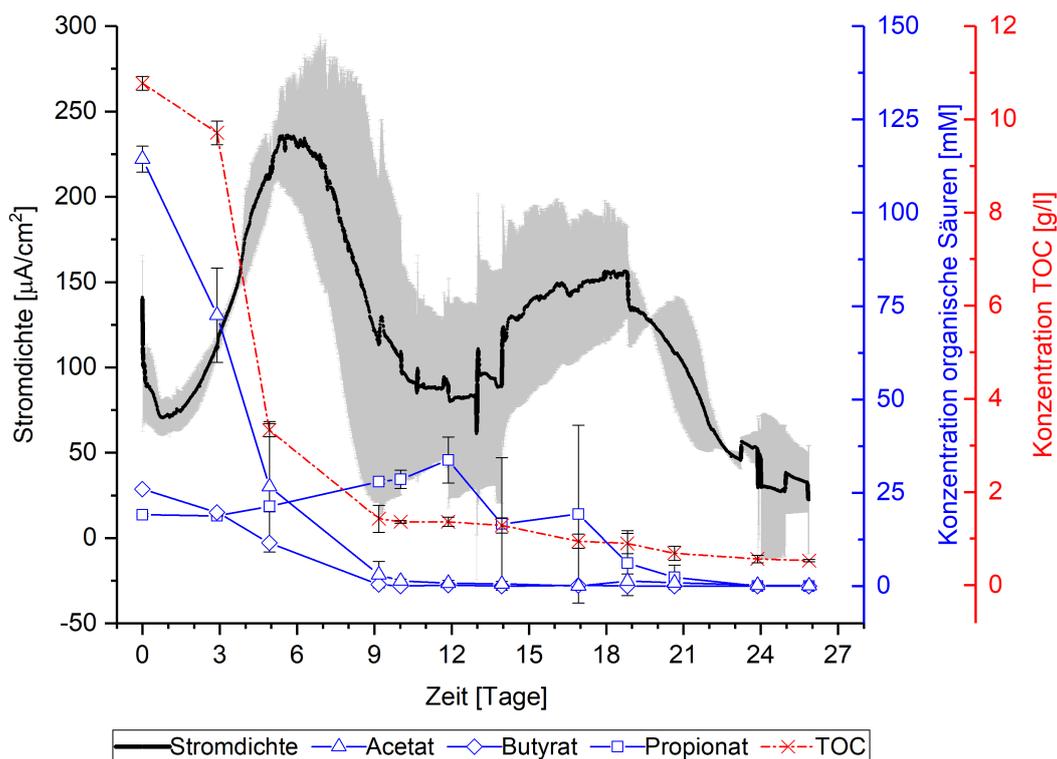


Abbildung 12: Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf 11. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.

Ein weiteres Phänomen, das nur beim zehnten und elften Lauf beobachtet werden konnte, ist eine erneute Stromdichtenzunahme nach dem ersten Abfall. Hier stieg die Stromdichte erneut an, ehe sie auf den Minimalwert von $22,41 \pm 31,58 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ abfiel. Bei diesen beiden Läufen wurde jedoch auch eine längere Laufzeit gewählt, das bedeutet, dass die Laufzeit nicht nach dem ersten Stromdichten-Maximum bzw. dem erneuten Abfall der Stromdichte beendet wurde. Über die längere Laufzeit konnte festgestellt werden, dass bei Lauf 10 und 11 zwei Peaks in der Stromdichte beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 12). Im Folgenden wird die Stromdichte in Zusammenhang mit den Konzentrationen an organischen Säuren sowie des gemessenen organischen Kohlenstoffs gesetzt.

4.1.2 Entwicklung der organischen Säuren und des gesamten organischen Kohlenstoffs im Bioelektrochemischen System

Zur besseren Charakterisierung des bioelektrochemischen Systems wurde die Abnahme der organischen Säuren Acetat, Butyrat und Propionat mittels HPLC bestimmt. In Tabelle 21 sind die Werte für alle Experimentläufe gegeben. Es wird deutlich, dass für zwei der drei messbaren organischen Säuren, Acetat und Butyrat, eine Abnahme der Konzentration über die Zeit verzeichnet werden konnte.

Tabelle 21: Start- und Endkonzentrationen für die gemessenen organischen Säuren im bioelektrochemischen System, gegeben in mM.

Lauf-Nr.	Acetat [mM]		Propionat [mM]		Butyrat [mM]	
	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende
1	64,79 ± 0,00	0,00 ± 0,00	15,39 ± 0,00	3,98 ± 4,40	20,14 ± 0,00	0,07 ± 0,12
2	57,70 ± 1,14	0,00 ± 0,00	9,22 ± 0,23	7,58 ± 3,34	10,83 ± 0,41	0,05 ± 0,09
3	53,09 ± 0,36	0,00 ± 0,00	8,50 ± 0,05	14,06 ± 0,56	9,14 ± 0,06	0,04 ± 0,06
4	77,22 ± 1,04	0,21 ± 0,11	14,89 ± 0,47	21,95 ± 2,52	21,46 ± 0,68	0,00 ± 0,00
5	68,88 ± 1,12	0,55 ± 0,04	12,47 ± 1,00	16,91 ± 4,24	18,06 ± 0,11	0,00 ± 0,00
6	48,09 ± 1,40	0,22 ± 0,31	8,65 ± 0,52	14,01 ± 0,15	12,82 ± 0,19	0,58 ± 0,82
7	47,35 ± 0,90	0,00 ± 0,00	8,38 ± 0,56	16,13 ± 2,27	10,53 ± 0,22	0,00 ± 0,00
8	52,15 ± 0,13	0,27 ± 0,38	8,81 ± 0,06	8,77 ± 6,04	13,75 ± 0,24	0,00 ± 0,00
9	55,21 ± 0,16	0,67 ± 0,58	8,54 ± 0,39	19,97 ± 1,24	13,88 ± 0,10	0,00 ± 0,00
10	95,46 ± 0,20	0,17 ± 0,25	20,20 ± 0,06	1,5 ± 2,12	14,67 ± 0,23	0,00 ± 0,00
11	114,41 ± 3,48	0,07 ± 0,1	19,12 ± 0,36	0,00 ± 0,00	25,93 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Ø 1-9	58,27 ± 10,08	0,21 ± 0,25	10,53 ± 2,91	13,71 ± 5,90	14,51 ± 4,41	0,09 ± 0,20
Ø 10-11	104,95 ± 13,36	0,15 ± 0,07	19,65 ± 0,78	0,75 ± 1,06	20,30 ± 7,92	0,00 ± 0,00

Für Acetat lag im Schnitt zu Beginn eine Konzentration von $58,27 \pm 10,08$ mM vor, für die letzten beiden Läufe wurde ein Fermentat mit deutlich höheren Werten (durchschnittlich $104,95 \pm 13,36$ mM) verwendet. Über den Verlauf der Experimente nahm diese Konzentration bis auf durchschnittlich $0,21 \pm 0,25$ mM ab, auch für die letzten beiden Läufe ($0,15 \pm 0,07$ mM). Für Butyrat, dessen Startkonzentration im Schnitt $14,51 \pm 4,41$ mM ($20,30 \pm 7,92$ mM bei Lauf 10 und 11) betrug, konnte eine durchschnittliche Endkonzentration im System von $0,09 \pm 0,20$ mM (0 mM bei Lauf 10 und 11) gemessen werden. Durch diese Werte wird veranschaulicht, dass diese beiden organischen Säuren nahezu komplett oxidiert wurden. Anders verhielt es sich für die dritte organische Säure, Propionat, deren Konzentration zu Beginn im Schnitt $10,53 \pm 2,91$ mM ($19,65 \pm 0,78$ mM bei Lauf 10 und 11) betrug. Bei allen Läufen wurde für diese eine durchschnittliche Endkonzentration von $13,71 \pm 5,90$ mM gemessen. Diese Säure wurde also nicht abgebaut, sondern zusätzlich gebildet. In Lauf 10 und 11 dagegen wurde Propionat über den Zeitverlauf nahezu komplett oxidiert ($0,75 \pm 1,06$ mM Endkonzentration). Es wird also deutlich, dass nur in Lauf 10 und 11 alle drei organischen Säuren vollständig degradiert wurden, dies korreliert mit der verlängerten Laufzeit der Experimente. Die Laufzeit verkürzte sich in den Läufen 1 - 9 mit jedem Experimentlauf. Lauf 1 dauerte etwa 31 Tage, Lauf 9 jedoch nur noch etwa 8 Tage. Dies deutet auf eine Adaptation des Mikrobioms im System hin, da ein Lauf erst dann beendet wurde, wenn die Messung für Acetat und Butyrat Konzentrationen nahe Null ergab. Über 9 Experimentläufe wurde daher eine Verkürzung der Prozessdauer erreicht. In Lauf 10 und 11 wurde die Messung nicht zu dem Zeitpunkt beendet, als Acetat und Butyrat abgebaut waren, sondern eine längere Laufzeit ermöglicht. Hier waren Acetat und Butyrat jedoch ebenfalls nach 7 bzw. 9 Tagen nur noch in sehr geringen Konzentrationen messbar, obwohl bei diesen Fermentaten deutlich höhere Anfangskonzentrationen vorlagen. Die Konzentration an Propionat betrug zu diesen Zeitpunkten noch $26,75 \pm 1,79$ mM (Lauf 10) bzw. $28,60 \pm 2,49$ mM (Lauf 11). Erst nach 14 Tagen (Lauf 10) bzw. 24 Tagen (Lauf 11) war auch nahezu kein Propionat mehr messbar. Die Laufzeit des Experimentes verlängerte sich also durch den Abbau von Propionat. Dies lässt sich auf die Beobachtung zurückführen, dass der Abbau von Propionat erst zu dem Zeitpunkt wirklich startete, als die Konzentrationen an Acetat und Butyrat $< 1,5$ mM betragen. Diese Beobachtung lässt sich auch in den Konzentrationen des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) wiedererkennen. In Tabelle 22 sind die Werte für den TOC des Fermentats im System gegeben. Der Unterschied zwischen den Läufen 1 - 9 und 10 - 11 wird auch beim TOC deutlich. So handelte es sich bei Lauf 10 und 11 um Fermentate mit deutlich höherem Anfangs-TOC, im Vergleich zu den vorherigen Läufen lag dieser über 2,5-Mal so hoch ($3,78$ g/l vs. $10,34$ g/l). Dies ist ebenfalls bei den Konzentrationen der organischen Säuren zu beobachten, im Schnitt lagen diese bei den letzten beiden Läufen etwa 1,40- bis 1,87-Mal so hoch wie in Lauf 1 - 9. Insgesamt betrachtet wurde der Hauptanteil des TOC abgebaut. Dies lässt sich anhand des prozentualen Abbaus gut erkennen. Dieser lag zwischen 83,51 % und 93,25 %.

Tabelle 22: Gemessener TOC im bioelektrochemischen System zu Beginn und Ende des Experimentes, sowie die Abbaurrate in [%] und [g/m²*h].

Lauf-Nr.	TOC [g/l]		Abbau [%]	Abbaurrate [g/m ² *h]
	Start	Ende		
1	4,50 ± 0,00	0,67 ± 0,35	85,01 ± 3,95	1,79 ± 0,00
2	3,64 ± 0,18	0,39 ± 0,22	89,32 ± 5,47	1,61 ± 0,62
3	4,57 ± 0,28	0,72 ± 0,30	84,07 ± 7,57	1,76 ± 0,29
4	2,99 ± 0,04	0,67 ± 0,06	77,55 ± 1,65	1,95 ± 0,26
5	4,61 ± 0,20	0,75 ± 0,08	83,73 ± 2,49	2,54 ± 0,06
6	3,21 ± 0,07	0,55 ± 0,21	83,46 ± 5,34	2,25 ± 0,45
7	3,65 ± 0,02	0,30 ± 0,14	91,66 ± 3,87	2,00 ± 0,29
8	3,46 ± 0,04	0,39 ± 0,24	88,70 ± 6,79	1,78 ± 0,18
9	3,42 ± 0,11	1,08 ± 0,28	68,19 ± 9,22	1,78 ± 0,10
10	9,90 ± 0,23	0,47 ± 0,11	95,28 ± 0,96	6,79 ± 0,29
11	10,78 ± 0,15	0,53 ± 0,02	95,10 ± 0,29	7,08 ± 0,13
Ø 1-9	3,78 ± 0,62	0,61 ± 0,24	83,51 ± 7,06	2,85 ± 0,29
Ø 10-11	10,34 ± 0,62	0,50 ± 0,04	95,19 ± 0,13	6,94 ± 0,21

Der höhere Wert wurde für Lauf 10 und 11 erreicht, was darauf zurückzuführen ist, dass, nicht wie zuvor, Propionat zurückgehalten wurde, sondern alle drei organischen Säuren oxidiert wurden. Zudem lief der Abbau hier auch schneller ab als bei den Läufen 1 - 9, gut erkennbar an der höheren Abbaurrate in g/m²*h. Diese liegt für die letzten beiden Läufe ca. 2,4-Mal höher als bei den anderen Experimentläufen. Für Lauf 2 (vgl. Abb. 11) ist zunächst die bereits beschriebene Lag-Phase gut zu erkennen, die sich über ca. acht Tage erstreckte. Es wird deutlich, dass die Zunahme des Stroms erst zu dem Zeitpunkt begann, als auch die Konzentrationen der organischen Säuren abnahmen. Nach etwa 13 Tagen war der Maximalwert des Stroms erreicht und die Säuren Acetat und Butyrat fast vollständig abgebaut. Ab diesem Punkt begann der Strom zu sinken, während die Konzentration an Propionat zunahm. Ab Tag 18 war sowohl der Strom als auch die Konzentrationen konstant und das Experiment wurde daher zu diesem Zeitpunkt gestoppt. Für Lauf 11 verhält es sich zunächst sehr ähnlich (vgl. Abb. 12). Wie bereits beschrieben, nahm der Strom ohne erkennliche Lag-Phase bereits von Tag 0 an zu. Auch die Abnahme der organischen Säuren Acetat und Butyrat konnte zu diesem Zeitpunkt verzeichnet werden. Beim erstem Strom-Maximum zwischen Tag 6 und Tag 7 waren diese beiden Säuren bereits stark dezimiert. Propionat stieg währenddessen an bis zum Ende des ersten Strom-Maximums (etwa Tag 12), ab hier konnte eine steile Abnahme verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren Acetat und Butyrat bereits komplett abgebaut. Mit der weiteren Abnahme von Propionat kam es zum zweiten Strom-Peak, der schnell wieder abflachte, während auch die Propionat-Konzentration bis auf null absank. Für den TOC ließ sich ein sehr ähnlicher Verlauf verzeichnen wie für Acetat. Insgesamt startete der TOC-Abbau steil und flachte dann im späteren Verlauf ab.

4.2 Open Circuit Potential-Versuch (OCP)

4.2.1 Entwicklung des Potentials, der organischen Säuren und des gesamten organischen Kohlenstoffs im bioelektrochemischen System

Zur Überprüfung, welche Auswirkungen das an der Arbeitselektrode des bioelektrochemischen Systems angelegte Potential auf die Stoffwechselforgänge im Fermentat hat, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Es wurde ein Triplikat an Reaktoren als Open Circuit Potential (OCP)-Versuch mit Fermentat als Substrat gestartet. Hierbei wird ein Widerstand angelegt, der verhindert, dass ein Strom fließen kann. Das Potential, das sich während des Experimentes an der Elektrode einstellt, wird mit Hilfe eines Potentiostaten gemessen. Abb. 13 zeigt das gemessene Potential sowie die Konzentrationen an organischen Säuren und des TOC über den Zeitverlauf.

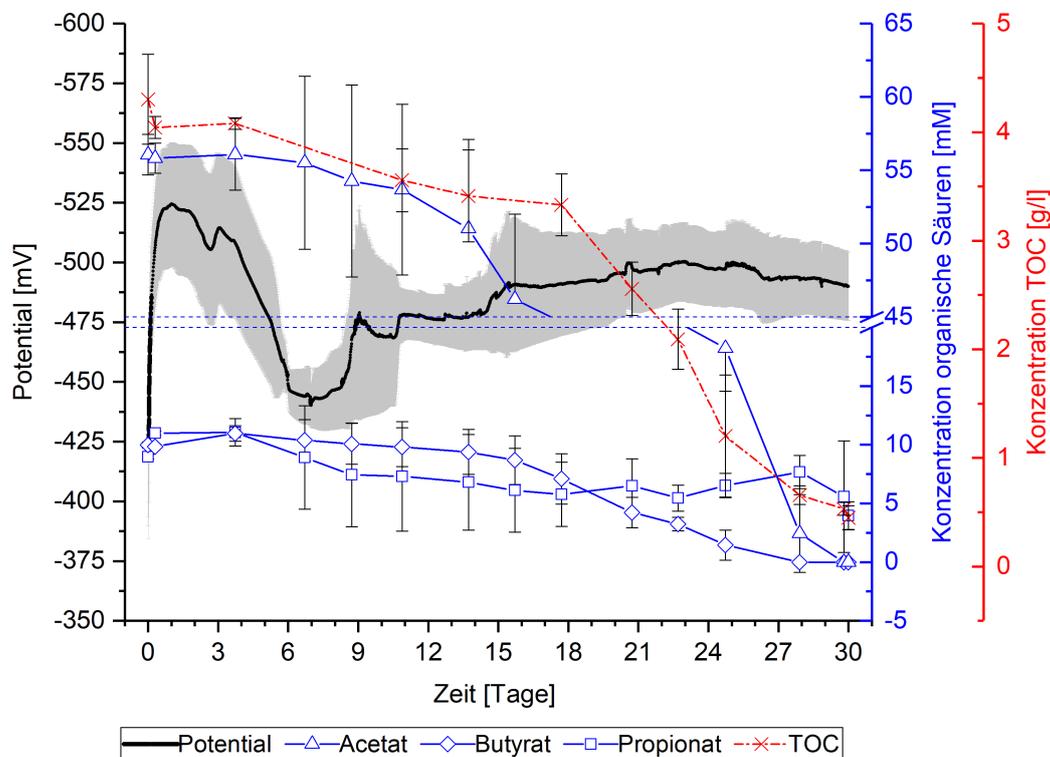


Abbildung 13: Potentialverlauf im bioelektrochemischen System, OCP. Potential in mV, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt.

Über den Verlauf von ca. 30 Tagen schwankte das gemessene Potential zwischen Tag 1 und 11 zwischen -425 mV und -525 mV, ehe es sich nach etwa 12 Tagen auf ein Potential zwischen -475 und -500 mV stabilisierte ($-487.48 \pm 18,50$ mV). Für die organischen Säuren und den TOC konnte eine Abnahme ab dem 6. Tag verzeichnet werden. Über den Verlauf von 30 Tagen wurden Acetat und Butyrat komplett oxidiert, während Propionat mit einer Endkonzentration von 5,57 mM im Fermentat verblieb. Auch der TOC nahm ab, zeigte jedoch

zu Beginn überraschend große Schwankungen, die gut mit dem Verlauf des Potentials zu korrelieren sind. Erst ab Tag 16 war eine klare Abnahme zu verzeichnen, bis am Ende der Experimentlaufzeit noch 0,53 g/l TOC gemessen werden konnten. Da mit diesem Experiment gezeigt werden konnte, dass der Abbau der organischen Säure (bzw. des TOC) unabhängig von der Anode als Elektronenakzeptor funktioniert, wurde ein weiteres Experiment mit einer Chronoamperometrie sowie einem OCP gestartet. Darüber sollte ein direkter Vergleich des Prozesses mit und ohne Anode als verfügbarem Elektronenakzeptor möglich sein.

4.3 Chronoamperometrie- vs. Open Circuit Potential-Versuch (CHR-OPC)

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen eine als Elektronenakzeptor verfügbare Elektrode auf die Stoffwechselprozesse nimmt, wurde je ein Triplikat mit bioelektrochemischen Reaktoren als Chronoamperometrie (CHR)-Versuch und als Open Circuit Potential (OCP)-Versuch betrieben. Das Experiment gibt Informationen im Vergleich von CHR und OCP und wurde daher als CHR-OCP-Versuch bezeichnet. Alle Reaktoren wurden mit dem gleichen Fermentat als Substrat befüllt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass bezüglich des Abbaus der organischen Säuren sowie des TOC keinerlei Unterschiede festgestellt werden konnten. Die Werte sind für die bessere Übersicht in Tab. 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Konzentrationen an Säuren und TOC im bioelektrochemischen System für das CHR-OCP-Experiment zu Beginn und Ende des Experimentes.

		CHR		OCP	
		Start	Ende	Start	Ende
Acetat	[mM]	68,62 ± 1,63	1,24 ± 1,91	69,41 ± 1,09	0,50 ± 0,22
Propionat	[mM]	13,19 ± 0,39	25,75 ± 0,49	13,28 ± 0,25	25,03 ± 1,20
Butyrat	[mM]	17,63 ± 0,42	0,00 ± 0,00	17,76 ± 0,26	0,00 ± 0,00
TOC	[g/l]	4,6 ± 0,19	1,11 ± 0,03	4,43 ± 0,13	1,04 ± 0,04

Für das CHR-Experiment konnte eine maximale Stromdichte von $301,92 \pm 88,81 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen werden. Für das OCP-Experiment stellte sich im Schnitt ein Potential von $-466,85 \pm 7,74 \text{ mV}$ ein, was gut vergleichbar ist mit dem Potential im ersten OCP-Versuch. Von beiden Triplikaten (CHR und OCP) wurde ebenfalls genomische DNA isoliert, um eine 16S rRNA-Analyse durchzuführen und das Mikrobiom mit dem Rep-CHR-Versuch vergleichen zu können. Dazu wird zunächst das Ergebnis der 16S rRNA-Analyse des Rep-CHR betrachtet.

4.4 16S rRNA Sequenzierung

4.4.1 16S rRNA Sequenzierung des Rep-CHR

Zur Bestimmung der Hauptakteure des bioelektrochemischen Systems im Rep-CHR-Versuch wurde genomische DNA aus dem Biofilm auf der Anode isoliert. Mithilfe einer PCR und universellen 16S rRNA-Primern konnte gezeigt werden, dass DNA vorhanden ist, die zur Sequenzierung verwendet werden kann. Die Illumina MiSeq Sequenzierung (paired-end, 2 x 250 bp) erfolgte bei IMG. Die mit der Software CLC Genomic Workbench (Qiagen, Hilden) erzeugten Diagramme geben Informationen über die Zusammensetzung des Biofilms, aber nicht seiner Aktivität. Sie sind Abb. 14 zu entnehmen.

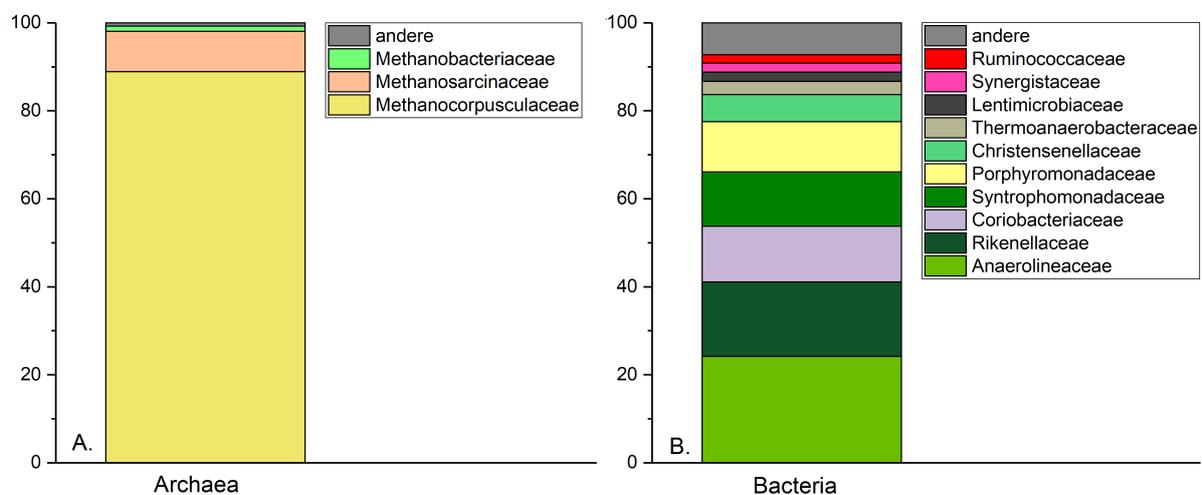


Abbildung 14: Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung des Rep-CHR-Experimentes. **A.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm. **B.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm.

Zunächst werden die Organismen aus der Domäne der Archaea betrachtet (Abb. 14, A.). Hier konnten nur die drei Familien Methanocorpusculaceae, Methanosarcinaceae und Methanobacteriaceae klar zugeordnet werden. Auffällig ist, dass alle drei Familien zu den Methanbildnern gehören. Die Familie, die mit etwa 89% die größte Gruppe darstellt, ist die Methanocorpusculaceae. Diese Organismen sind kokkoide Zellen mit wenig Motilität. Als Substrate eignen sich CO_2/H_2 , Formiat und 2-Propanol/ CO_2 und 2-Butanol/ CO_2 (Zellner et al., 1989). Die zweitgrößte Gruppe (9,2%) stellt die Familie Methanosarcinaceae, für die beschrieben wurde, dass sie im Bezug auf Substrate und Energiegewinnung die vielseitigste Familie der methanogenen Archaea darstellen. Üblicherweise nutzen sie methylierte Amine und Methanol, doch manche Spezies wachsen auch mit H_2/CO_2 , Acetat, Dimethylsulfid, Methanethiol oder sogar Kohlenstoffmonooxid. Sie bilden kokkoide Zellen, manche Spezies auch große Zellaggregate, und sind in vielen anaeroben Umgebungen zu finden, wo Methan produziert wird (Oren, 2014b). Die letzte und hier am wenigsten vertretene Gruppe (1,2%), die Methanobacteriaceae, umfasst Zellen in diversen Formen und reduziert zumeist ebenfalls

CO₂ mit H₂ zur Energiegewinnung. Es gibt auch Arten, die Formiat nutzen, und auch einige, die Methanol zu Methan reduzieren (Oren, 2014a).

Weitaus diverser zeigt sich das Mikrobiom der Bacteria (Abb. 14, B.). Die hier größte Gruppe ist die Familie der Anaerolineaceae (24,2%). Es wurde bereits in anderen Studien beschrieben, dass Mitglieder dieser Familie häufig in anaeroben Fermentern oder Biogas-Mikrobiomen vorkommen (Xia et al., 2016; Rivière et al., 2009; Narihiro et al., 2012). Sie wurden beschrieben als Cellulose-zersetzende Organismen sowie als Mitglieder von n-Alkan abbauenden Konsortien (Liang et al., 2015). Mitglieder der zweitgrößten Gruppe (16,9%), der Familie Rikenellaceae, sind beschrieben als natürliche Bewohner des Verdauungstraktes verschiedener Tiere. Sie bilden Alkohole, Acetat, Propionat und Succinat als Endprodukte ihres anaeroben Stoffwechsels mit Zuckern wie Glucose, Laktose, Mannose oder Melibiose als Ausgangsstoff (Graf, 2014). Auch die Familie der Coriobacteriaceae, die mit 12,7% die drittgrößte Gruppe stellen, ist in Bereichen des Körpers von Säugetieren zu finden, wie zum Beispiel in der Mundhöhle, dem Verdauungstrakt sowie im Geschlechtstrakt. Im Darm übernehmen sie wichtige Funktionen wie z.B. die Umsetzung von Gallensalzen oder Steroiden. Viele dieser strikten Anaerobier sind asaccharolytisch, was bedeutet, dass sie keine Zucker verwerten können, besitzen jedoch eine Vielzahl an Aminopeptidasen (Clavel, Lepage und Charrier, 2014). Die Familie Syntrophomonadaceae, die nahezu gleichauf mit den Coriobacteriaceae an vierter Stelle auftreten (12,4%), sind typische syntrophe Organismen, insbesondere für den Abbau von Butyrat. Sie katalysieren die β -Oxidation von Butyrat in Syntrophie mit Organismen, die Wasserstoff oder Formiat nutzen können (Venkiteshwaran et al., 2015; Schink und Muñoz, 2014). Auch die nächste Gruppe liegt mit 11,4% nah bei den beiden zuvor genannten Familien. Die Porphyromonadaceae ist eine sehr diverse Gruppe, die ebenfalls im menschlichen und tierischen Gastrointestinalen Trakt sowie in der Mundhöhle gefunden werden kann. Auch Mitglieder dieser Familie sind beschrieben als Zucker-fermentierende Produzenten von Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Phenylacetat, Isovalerat, Succinat und Laktat (Sakamoto, 2014; Krieg et al., 2010). Die letzte Gruppe, die hier betrachtet wird, ist die Familie der Christenellaceae. Diese Familie von Anaerobiern wurde insbesondere im Verdauungstrakt von Menschen mit einem niedrigen Body Mass Index (BMI) entdeckt. Für den Genus *Christensenella* wurde beschrieben, dass diese Organismen diverse Zucker nutzen können und Fettsäuren produzieren (Goodrich et al., 2014; Morotomi, Nagai und Watanabe, 2012).

4.4.2 16S rRNA des CHR-OCP-Versuchs

Auch hier wurde genomische DNA aus dem Biofilm auf der Anode isoliert, jeweils aus allen Reaktoren (CHR vs. OCP). Mithilfe einer PCR und universellen 16S rRNA-Primern konnte gezeigt werden, dass DNA vorhanden ist, die zur Sequenzierung verwendet werden kann. Die Illumina MiSeq Sequenzierung (paired-end, 2 x 250 bp) erfolgte bei IMG. Die mit der

Software CLC Genomic Workbench erzeugten Diagramme geben Informationen über die Zusammensetzung des Biofilms, aber nicht seiner Aktivität. Sie sind Abb. 15 zu entnehmen.

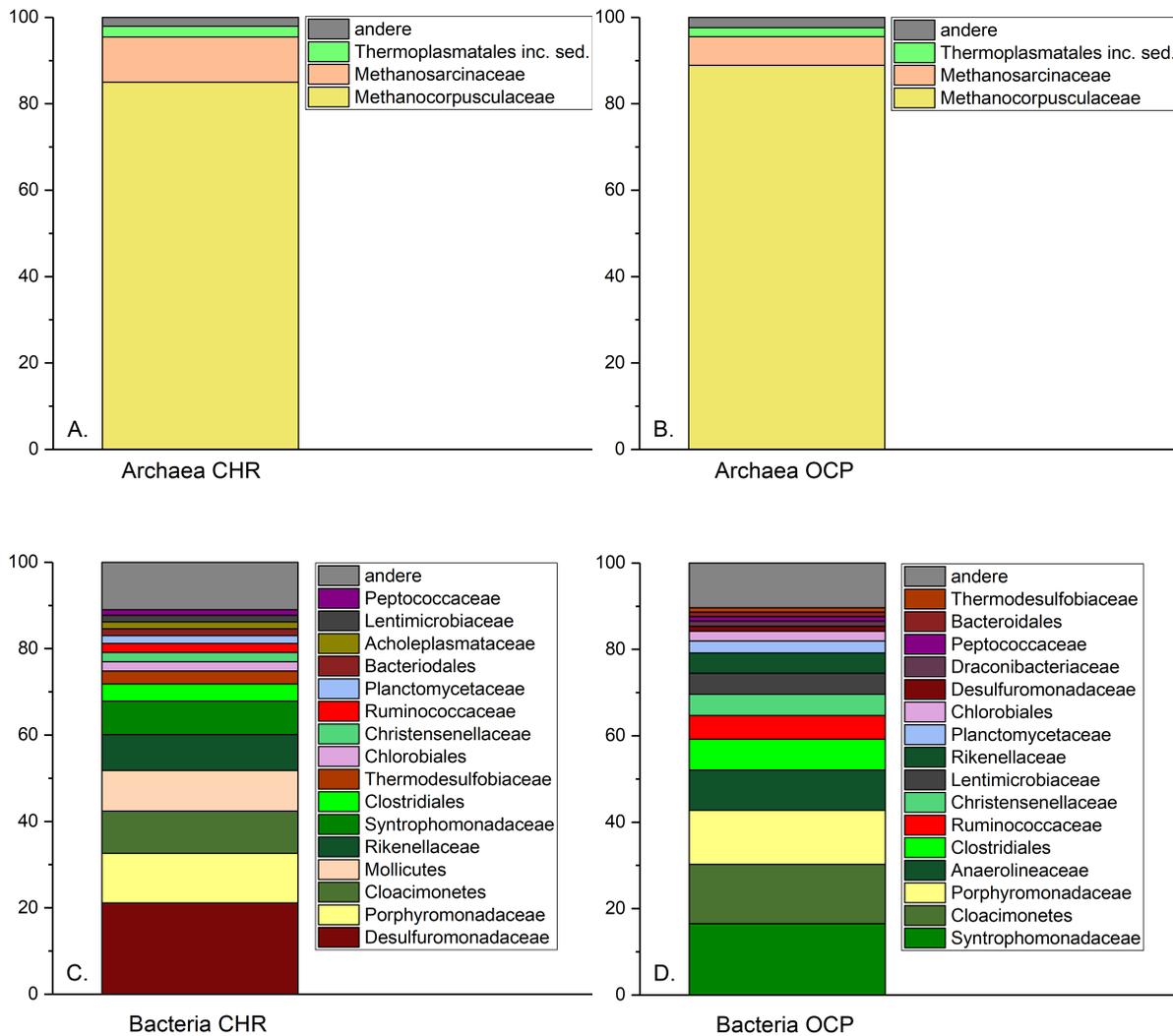


Abbildung 15: Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung des CHR-OCP-Experimentes. **A.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm, CHR-Experiment. **B.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Archaea im Anodenbiofilm, OCP-Experiment. **C.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm, CHR-Experiment. **D.** Verteilung der Familien aus der Domäne der Bacteria im Anodenbiofilm, OCP-Experiment. Für nicht zuzuordnende Familien wurde die Ordnung angegeben.

Zunächst wird die Verteilung für die Domäne der Archaea betrachtet. Für das CHR-Experiment (Abb. 15, A.) zeigt sich eine sehr ähnliche Verteilung wie für das Rep-CHR-Experiment. Den Hauptakteur mit 85 % stellt die Familie Methanocorpusculaceae dar, an zweiter Stelle ist auch hier die Familie Methanosarcinaceae zu finden (10,4 %). Anstelle der beim Rep-CHR vorkommenden Methanobacteriaceae findet sich hier die Gruppe Thermoplasmatales *incertae sedis* (2,5 %), eine unklassifizierte Gruppe aus der Ordnung der Thermoplasmatales. Diese Ordnung ist sehr divers und beinhaltet anaerobe, thermoacidophile, autotrophe oder

heterotrophe Archaea. Ihr gehören drei Familien an (Thermoplasmaceae, Picrophilaceae und Ferroplasmaceae). Thermoplasmatales wurden bereits aus sehr sauren Biotopen, bei verschiedenen Temperaturen (20 °C - 60 °C) isoliert. Organismen dieser Ordnung sind in der Lage, molekularen Schwefel oder Eisen als Elektronenakzeptoren und teilweise Kohlendioxid als C-Quelle zu nutzen (Huber und Stetter, 2006). Für das OCP-Experiment (Abb. 15, B.) ist eine sehr ähnliche Verteilung zu finden.

Weniger ähnlich ist die Verteilung innerhalb der Bacteria. Beim CHR-Experiment stellt die Familie Desulfuromonadaceae die größte Gruppe (21,12 %). Diese konnten für die 16S rRNA-Analyse des Rep-CHR nicht identifiziert werden. Es handelt sich um strikt anaerobe Organismen, die anaerob atmen oder fermentieren können. Sie nutzen hauptsächlich Fettsäuren und Alkohole als Elektronendonator und Schwefel und Eisen-Komplexe als Elektronenakzeptoren (Greene, 2014). Die zweite Gruppe, die Familie Porphyromonadaceae, konnte auch im Rep-CHR-Experiment bereits zugeordnet werden, auch in sehr gut vergleichbaren Anteilen (hier 11,50 %, im Rep-CHR 11,42 %). Als drittgrößte Gruppe (9,80 %) findet sich die Klasse der Cloacimonetes, die aus unkultivierbaren Mitgliedern dieser Gruppe zusammengefasst wurde. Sie konnte im Rep-CHR nur in sehr kleinen Anteilen (0,42 %, nicht gezeigt) nachgewiesen werden. In einem Bioreaktor, der Belebtschlamm aus einer Abwasseranlage aufbereiten soll, wurde diese Gruppe als eines der dominanten Phyla beschrieben (Zheng et al., 2018). Eine weitere Studie schreibt dieser Gruppe ein Aminosäuren-fermentierendes, CO₂- und H₂-produzierendes Bakterium zu, das möglicherweise auch in Syntrophie mit Methanogenen lebt (Stolze, Bremges, Maus, et al., 2018). Die Mollicutes, die hier ebenfalls aus unkultivierbaren Mitgliedern dieser Gruppe zusammengefasst wurden, beinhalten einige der kleinsten selbstständig lebenden Mikroorganismen. Sie besitzen keine Zellwand und ein sehr kleines Genom (Jensen, 2016). Die nächste Gruppe, die Rikenellaceae, wurde auch zuvor gefunden (hier 8,32 %, im Rep-CHR 16,89 %), ebenso wie die darauffolgende Familie Syntrophomonadaceae (hier 7,73 %, im Rep-CHR 12,35 %). Weitere Gruppen, die bereits im Rep-CHR-Experiment auftauchten, sind Christensenellaceae, Ruminococcaceae und Lentimicrobiaceae (2,15 %, 2,07 % und 1,52 %).

Im Vergleich hierzu zeigt der OCP-Versuch eine veränderte Verteilung. Die größte Gruppe ist die Familie Syntrophomonadaceae (16,50 % vs. Rep-CHR 12,35 %). Die Cloacimonetes stellen hier mit 13,72 % die zweitgrößte und die Porphyromonadaceae mit 12,50 % die drittgrößte Gruppe. Die Anaerolineaceae kamen ebenfalls im Rep-CHR vor, waren dort jedoch deutlich stärker vertreten (24,20 % vs. hier 9,36 %). Auch die Gruppen Ruminococcaceae, Christensenellaceae, Lentimicrobiaceae und Rikenellaceae finden sich im Rep-CHR wieder. Insgesamt kann daher eine ähnliche Verteilung festgestellt werden.

4.5 Isolierung von Organismen aus dem Fermentat

Die Isolationsversuche für die im Perkolat befindlichen Organismen wurde sowohl mit festen Medien, als auch mit Flüssigkulturen durchgeführt. Dabei wurde mit unterschiedlichen Medien und teilweise verschiedenen Temperaturen gearbeitet, um eine große Vielfalt an Organismen isolieren zu können. Zur Inokulation wurde Fermentat aus einem laufenden bioelektrochemischen System entnommen. Sowohl für die Platten, als auch für die Flüssigkulturen wurde eine Inokulatmenge von 100 µl verwendet. Die für die Kulturen genutzten Medien werden in Tab. 2-6 dargestellt. Die Reinkulturen wurden als Template in einer PCR mit den 16S rRNA-Primern 43-46 (siehe Tab. 15) eingesetzt und die entstandenen Fragmente aufgereinigt und sequenziert. Anschließend wurde das Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genutzt, um die erhaltenen Sequenzen gegen Datenbanken abzugleichen. Die über BLAST zugeordneten Organismen sind in Tab. 24 zu finden.

Für alle Isolate wurden der Expected Value (E-Value), die Identity und die Query Coverage angegeben. Für alle Isolate wurde ein E-Value von 0,0 und eine Identity von mindestens 95 % erreicht. Die Query Coverage lag für alle Isolate zwischen 99 % und 100 %. Es konnten hauptsächlich Vertreter der Familien Clostridiaceae und Bacillaceae isoliert werden. Diese wurden in den 16S rRNA-Sequenzen des Rep-CHR nicht und des CHR-OCP nur als Ordnung Clostridiales gefunden, die Familie *Bacillaceae* kam jedoch nicht vor. Nur im Metatranskriptom (siehe nächstes Kapitel, 4.6.1) sind diese Familien zu finden. Dabei findet sich die Familie Clostridiaceae sowohl für den Acetat- als auch den Butyrat-Stoffwechsel, die Familie Bacillaceae nur für Enzyme, die mit dem Butyrat-Stoffwechsel assoziiert sind. Im Anschließend werden die über BLAST identifizierten Organismen beschrieben.

Lysinibacillus mangiferahumi ist ein mesophiles, aerobes Bakterium, das befähigt ist, diverse Zucker wie Maltose, Raffinose und Melibiose zu oxidieren. Für den Stoffwechsel mancher Zucker wurde eine Säureproduktion beschrieben (L. L. Yang et al., 2012).

Das verhältnismäßig große Bakterium *Bacillus megaterium* ist bekannt für seine Polyhydroxybutyrat-Produktion (PHB), einem natürlichen Polyester (Lemoigne, Peaud Lenoel und Croson, 1950). Des Weiteren bildet dieses Bakterium Vitamin B₁₂ und Endosporen und nutzt ein weites Spektrum an Kohlenstoffquellen (Vary, 1994; Eppinger et al., 2011). Es konnte zudem auch aus einem Biogasreaktor isoliert werden (Baikar, Rane und Deopurkar, 2017). Das dritte Isolat, zugeordnet dem Bakterium *Tepidimicrobium xylanilyticum*, zeigte eine Identity von 95 %, die niedrigste von allen Isolaten. *Tepidimicrobium xylanilyticum* ist ein strikt anaerobes, proteolytisches Bakterium und nutzt unter Anderem Pepton, Trypton, Casein, Pyruvat, Xylan, Xylose und Cellobiose als Kohlenstoffquelle. Dabei produziert es Acetat, Ethanol, Wasserstoff und CO₂ und bei Wachstum auf Xylan auch Propionat. Zudem wurde beschrieben, dass es Eisen(III)-Citrat reduziert (Niu et al., 2009), was für die Befähigung zur externen Elektronenübertragung spricht.

Tabelle 24: Organismen, die aus Fermentat isoliert werden konnten. Gegeben sind die Parameter der BLAST-Suche (Query Coverage, E-Value und Identity) sowie die Wachstumsparameter, mit denen die Organismen isoliert wurden (Medium, Temperatur, Stoffwechsel im Bezug auf Sauerstoff, Kultivierung).

Familie	Art	Query Coverage [%]	E-Value [%]	Identity [%]	Medium	Temp. [°C]	Stoffwechsel	Kultur
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus mangiferahumi</i>	99	0,0	99	LB	30	aerob	Agarplatte
Bacillaceae	<i>Bacillus megaterium</i>	99	0,0	99	LB	30	aerob	Agarplatte
Clostridiaceae	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	100	0,0	95	DM630	60	anaerob	Agarplatte
Planococcaceae	<i>Ureibacillus suwonensis</i>	99	0,0	97	R2A	60	anaerob	Agarplatte
Symbiobacteriaceae	<i>Symbiobacterium ostreiconchae</i>	99	0,0	99	Geobacter	60	anaerob	Flüssig
Bacillaceae	<i>Bacillus smithii</i>	100	0,0	99	R2A	60	anaerob	Agarplatte
Clostridiaceae	<i>Thermobrachium celere</i>	100	0,0	99	LB/Eisencitrat	60	anaerob	Flüssig
Clostridiaceae	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	100	0,0	99	LB/Eisencitrat	60	anaerob	Flüssig

Das einzige Bakterium, dessen Familie Planococcaceae weder in den anderen 16S rRNA-Analysen, noch in der Metatranskriptomanalyse gefunden werden konnte, ist *Ureibacillus suwonensis*. Es wurde unter anaeroben Bedingungen isoliert, ist in der Literatur jedoch als aerob beschrieben. Es produziert Säuren mit den Substraten Glucose, Arabinose, Xylose, Mannitol und Aesculin, Stärke, Casein, Gelatine und Harnstoff und wurde aus einem Baumwollkompost isoliert (B. Y. Kim et al., 2006).

Die Familie Symbiobacteriaceae, zu der *Symbiobacterium ostreiconchae* gehört, wurde im Metatranskriptom für das Enzym Butyrat Kinase gefunden. Der Organismus ist moderat anaerob, thermophil und chemo-organotroph. Er verstoffwechselt Trypton und Hefeextrakt zu Acetat, Succinat, Isovalerat und in kleinen Mengen auch Propionat (Ueda et al., 2014). Das dritte, hier gefundene Mitglied der Bacillaceae ist *Bacillus smithii*, ist fakultativ anaerob, chemoorganotroph und in der Lage, diverse Zucker aus Lignocellulose-Rohstoffen zu verwerten. Es bildet Säuren aus D-Fructose, D-Glucose und Trehalose und fermentiert unter anderem Maltose und Rhamnose und nutzt zudem auch Propionat (Nakamura, Blumenstock und Claus, 2009).

Der ebenfalls aus der Familie Clostridiaceae stammende Organismus *Thermobrachium celere* zeigt ein weites Temperaturspektrum von 37°C bis 75°C. Er verwertet Glucose, Sucrose, Fructose, Galactose und Maltose in Anwesenheit von Hefeextrakt und fermentiert Glucose zu CO₂, Wasserstoff, Acetat, Formiat und Ethanol (Engle et al., 2009).

Der letzte Vertreter der Clostridiaceae, *Caloramator proteoclasticus*, lebt strikt anaerob und chemoorganotroph, bei Temperaturen von 30°C bis 68°C. Dieses Bakterium fermentiert Casein, Gelatine, Pepton und Aminosäuren zu Acetat, Propionat, Butyrat und Formiat und Wasserstoff, und verwertet außerdem Zucker wie Glucose, Fructose, Mannose, Cellobiose, und auch Stärke und Pyruvat. Isoliert wurde der Stamm aus einem anaeroben Reaktor, in dem Weizen fermentiert. (Tarlara et al., 2009).

4.6 Metatranskriptomanalyse

4.6.1 Metatranskriptom des Rep-CHR

Um ein genaueres Bild der Stoffwechselaktivitäten im System zu bekommen, wurde eine Metatranskriptomanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die totale RNA aus dem Biofilm auf der Anode isoliert. Die Illumina RNA TruSeq Sequenzierung (paired-end, 2 x 150 bp) erfolgte bei IMG. Um eine Vorstellung der Einzelprozesse zu erlangen, wurden die Reads der Sequenzierung betrachtet, die bestimmten Enzymen zugeordnet werden konnten. Daher wurden die Acetat Kinase, Phosphat-Acetyltransferase und Acetyl-CoA Synthetase für den Acetat-Abbau betrachtet, während für den Butyrat-Abbau die Enzyme Butyrat Kinase und Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase herangezogen wurden. Für potentielle exoelektrogene Mikroorganismen wurden Transkripte, die c-Typ Cytochromen zugeordnet wurden, untersucht. Die Ergebnisse sind Abb. 17 zu entnehmen.

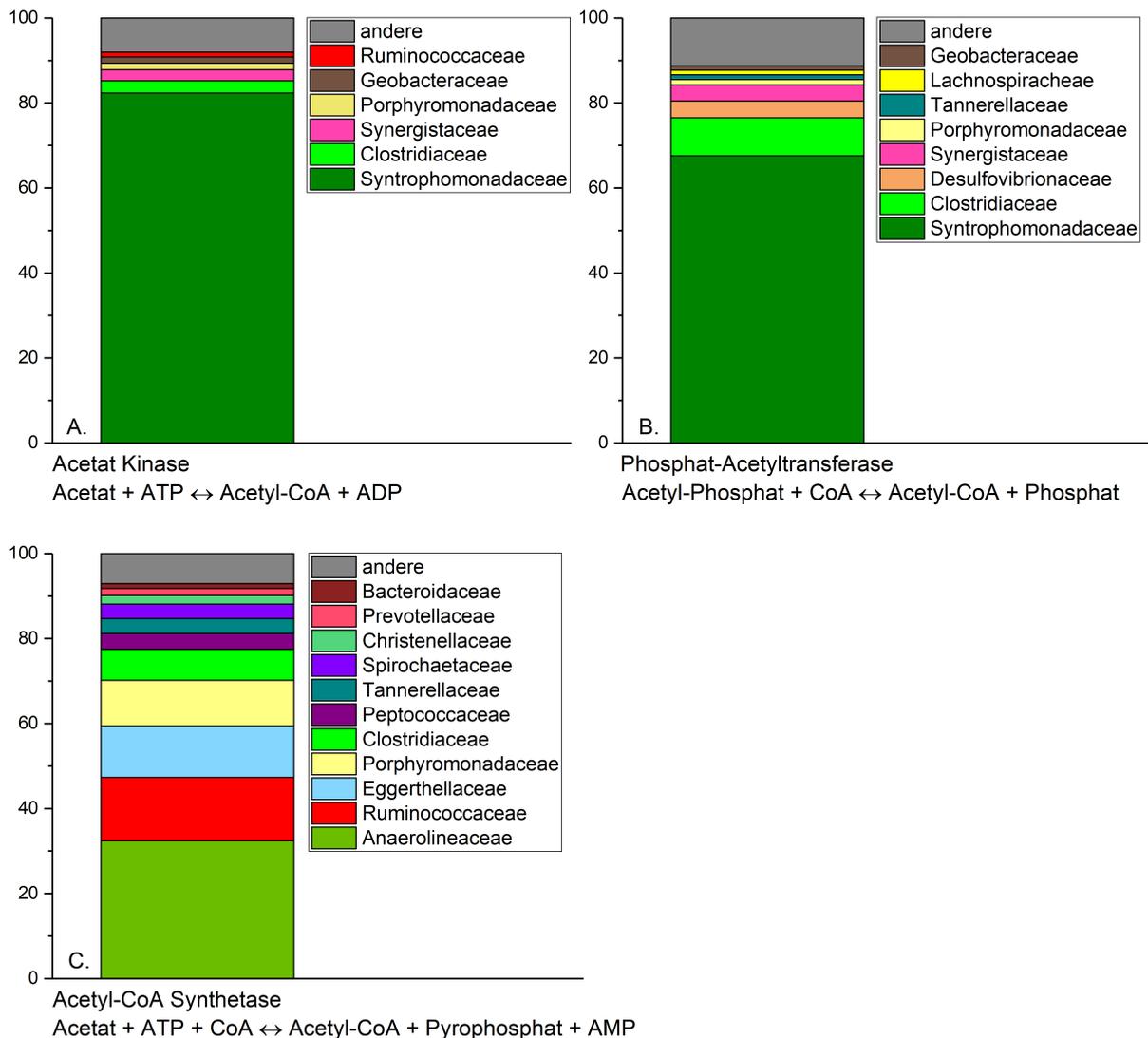


Abbildung 16: Ergebnisse der Metatranskriptomanalyse, Acetatabbau. **A.** Verteilung für das Enzym Acetat Kinase. **B.** Verteilung für das Enzym Phosphat-Acetyltransferase. **C.** Verteilung für das Enzym Acetyl-CoA Synthetase.

Auch für das Metatranskriptom wurden die Reads mit Familien sowohl aus der Domäne der Archaea, als auch der Domäne der Bacteria verglichen. Nur für die drei Enzyme, die Acetat umsetzen, konnte eine Übereinstimmung mit einer Familie aus der Domäne der Archaea gefunden werden. Es gibt zwei Wege des Acetat-Katabolismus: der erste wird zu Beginn durch die beiden Enzyme Acetat Kinase und Phosphat-Acetyltransferase katalysiert, während der andere mit der Aktivität der Acetyl-CoA Synthetase startet (Dimou et al., 2011). 77,84 % der Reads für die Acetat Kinase konnten der Familie Methanosarcinaceae zugeordnet werden, dies ist jedoch die einzige Familie der Archaea, für die dieses Enzym gefunden werden konnte. Die verbleibenden 22,16 % wurden bakteriellen Familien zugeschrieben. Die entsprechende Verteilung geht aus Teil A. in Abb. 17 hervor. 82,36 % der Reads konnten hier der Familie Syntrophomonadaceae zugewiesen werden.

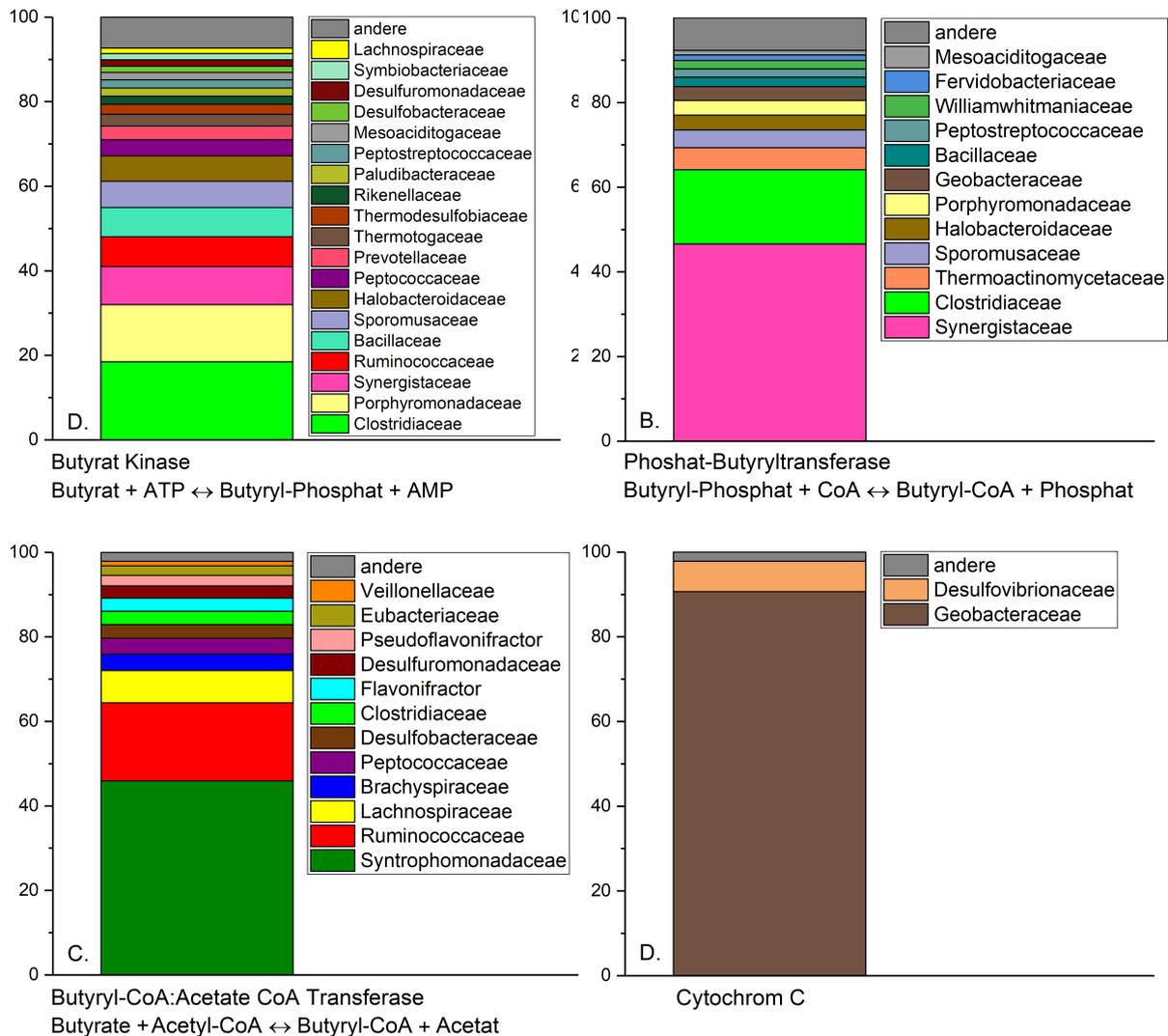


Abbildung 17: Ergebnisse der Metatranskriptomanalyse, Butyratabbau und Elektronentransfer. **A.** Verteilung für das Enzym Butyrat Kinase. **B.** Verteilung für das Enzym Phosphat-Butyryltransferase. **C.** Verteilung für das Enzym Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase. **D.** Verteilung für das Enzym Cytochrom C.

Auch für die Phosphat-Acetyltransferase (vgl. Abb. 17, Teil B.) ergibt sich ein ähnliches Bild. 83,48 % der Reads wurden in der Familie der Methanosarcinaceae wiedergefunden, 16,52 % in bakteriellen Familien. Bei den Bakterien ist der Hauptakteur ebenfalls die Familie der Syntrophomonadaceae (67,60 %). Es ist bekannt, dass die beiden Enzyme reversible, aufeinanderfolgende Reaktionen katalysieren (Anthony und Spector, 1971; Dimou et al., 2011). Die Mitglieder der genannten Familie wurden, wie bereits erwähnt, als Butyrat-Oxidierer beschrieben, die Acetat produzieren (McInerney et al., 1981). Daher ist bei dieser Familie davon auszugehen, dass diese beiden Enzyme eher die Rückreaktion zu Acetat hin katalysieren.

Für die Acetyl-CoA Synthetase wurden 52,44 % der Reads Familien aus der Domäne

der Archaea zugeordnet. Hiervon sind 95,78 % auch der Familie Methanosarcinaceae zuzuschreiben. 47,56 % der Reads für dieses Enzym ließen sich demnach bei Bakterien finden. Hier ist die Hauptgruppe (32,40 %) die der Anaerolineaceae, die auch schon in der 16S rRNA-Analyse als stärkste Gruppe aufgetreten sind. Wie bereits beschrieben, bauen diese Organismen Cellulose ab und produzieren unter anderem Acetat, das sie beispielsweise acetoklastischen Methanogenen zur Verfügung stellen (Liang et al., 2015). Daher scheint auch die hier gefundene Acetyl-CoA Synthetase eher die Reaktion zu Acetat zu katalysieren statt dessen Abbau. Die drittgrößte Gruppe, die Familie Eggerthellaceae sind asaccharolytische Bakterien, die ebenfalls häufig im Verdauungstrakt gefunden werden. Mitglieder dieser Familie wurden beschrieben als Produzenten von Urolithinen, die sie aus Ellagitanninen oder Ellagsäure herstellen. Ellagitanninen oder Ellagsäure kommt in vielen Früchten und Gemüsesorten vor (Selma et al., 2017). Die weiteren gefundenen Gruppen, Ruminococcaceae (14,90 %) und Porphyromonadaceae (10,80 %) sind als Acetatproduzierende Organismen bekannt (Chassard et al., 2012; Barelli et al., 2015; Sakamoto, 2014). Das Enzym Butyrat Kinase, das ebenfalls eine reversible Reaktion von Butyrat zu Butyryl-Phosphat vollziehen kann, zeigt sich in der Verteilung der Reads sehr divers. Es wurden nur bakterielle Familien gefunden, mit den Clostridiaceae als größte Gruppe (18,45 %). Verschiedene Studien zeigten, dass diese Familie, zusammen mit Familien wie Prevotellaceae (auch hier mit 3,22 % vertreten), Ruminococcaceae (hier 7,08 %) und Lachnospiraceae (hier 1,29 %) für Butyrat-Produktion verantwortlich sind (Esquivel-Elizondo et al., 2017; Vital, Howe und Tiedje, 2014; Scott et al., 2014). Die drittgrößte Gruppe (9,01 %) stellt die Familie der Synergistaceae, für die postuliert wurde, dass sie organische Säuren fermentieren und H₂ und CO₂ produzieren, die von Methanogenen genutzt werden können (Lv et al., 2019; Meng et al., 2017). Für das Enzym Phosphat-Butyryltransferase stellen ebenfalls Synergistaceae (46,61 %) und Clostridiaceae (17,51 %) die zwei größten Gruppen. Auch interessant zeigt sich die Verteilung für das Enzym Butyryl-CoA:Acetat CoA-Transferase. Wie bereits für die Acetat Kinase und die Phosphat-Acetyltransferase wird die größte Gruppe, hier fast die Hälfte der Reads, durch die Familie Syntrophomonadaceae gestellt (45,90 %). Dies ist nicht verwunderlich, da diese Familie, wie oben beschrieben, als die klassischen syntrophen Butyrat-Oxidierer bekannt sind. Die beiden nächsten Gruppen wurden bereits für die Butyrat Kinase genannt: Ruminococcaceae (hier 18,54 %) und Lachnospiraceae (7,63 %). Da diese Butyrat-Produzenten sind, liegt auch hier die umgekehrte Reaktion (von Butyryl-Phosphat zu Butyrat) nahe.

Das letzte Gruppe der betrachteten Protein sind die *c*-Typ Cytochrome. Die Gruppe der *c*-Typ Cytochrome ist wichtig für den Elektronentransfer, da diese Proteine eine Verbindung vom Cytoplasma zur Außenumgebung der Zelle herstellen (Estevez-Canales et al., 2015). Hier zeigt sich eine überraschende Verteilung. Mit 90,65 % wurden die Reads der Familie Geobacteraceae zugeordnet. Dies ist nachvollziehbar im Bezug auf externen Elektronentransfer, da dieser Organismus hierfür bekannt ist. Diese Familie wurde jedoch bei keinem

anderen Enzym als eine der Hauptgruppen identifiziert. Alle Mitglieder der Geobacteraceae nutzen Acetat als Substrat (Röling, 2014). In der hier gezeigten Verteilung wurde die Familie für Reads der Acetat Kinase mit 1,5 %, sowie der Phosphat-Acetyltransferase mit 1,0 % gefunden. Als zweite Gruppe wurde außerdem die Familie Desulfovibrionaceae identifiziert (7,19 %).

4.7 Coulomb'sche Effizienz

4.7.1 Coulomb'sche Effizienz des Rep-CHR

Um zu bestimmen, wieviele Elektronen aus dem verfügbaren Substrat tatsächlich auf die Anode fließen, wurde die Coulomb'sche Effizienz bestimmt. Diese gibt das Verhältnis zwischen verfügbaren Elektronen und den über den Potentiostaten auf der Anode gemessenen Elektronen an. Da nicht nur die organischen Säuren als Substrat genutzt werden könnten, wurde der TOC zur Berechnung herangezogen. In Abb. 18 ist die Coulomb'sche Effizienz für alle Läufe dargestellt.

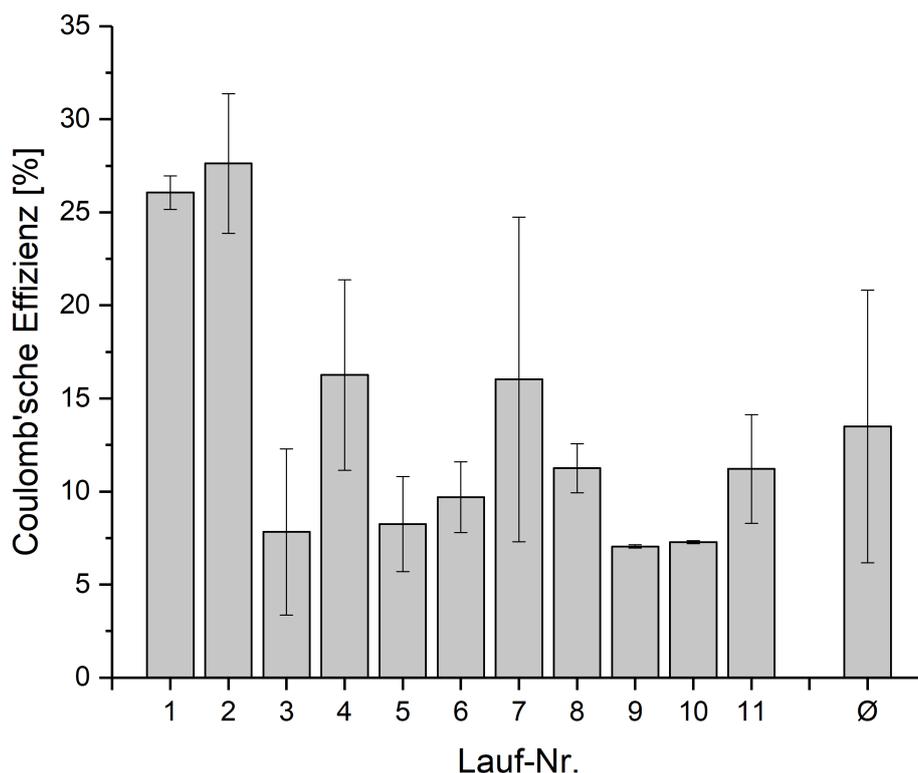


Abbildung 18: Coulomb'sche Effizienzen [in %] für alle Experimentläufe, sowie der Durchschnitt [Ø] der Coulomb'schen Effizienzen aller Läufe.

Die Werte unterscheiden sich zwischen den einzelnen Läufen stark. So wurde eine Coulomb'sche Effizienz zwischen 7,05 % (Nr. 9) und 27,62 % (Nr. 2) erreicht. Im Schnitt lag sie bei 13,5 %. Es wurde bereits beschrieben, dass Methanogenese eine Verlustmöglichkeit

für Elektronen in einem bioelektrochemischen System sein kann (Freguia et al., 2007). Da sowohl in der 16S rRNA- als auch in der Transkriptomanalyse gezeigt wurde, dass methanogene Organismen vorhanden sind, wurde diese Möglichkeit in Betracht gezogen. Daher wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um zu untersuchen, ob Elektronen an die Methanogenese verloren gehen.

4.7.2 Inhibierung der Methanogenese und Coulomb'sche Effizienz

In diesem Versuch wurden wie zuvor bioelektrochemische Systeme mit Gemüsefermentat gestartet. Nach ca. 7 Tagen wurde der Inhibitor 2-Bromoethansulfonat zugegeben. Dieser Inhibitor stellt ein Analog des Coenzym M der Methanogenen dar, dem Methylträger im letzten reduktiven Schritt der Methanogenese (Sparling und Daniels, 1987). Damit wird der Prozess im letzten Schritt unterbrochen und das Wachstum gehemmt.

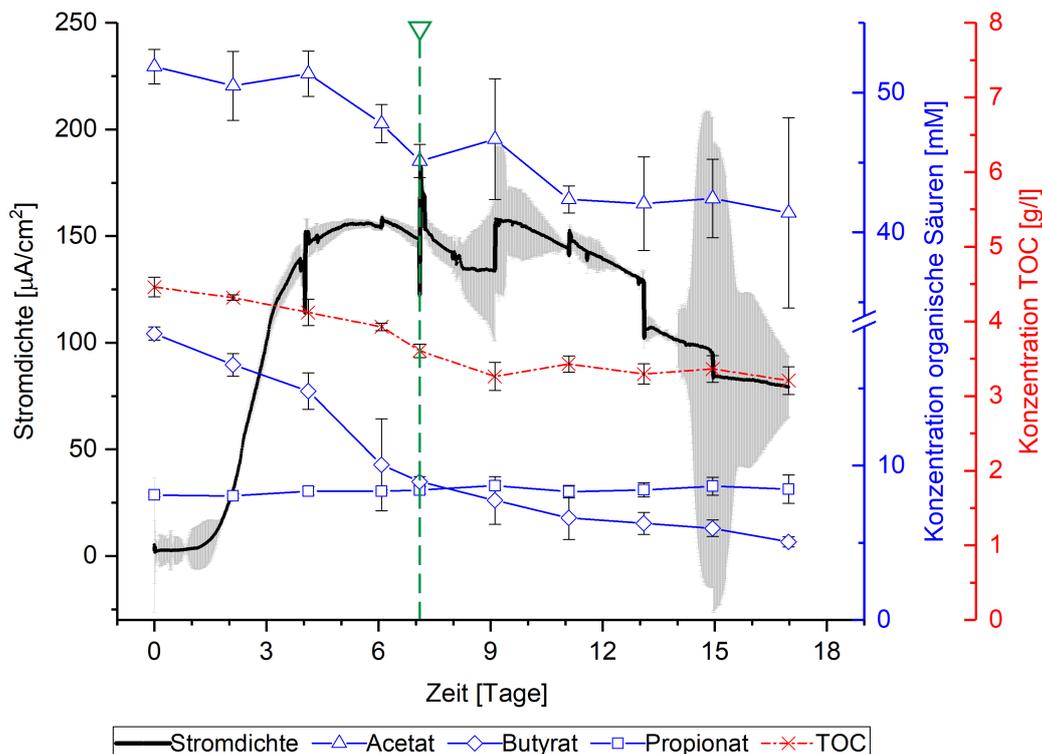


Abbildung 19: Stromdichtenentwicklung im bioelektrochemischen System, Experimentlauf mit Zugabe von 2-Bromoethansulfonat. Stromdichte in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, gegeben über die Zeit in Tagen. Der graue Bereich gibt die Standardabweichung wieder. In blau sind die Konzentrationen der organischen Säuren [mM] und in rot die Konzentrationen des TOC [g/l] aufgezeigt. Die Zugabe des Inhibitors nach 7,1 Tagen ist markiert durch den grünen gestrichelten Pfeil.

Um die Methanogenese zu unterbrechen, wurde eine Konzentration von 50 mM 2-Bromoethansulfonat gewählt, da Zinder, Anguish und Cardwell (1984) zeigen konnten, dass diese Konzentration nötig ist, um die Methanogenese in einem anaeroben Fermenter komplett

zu inhibieren. Nach der Zugabe des Inhibitors lief das Experiment noch weitere 10 Tage. Wie zuvor wurden über den Zeitverlauf die Konzentrationen der organischen Säuren sowie des TOC gemessen. Über die Strommessung wurde zudem auch hier die Coulomb'sche Effizienz berechnet. In Abb. 19 ist der Strom- sowie der Konzentrationsverlauf entsprechend aufgezeigt, in Abb. 20 die Coulomb'sche Effizienz, betrachtet für verschiedene Substrate.

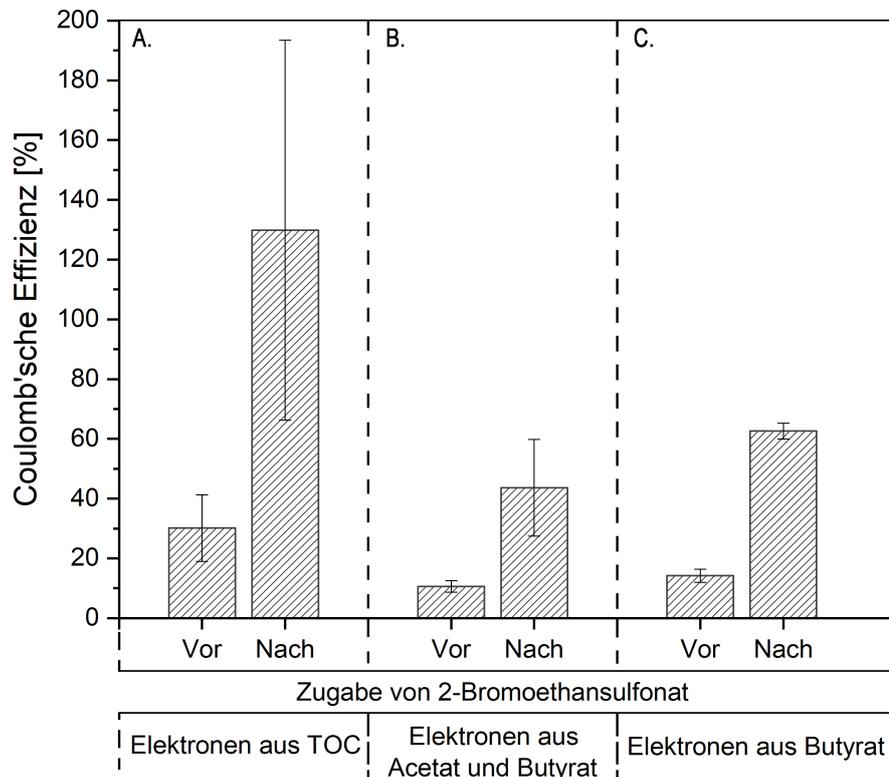


Abbildung 20: Coulomb'sche Effizienzen (CE) [in %], berechnet vor und nach Zugabe des Inhibitors 2-Bromoethansulfonat. Die CE wurde wie in 4.7.1 beschrieben berechnet. In **A.** ist die CE, berechnet aus den Elektronen aus dem TOC gezeigt. In **B.** findet sich die CE, berechnet aus den Elektronen aus Acetat und Butyrat, und in **C.** die CE, berechnet aus Butyrat.

Aus Abb. 19 geht hervor, dass bis zur Zugabe des Inhibitors an Tag 7 bereits Acetat und Butyrat abgebaut wurde, während wie zuvor auch, Propionat in gleicher Konzentration vorhanden blieb. Nach Zugabe des Inhibitors war zwar weiterhin eine Abnahme von Acetat und Butyrat zu verzeichnen, diese war jedoch deutlich geringer als bei den zuvor durchgeführten Experimenten. So wurden über den gesamten Zeitverlauf von ca. 17 Tagen nur 20,18 % des verfügbaren Acetats und 72,73 % des verfügbaren Butyrats abgebaut. Auch der TOC nahm im Versuch zunächst ab, stabilisierte sich nach Zugabe des Inhibitors jedoch auf ein stetes Niveau. Es wurden über das Experiment hinweg daher nur 28,10 % des TOC abgebaut. Propionat blieb über das gesamte Experiment stabil und wurde in geringem Maße sogar produziert. Ein Stromfluss konnte nach, sowie auch vor der Inhibitorzugabe gemessen werden, zudem konnte kein Einbruch des Stromflusses nach der Zugabe des Inhibitors verzeichnet werden. Insgesamt lag die maximale Stromdichte mit etwa $158,74 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nied-

riger als die gemittelte maximale Stromdichte im Rep-CHR ($190,83 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), bewegt sich abber dennoch im Rahmen dessen, was über einige Läufe hinweg als maximale Stromdichte gemessen wurde (vgl. Tab. 20, Lauf Nr. 3, 5, 7). Abb. 20 verdeutlicht, dass die Coulomb'sche Effizienz nach Inhibitorzugabe um ein Vielfaches höher liegt als vor Zugabe des Inhibitors, unabhängig davon, welches Substrat betrachtet wird. So konnte für die Berechnung aus den Elektronen des TOC eine Steigerung um das 4,3-Fache erreicht werden, während sich für die Berechnung aus den Elektronen von Acetat und Butyrat eine Steigerung um das 4,1-Fache, und aus Elektronen von Butyrat um das 4,4-Fache ergab.

4.8 Ankonzentrierung des Effluenten durch Nanofiltration

Da das Fermentat sehr viele, auch feine Schwebstoffe enthält, sollte es filtriert werden, um ein klares Medium für die bakteriellen Produktionsstämme zu erhalten. Da der Filtrationsprozess mit einer sogenannten Dead-End-Filtration nicht möglich war, wurde auf ein anderes Filtrationsverfahren zurückgegriffen. Eine Dead-End-Filtration beschreibt einen Filtrationsprozess, bei dem der einzige Auslass für das Filtriergut auf der anderen Seite der Filtrationsmembran liegt (Koros, Ma und Shimidzu, 1996). Daher muss das Filtriergut durch die Membran gelangen, um den Filter zu verlassen, und auch enthaltene Schwebstoffe werden auf bzw. in die Poren der Membran gedrückt, was zu deren Verstopfung und so zum Erliegen des Filtrationsprozesses führen kann. Daher wurde für diese Arbeit eine Crossflow-Filtration gewählt. Hierbei ist der Fluss des Filtrierguts nicht auf die Membran selbst gerichtet, sondern parallel entlang der Membran. Schwebstoffe oder Partikel werden also nicht auf die Filtrationsmembran gepresst und können sich daher nicht in die Poren setzen. Um den Prozess dennoch zu vereinfachen und das Risiko eines Zusetzens der Membranporen zu verhindern, wurde das Fermentat zunächst zentrifugiert und das entstandene Pellet aus Feststoffen verworfen. Diese Vorbereitungen wurden getroffen, um im Anschluss an das bioelektrochemische System eine Ankonzentrierung des enthaltenen Propionats zu erreichen. Hierfür sollte eine Nanofiltration durchgeführt werden. Da diese jedoch in einer Rührzelle unter Nutzung einer Dead-End-Filtration durchgeführt werden musste, war der vorherige Schritt der Crossflow-Filtration vorbereitend nötig zur Entfernung von Schwebstoffen. Bei der Nanofiltration werden sehr dichte Membranen verwendet, wodurch das Zurückhalten von Stoffen erreicht werden kann. Es wurden zwei verschiedene Nanofiltrationsmembranen aus Polyamid getestet (NF90 und NF270). Es wurde gezeigt, dass die NF90-Membran eine Porengröße von $0,55 \text{ nm} \pm 0,126 \text{ nm}$, und die NF270-Membran eine Porengrößenverteilung von $0,47 - 0,99 \text{ nm}$ ($\varnothing = 0,71 \text{ nm} \pm 0,14 \text{ nm}$) aufweist (Hilal et al., 2005). Auch der Hersteller gibt die NF90-Membran als dichtere Membran an, sie soll eine Demineralisierung von Wasser bewirken, während durch die NF270 keine bis wenig Demineralisierung erreicht wird. So ist für die NF90-Membran eine NaCl-Zurückhaltung von 90-96 %, für die NF270 jedoch nur von 50 % angegeben. Die Nanofiltration wurde in einer 350 ml Rührzelle unter

Druck durch Stickstoffgas durchgeführt (4 - 4,5 bar). In Tab. 25 sind die Ergebnisse der Nanofiltrationen gezeigt. Es wird deutlich, dass mit dem hier verwendeten Fermentat und beiden Membranen die Filtration erfolgreich war. Die Filtration wurde durchgeführt, bis die Hälfte des Volumens abfiltriert war. Für die NF90-Membran waren im Ausgangsfermentat 10,5 mM Propionat messbar, während für die Filtration mit der NF270-Membran eine andere Charge Fermentat mit einer Ausgangskonzentration von 7,7 mM Propionat verwendet wurde. Nach der Filtration war im Überstand über der NF90-Membran eine Konzentration von 17,8 mM Propionat zu messen, während die Endkonzentration im Überstand der NF270-Membran 15,3 mM betrug. Das enthaltene Propionat konnte daher mit der NF90-Membran um den Faktor 1,7 ankonzentriert werden, während es durch die NF270-Membran um das 1,99-Fache ankonzentriert wurde. Damit konnte mithilfe der NF270-Membran für dieses Fermentat eine etwa 14,5 % höhere Ankonzentrierung erreicht werden als mit der dichteren Membran NF90.

Tabelle 25: Ergebnisse des Nanofiltrationsprozesses. Untersucht wurden die beiden Membranen NF90 und NF270, beide mit einem durch das bioelektrochemische System und durch Crossflow Filtration vorbehandelten Fermentat. Gegeben sind Volumen in der Rührzelle zu Beginn sowie zum Ende des Experiments und die darin gemessene Konzentration an Propionat. Die letzte Spalte gibt den Faktor an, um den das zu Beginn gemessene Propionat ankonzentriert wurde.

Membran	Volumen [ml]		Propionat [mM]			Faktor
	Start	Ende	Fermentat	Überstand	Filtrat	
Filmtec™ NF90	200	100	10,54	17,76	0,104	1,7
Filmtec™ NF270	200	100	7,74	15,35	1,96	1,99

4.9 Produktion von Plattformchemikalien

4.9.1 Produktion von Acetoin

Für die Produktion von Acetoin wurden Zellsuspensionsassays durchgeführt. Im ersten Versuch wurde hierfür ein *E. coli* K-12 Stamm verwendet, der eine Deletion des Gens *rnr* trägt. Es wurde gezeigt, dass das entsprechende Enzym RNase R einen Einfluss auf das *prp*-Operon nimmt, und dessen Deletion den Propionat-Abbau unter anaeroben Bedingungen beschleunigt (Simonte et al., 2017). Diese Vermutung wurde auch hier mit einem Wachstumsversuch bestätigt. Die Abb. 21 zeigt die Wachstumskurve des Stammes im Vergleich zum Wildtyp und einer weiteren Mutante, die zusätzlich eine zweite Deletion ($\Delta scpC$) trägt. Das Gen *scpC* kodiert für eine Propionyl-CoA:Succinat-CoA-Transferase, die die CoA-Gruppe von Propionyl-CoA auf Succinat überträgt. Das resultierende Succinyl-CoA stellt ein Intermediat des Citratzyklus dar und kann dort auch wieder einfließen. Die Literatur

zeigt, dass ein Knockout von *scpC* zu einer höheren Verfügbarkeit von Propionyl-CoA führt, hier genutzt für die Produktion von Poly(3-Hydroxybutyrat-Co-3-Hydroxyvalerat) (PHBV) (Q. Chen et al., 2011; J. E. Yang et al., 2014). Daher wurde auch für diese Arbeit die Hypothese postuliert, dass der Knockout von *scpC* einen positiven Effekt auf den 2-Methylcitratzyklus nehmen kann, da kein Propionyl-CoA in Richtung Succinyl-CoA verloren gehen kann. Die Wachstumskurve wurde in Minimalmedium mit Propionat als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt.

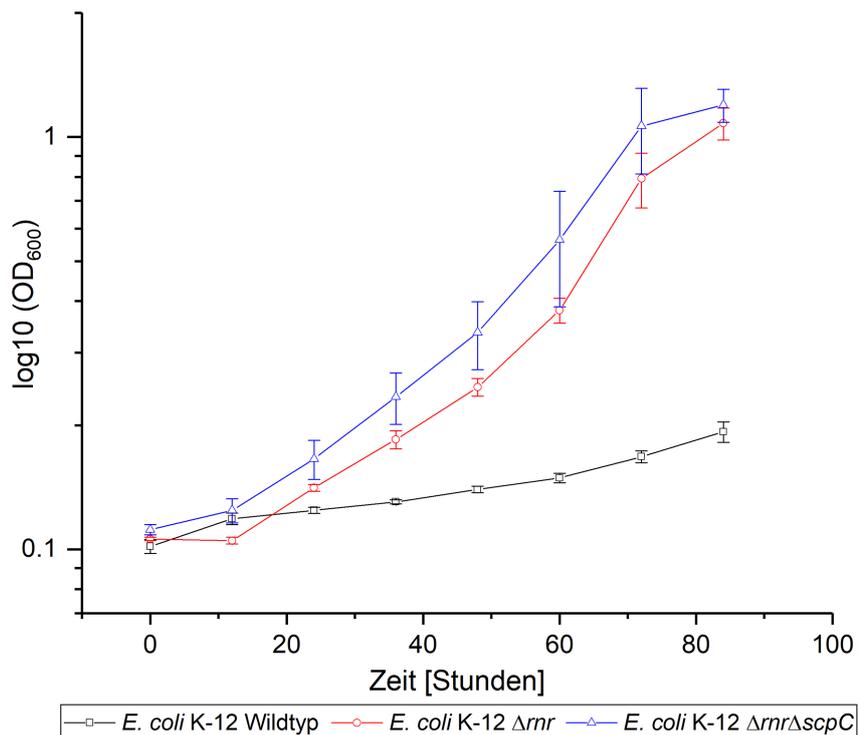


Abbildung 21: Wachstumskurve der Stämme *E. coli* K-12 Wildtyp, *E. coli* K-12 Δrnr und *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ in M9-Minimalmedium mit 30 mM Propionat als einziger Kohlenstoffquelle.

Zusätzlich wurde eine Wachstumskurve mit dem *E. coli* K-12 Δrnr Stamm durchgeführt, der ein Plasmid für die Acetoin-Produktion trägt (pMAL_alsS_alsD), und bei der als Medium steriles, gepuffertes Fermentat als einzige Kohlenstoff- und Elektronenquelle angeboten wurde (siehe Abb. 22).

Im ersten Wachstumsversuch wird deutlich, dass die Deletionsmutante Δrnr auch unter aeroben Bedingungen deutlich schneller wächst als der Wildtyp. Sie wies eine maximale Verdopplungszeit von 42,65 Stunden auf, während der Wildtyp 153,14 Stunden brauchte, um sich zu verdoppeln. Es wurde bereits in vorherigen Studien gezeigt, dass *E. coli* eine vier- bis siebentägige Verzögerungsphase benötigt, um sich an Propionat als einzige Kohlenstoff- und Elektronenquelle anzupassen (Textor et al., 1997). Zudem wurde gezeigt, dass die Doppelmutante *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ eine noch niedrigere Verdopplungszeit zeigt als die Einfachmutante (25,13 Stunden). In dieser Wachstumskurve konnte für die Δrnr Mutante

ein 3,59-Mal und für die $\Delta rnr\Delta scpC$ Mutante ein 6,09-Mal so schnelles Wachstum wie das des Wildtyps erreicht werden.

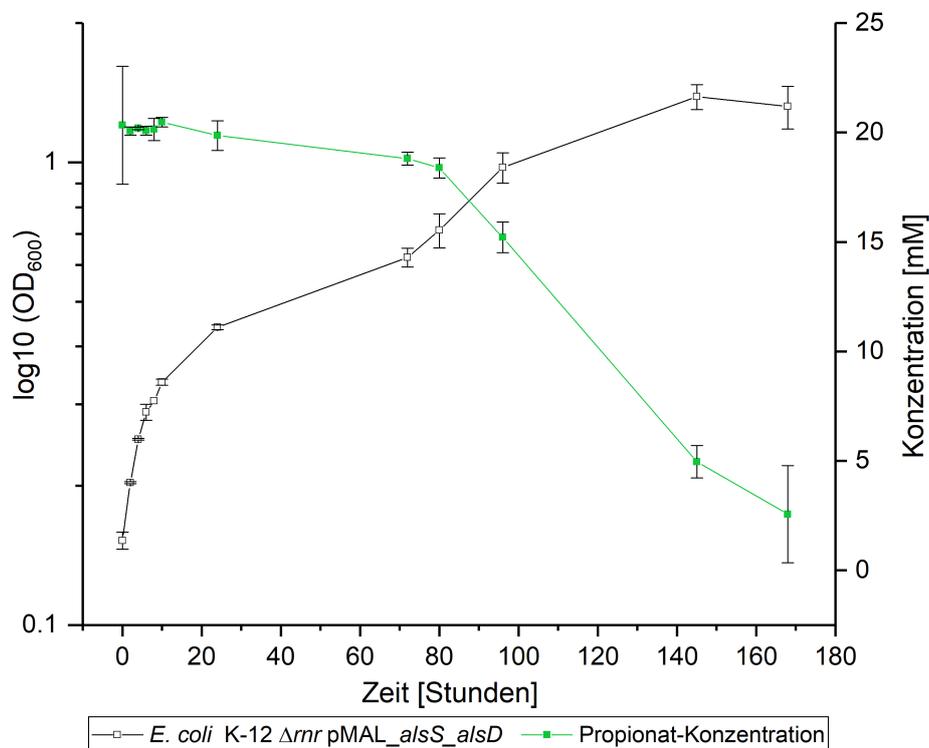


Abbildung 22: Wachstumskurve des Stamms *E. coli* K-12 Δrnr in sterilem Fermentat, das 20 mM Propionat enthielt. Vor dem Autoklavieren wurde dem Fermentat 50 mM HEPES zugegeben und der pH auf 7 eingestellt.

Die zweite Wachstumskurve zeigt, dass die Einfachmutante mit dem Plasmid in dem angebotenen Fermentat wachsen kann. Der Stamm erreichte eine Verdopplungszeit von 6,52 Stunden, was im Vergleich zu der vorherigen Wachstumskurve etwa 2,46-Mal schneller ist. Er verbrauchte dabei 87,5 % des angebotenen Propionats (20,3 mM) in 168 Stunden.

Um zu überprüfen, ob auch andere Stämme im Fermentat wachsen können, wurden zudem zwei weitere Wachstumskurven durchgeführt. Hierfür wurde der Stamm *S. oneidensis* $\Delta \lambda \Delta ack \Delta pta$ verwendet. Die Deletion des λ -Phagen im Genom führte in einem anderen Projekt zu erhöhter Stromproduktion in einem bioelektrochemischen System (Bursac, Gralnick und Gescher, 2017), ist für diese Arbeit jedoch zu vernachlässigen. Des Weiteren wurde der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC®13032™ genutzt. Für beide Stämme ist die Wachstumskurve in Abb. 23 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das Fermentat auch für andere Stämme für das Wachstum dienen kann. Dabei wächst *C. glutamicum* mit dem Fermentat auf eine höhere OD₆₀₀ an als der *S. oneidensis*-Stamm. Er zeigte jedoch eine etwas höhere Verdopplungszeit (2,10 Stunden) als der *S. oneidensis*-Stamm (1,61 Stunden).

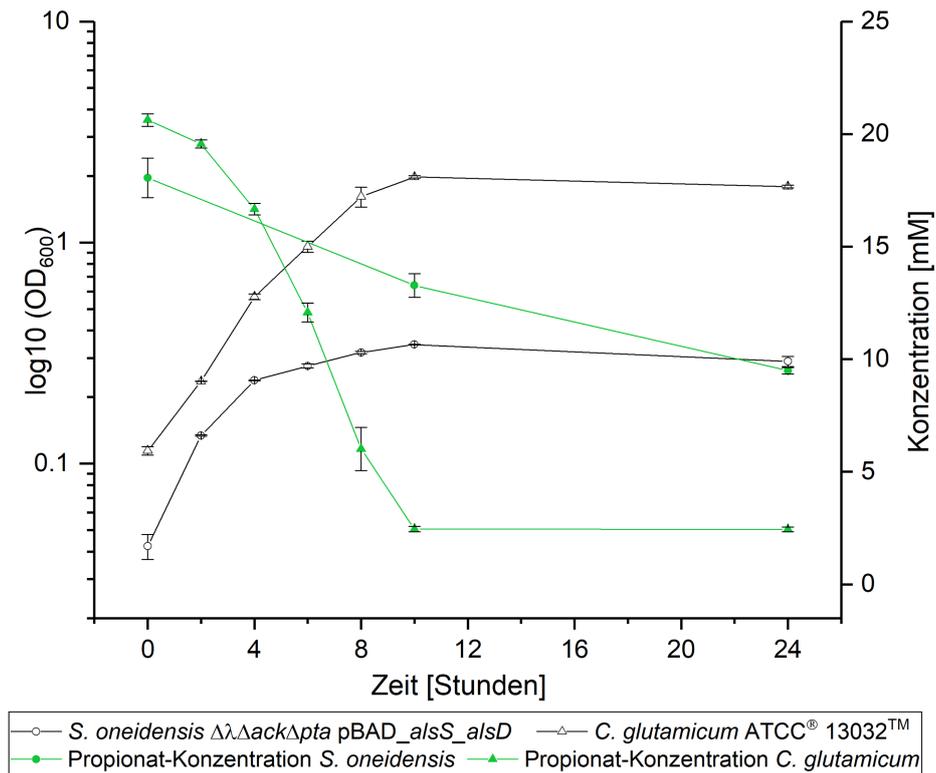


Abbildung 23: Wachstumskurve der Stämme *S. oneidensis* $\Delta \lambda \Delta ack \Delta pta$ mit dem Plasmid pBAD_alsS_alsD und *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032TM) in sterilem Fermentat, das ca. 20 mM Propionat enthielt. Vor dem Autoklavieren wurde dem Fermentat 50 mM HEPES zugegeben und der pH auf 7 eingestellt.

Um zu untersuchen, ob die bei *E. coli* aufgetretene Verzögerungsphase noch weiter verkürzt werden kann, wurden Adaptierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurde die Doppelmutante verwendet, da diese in Minimalmedium mit Propionat das beste Wachstum zeigte und daher die besten Voraussetzungen für eine weitere Wachstumsverbesserung bot. Der Stamm wurde in LB-Medium über Nacht vorkultiviert, anschließend wurden die Zellen gewaschen und in M9-Minimalmedium mit 30 mM Propionat mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Nachdem der Stamm eine OD₆₀₀ > 1 erreicht hatte, wurde er in frisches M9-Medium überführt, erneut mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach dem dritten Transfer wurde der Stamm in LB-Medium inokuliert und nach 8 Stunden erneut in M9-Medium mit 30 mM Propionat überführt. Die Ergebnisse des Versuchs sind Abb. 24 zu entnehmen. Es wird deutlich, dass das Wachstum des Stamms sich nach jedem Transfer verschnellert. So betrug die Verdopplungsrate in der Startkultur 25,77 Stunden, nach dem ersten Transfer jedoch nur noch 14,91 Stunden. Nach dem zweiten Transfer benötigte der Stamm nur noch 12,35 Stunden, um sich zu verdoppeln, und auch der dritte Transfer führte zu einer um weitere 5,05 Stunden verminderten Verdopplungsrate von 7,29 Stunden. Nicht überraschend war, dass der Stamm nach dem Transfer in LB-Medium eine sehr hohe Wachstumsrate aufwies. Nach 8 Stunden wurde er erneut in M9-Medium überführt. Hier zeigt er überraschenderweise eine schlechtere Verdopplungsrate als zuvor: er benötigte

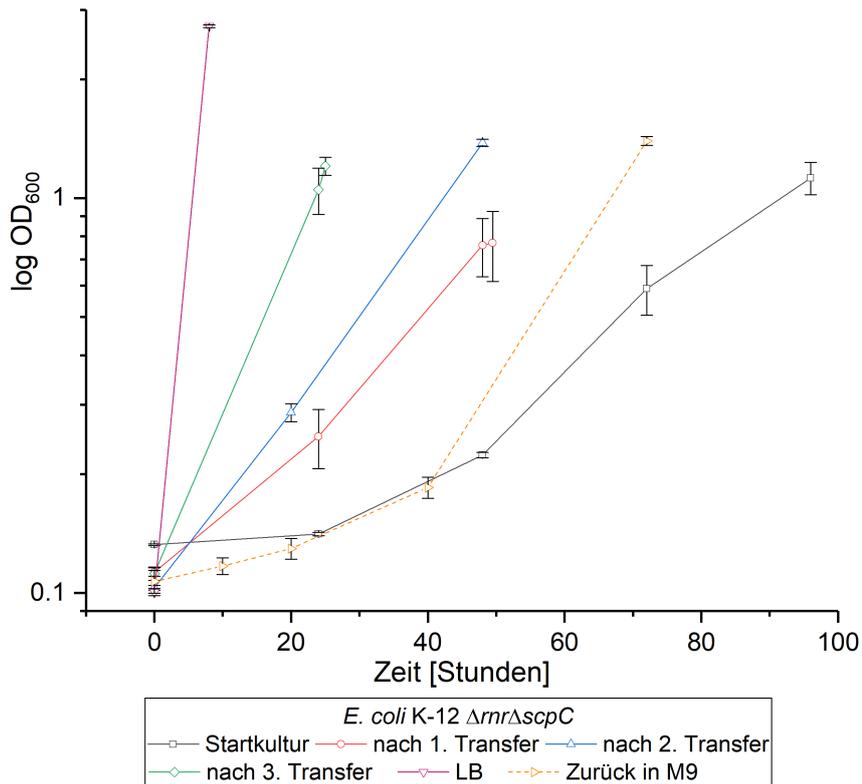


Abbildung 24: Adaptierungsversuch mit dem Stamm *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ in Minimalmedium M9 mit 30 mM Propionat. Der Stamm wurde immer mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei einer End-OD₆₀₀ > 1 in frisches Medium überführt.

10,98 Stunden, um sich zu verdoppeln, was jedoch noch immer 57,39 % schneller war als beim nicht-adaptierten Stamm.

Um zu überprüfen, ob sich der Adaptierungsprozess auf Veränderungen im Genom des Stammes oder auf Änderungen auf Transkriptionsebene zurückführen lässt, wurde der Versuch mit LB-Medium wiederholt. Hierzu wurden der adaptierte sowie der unadaptierte *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ -Stamm auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde je eine Einzelkolonie in Flüssig-LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt, und am nächsten Tag mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 in M9 mit 30 mM Propionat überführt. Abb. 25 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Hier wird deutlich, dass es zwischen adaptiertem und nicht-adaptiertem *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ keinen sehr großen Unterschied im Wachstumsverhalten auf Minimalmedium mit Propionat gibt. Beide erreichten in 96 Stunden eine OD von etwa 0,12. Der adaptierte Stamm zeigte eine Verdopplungsrate von 21,90 Stunden, während der nicht-adaptierte Stamm 26,33 Stunden für die Verdopplung benötigte.

In einem ersten Zellsuspensionsassay wurde der *E. coli* K-12 Δrnr -Stamm mit dem Plasmid pMAL_alsS_alsD für die Produktion von Acetoin genutzt, da für diesen gezeigt wurde, dass er im Fermentat wachsen kann.

Hier wurde ein Fermentat genutzt, das noch 30,7 mM Propionat enthielt. Dieses wurde zuvor

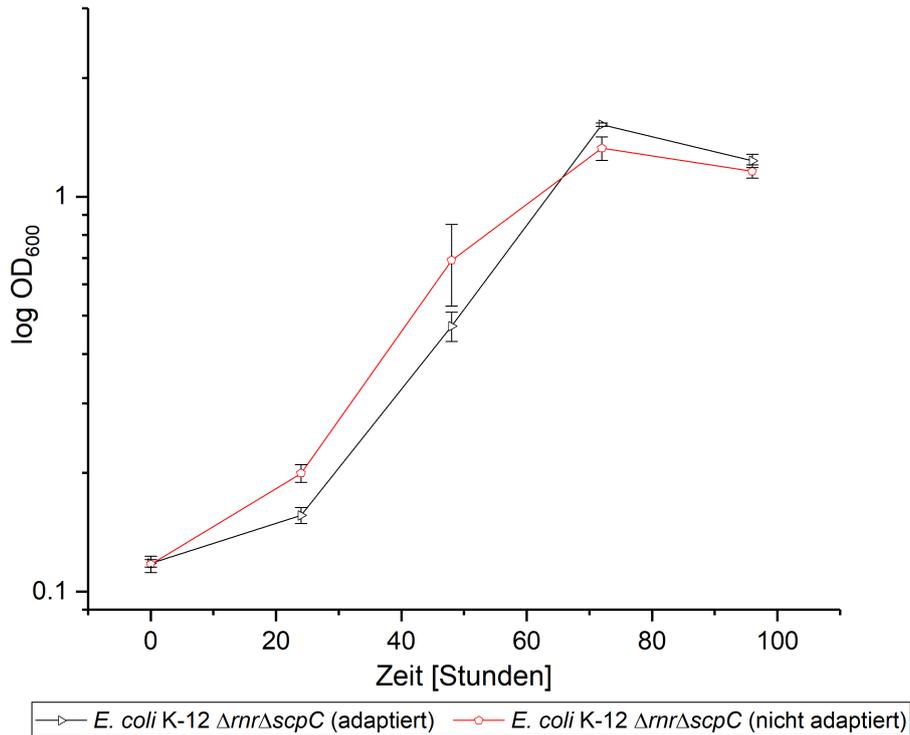


Abbildung 25: Wachstumskurve des Stamms *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ mit dem Plasmid pMAL_alsS_alsD in M9-Medium mit 30 mM Propionat. Es wurde zum Einen der bereits adaptierte und zum Anderen der nicht adaptierte Stamm von LB-Agarplatte in LB-Flüssigmedium vorinkubiert, bevor beide in M9 Medium mit 30 mM Propionat überführt wurden.

filtriert, 50 mM HEPES zugesetzt und der pH auf 7 eingestellt, ehe es autoklaviert wurde. Der Stamm wurde mit einer Start-OD von 2,5 im vorbereiteten Medium inokuliert und mit 50 μ M IPTG induziert. Start- und Endkonzentrationen von Propionat und Acetoin wurden über HPLC-Messungen bestimmt. Nach 24 Stunden konnten 3,12 mM (274,90 mg/l) Acetoin gemessen werden, während 7,25 mM Propionat verbraucht waren. Damit wurden innerhalb der 24 Stunden 23,6% des vorhandenen Propionats (30,69 mM) verbraucht. Da aus zwei Propionat-Molekülen ein Acetoin-Molekül gebildet wird, hätten aus 7,25 mM Propionat maximal 3,63 mM Acetoin gebildet werden können. Damit ergibt sich, dass die tatsächliche Umsetzungsrate bei 86,01 % lag.

Als weiterer Versuch wurde zudem die Doppelmutante *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ mit dem pMAL_alsS_alsD-Plasmid transformiert. Die Acetoin-Produktion wurde mit diesem Stamm in Minimalmedium getestet, um zu charakterisieren, wieviel des Propionats tatsächlich zu Acetoin umgesetzt wird. Der Stamm wurde in LB-Flüssigmedium mit 100 mg/ml Ampicillin zur Erhaltung des Plasmids und 50 μ M IPTG zur Induktion des Plasmids vorgezogen. Für den Zellsuspensionsassay wurde M9-Medium mit 30 mM Propionat als Elektronendonator eingesetzt, ebenfalls mit Ampicillin (100 mg/ml) und 50 μ M IPTG. Es wurden Proben nach 0, 4, 12 und 24 Stunden genommen und auf die Konzentrationen an Propionat und Acetoin hin

analysiert. In Abb. 26 ist das Ergebnis zu finden.

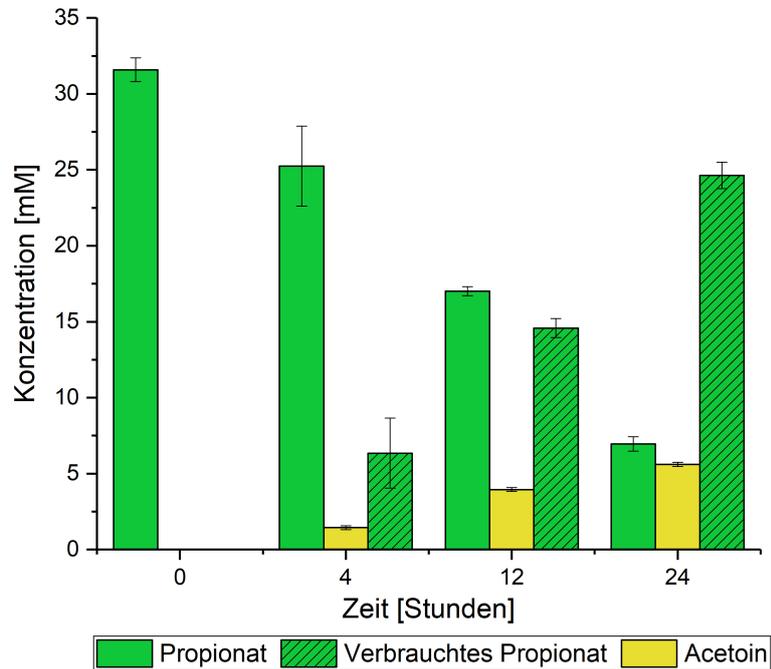


Abbildung 26: Produktionsergebnisse des Zellsuspensionsassays des *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ -pMAL_alsS_alsD in M9-Medium mit 30 mM Propionat Startkonzentration, 100 mg/ml Ampicillin und 50 μ M IPTG.

Nach 4 Stunden hatte der Stamm bereits 6,35 mM Propionat verbraucht und 1,45 mM Acetoin gebildet. Zu diesem Zeitpunkt entspricht das einer Umsetzungsrate von 45,69 %. Nach 12 Stunden liegt diese Rate mit 54,17 % etwas höher. Zu diesem Zeitpunkt waren 14,58 mM Propionat verbraucht und 3,95 mM Acetoin gebildet. Hiermit zeigt er eine etwa doppelt so schnelle Umsetzung wie der *E. coli* K-12 Δrnr -Stamm, der 3,12 mM Acetoin in 24 Stunden bildete. Zum Endzeitpunkt nach 24 Stunden hatte der *E. coli* K-12 $\Delta rnr\Delta scpC$ 24,64 mM (77,98 %) des verfügbaren Propionats verbraucht und 5,61 mM Acetoin (494,30 mg/l) gebildet. Dies resultiert in einer Umsetzungsrate von 45,53 %.

4.9.2 Produktion von 1-Propanol

Für die Produktion von 1-Propanol wurden verschiedene Konstrukte entworfen. Der erste Schritt von Propionat zu Propionyl-CoA kann von verschiedenen Enzymen durchgeführt werden. Es wurden daher folgende Enzyme für diesen Schritt getestet:

- Propionyl-CoA Synthetase (*prpE*)
- Acetyl-CoA Synthetase (*acs*)
- Acetoacetyl-CoA Transferase (*atoDA*)

Die Schritte von Propionyl-CoA über Propionaldehyd zu 1-Propanol werden beide von einer Alkohol-Dehydrogenase (*adhE*) katalysiert. Zudem wurden Punktmutationen in *prpE* und *adhE* auf Verbesserung des Prozesses hin untersucht. Für die Propionyl-CoA Synthetase aus *E. coli* wurde beschrieben, dass der Austausch eines der beiden Cysteine C128 und C315 gegen ein Alanin Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hat. Dies ist darauf zurückzuführen, dass unter oxidativen Bedingungen zwischen den beiden Cysteinen (reversibel) eine intramolekulare Disulfidbrücke gebildet wird, die die Aktivität des Enzyms kontrolliert und inhibiert (Guo und Oliver, 2012). Durch Austausch eines Cysteins wird die Bildung der Disulfidbrücke verhindert. Für diese Arbeit wurde daher die Stelle C128 gewählt, und das Cystein gegen ein Alanin ausgetauscht. Für die Alkohol-Dehydrogenase in *E. coli* wurde postuliert, dass das Enzym unter anaeroben Bedingungen hochreguliert und unter aeroben Bedingungen reprimiert wird (Membrillo-Hernandez et al., 2000). Holland-Staley et al. (2000) stellten fest, dass die aerobe Aktivität des Enzyms durch eine einzelne Aminosäure bestimmt wird. Sie konnten zeigen, dass Mutanten mit einem Austausch von Glutamat zu Lysin oder einer anderen Aminosäure an der Stelle Glu568 zu einem aerob aktiven Enzym führte. Da auch in dieser Arbeit alle Versuche unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden, sollte der Austausch von Glu zu Lys an der Stelle 568 auf eine Auswirkung auf die 1-Propanol-Produktion hin untersucht werden. Insgesamt ergaben sich sechs verschiedene Konstrukte, die auch in Tab. 1 aufgelistet sind. Alle bestehen aus einem pBAD-Vektor, der die entsprechenden zwei Gene trägt und wurden in den Stamm *E. coli* K12 $\Delta rnr \Delta prpC$ eingebracht. Mit den resultierenden sechs Stämmen wurden Zellsuspensionsassays durchgeführt, um die Produktion von 1-Propanol zu testen. Für alle wurde M9-Minimalmedium mit 30 mM Propionat und 50 mM Glycerin genutzt, zur Plasmiderhaltung wurde 50 mg/ml Kanamycin und zur Induktion des Plasmides 1 mM Arabinose zugegeben. Glycerin musste als Co-Substrat für die Energiegewinnung zugegeben werden, so dass ATP für die Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA zur Verfügung steht (vgl. 1.5). Für die Vorkultur wurde LB-Medium (siehe Tab. 2) genutzt, dem ebenfalls 50 mg/ml Kanamycin und 1 mM Arabinose zur Vorinduktion zugegeben wurde. Die Zellsuspensionsassays wurden mit einer OD_{600} von 5 und für 26 Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 26.

Tabelle 26: Ergebnisse der Zellsuspensionsassays zur Produktion von 1-Propanol. Es wurde der Stamm *Escherichia coli* K12 $\Delta nr \Delta prpC$ mit verschiedenen Plasmiden in M9 Medium mit 30 mM Propionat und 50 mM Glycerin verwendet. Zur Erhaltung des Plasmids wurde dem Medium 50 mg/ml Kanamycin zugesetzt. Die Induktion des Plasmids wurde durch die Zugabe von 1 mM Arabinose erreicht. Die Konzentrationen aller Substanzen wurden über die HPLC bestimmt.

Konstrukt	Propionat [mM]		Glycerin [mM]		1-Propanol [mM]		Umsetzungsrate [%]
	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende	
pBAD-prpE-adhE	31,05 ± 0,06	28,59 ± 0,23	55,04 ± 0,09	1,60 ± 2,02	0,00 ± 0,00	3,65 ± 0,10	148,37
pBAD-prpE-adhE ^{mut}	28,57 ± 0,55	25,42 ± 0,16	50,60 ± 1,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,52 ± 0,13	111,75
pBAD-prpE ^{mut} -adhE	31,60 ± 0,39	28,77 ± 0,09	53,92 ± 0,56	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,96 ± 0,18	104,59
pBAD-prpE ^{mut} -adhE ^{mut}	28,92 ± 0,60	27,89 ± 0,37	48,11 ± 1,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,01 ± 0,41	195,15
pBAD-atoDA-adhE ^{mut}	31,43 ± 0,06	23,67 ± 0,22	53,22 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	7,60 ± 0,14	97,97
pBAD-acs-adhE ^{mut}	30,86 ± 1,01	26,16 ± 0,32	52,52 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,11 ± 0,38	108,72

Wie Tab. 26 zu entnehmen ist, konnte mit dem Plasmid pBAD-atoDA-adhE^{mut} die höchste Konzentration an 1-Propanol erreicht werden. Nach 26 Stunden wurden $7,60 \pm 0,14$ mM 1-Propanol im Medium gemessen. Dies entspricht 456,68 mg/l. Die zweithöchste gemessene 1-Propanol-Konzentration lag bei $5,11 \pm 0,38$ mM (307,06 mg/l). Diese wurde mit dem Konstrukt pBAD-acs-adhE^{mut} erreicht. Daher wurden die beiden höchsten Konzentrationen mit den beiden Konstrukten ohne spezifische Propionyl-CoA Synthetase erreicht. Die mit einer Propionyl-CoA Synthetase höchste erreichte Konzentration lag mit $3,65 \pm 0,10$ mM (219,33 mg/l) um 45,11 % niedriger als für das Konstrukt mit *atoDA* und um 12,89 % niedriger als für das Konstrukt mit *acs*. Für alle Konstrukte wurden sehr hohe Umsetzungsraten von teilweise über 100 % erreicht.

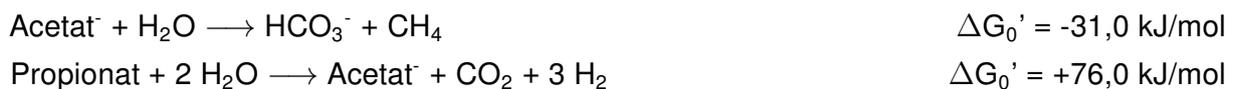
5 Diskussion

5.1 Repetitiver Chronoamperometrie-Versuch (Rep-CHR)

Die gezeigten Ergebnisse des repetitiven Chronoamperometrie-Versuches machen deutlich, dass ein wie hier verwendetes Gemüsefermentat gut für eine Oxidation in einem bioelektrochemischen System geeignet ist. Gemüsesorten wie Kartoffeln, Kohl und Karotten enthalten Kohlenhydrate wie Stärke, Cellulose, Saccharose, Glucose, Fructose, Sucrose, Mannose, Raffinose, Melibiose und weitere andere, die in einer anaeroben Fermentation zu organischen Säuren umgesetzt werden können. Insbesondere für kohlenhydrathaltige Abfälle ist dies daher interessant, wie zum Beispiel Großmarktabfälle oder Abfälle aus der Lebensmittelindustrie. Aber auch für gemischte, organische Abfälle, die beispielsweise auch proteinhaltig sind, konnte gezeigt werden, dass in einem bioelektrochemischen System Strom produziert wurde und eine TOC-Abreinigungsrate von über 80 % erreicht wurde (Heilmann und Logan, 2006).

In dem hier angewendeten System konnte mit dem verwendeten Gemüsefermentat bei einem angelegten Potential von 0 mV gegen SHE im Schnitt eine maximale Stromdichte von $190,83 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht werden. Dies ist durchaus vergleichbar mit anderen Studien (Brown et al., 2015; H. Liu et al., 2008). Auch der Verlauf der Stromkurve lässt sich gut mit einer Studie vergleichen, die ein bioelektrochemisches System mit Abwasser betrieb (Gimkiewicz und Harnisch, 2013): Die Stromdichte stieg nach Start des Systems an, bis ein Maximum erreicht war. Dieses zeigte bei Gimkiewicz und Harnisch (2013) mit ca. $250 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ einen sehr vergleichbaren Wert wie auch in dieser Arbeit. Im Anschluss sank die Stromdichte wieder auf den Anfangswert zurück. Bei Betrachtung von Abb. 11 (Seite 41), wird deutlich, dass der maximale Stromdichtenwert erreicht ist, wenn Acetat und Butyrat bereits nahezu vollständig oxidiert sind. Es gibt also eine Verzögerung von gemessenem Substrat zu übertragenen Elektronen auf der Anode. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Substanzen nach Aufnahme aus dem Medium dort nicht mehr messbar sind, es jedoch einige Zeit in Anspruch nimmt, bis diese vom Stoffwechsel der Organismen oxidiert sind und die Elektronen auf die Anode übertragen wurden. Interessanterweise steigt die Propionatkonzentration bei den Läufen 2 und 11 an, bis Acetat und Butyrat abgebaut wurden, so befindet sich zu diesem Zeitpunkt am meisten Propionat im Medium. Deshalb wurden die ersten neun Experimentläufe zu diesem Zeitpunkt abgebrochen, um möglichst viel Propionat im Effluent zu behalten. In Experimentlauf 11 kann nun gezeigt werden, dass nach diesem Punkt die Propionatkonzentration abnimmt. Das Mikrobiom nutzt zunächst Acetat und Butyrat, bevor der Propionat-Abbau startet. Dies ist im Einklang mit anderen

Studien, die gezeigt haben, dass Butyrat und auch Acetat den Propionat-Abbau bzw. die Propionat-oxidierenden Bakterien inhibieren (Lens et al., 1996; Van Lier et al., 1993). Dies erklärt, wieso auch hier der Abbau von Propionat erst wirklich startet, wenn nur noch sehr niedrige Konzentrationen an Acetat und Butyrat verfügbar sind. Van Lier et al. (1993) zeigten, dass die Inhibierung der Propionat-Oxidation von der Konzentration und dem pH abhängt und sich auf die Propionat-oxidierenden Acetogenen bezieht, nicht auf die hydrogenotrophen Methanogenen. Nachfolgend ist die Gibbs Freie Energie des Acetat- sowie Propionatabbaus gezeigt (Fukuzaki et al., 1990; Van Lier et al., 1993):



Der Abbau von Acetat zu Methan ist mit -31 kJ exergon, der Abbau von Propionat zu Acetat jedoch endergon, wie bereits beschrieben (siehe 1.3). Unter thermodynamischen Gesichtspunkten ist der Acetat-Abbau daher im Vorteil gegenüber dem Propionat-Abbau. Da in dieser Arbeit über die 16S rRNA- sowie die Metatranskriptomanalyse und den Inhibitorversuch gezeigt werden konnte, dass ein Großteil des Acetats über Methanogenese abgebaut wird, steht Acetat auch hier in der thermodynamischen Hierarchie über Propionat. Der Propionat-Abbau kann erst dann erfolgen, wenn die Produkte aus der Reaktion entfernt werden. Solange Acetat also messbar ist, erfolgt kein Propionat-Abbau. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Butyrat die Propionat-Oxidation nur inhibiert, solange keine Butyrat-oxidierenden Organismen verfügbar sind. Nach Zugabe eines Butyrat-oxidierenden Konsortiums wurde auch Propionat abgebaut (Van Lier et al., 1993). Möglich wäre zudem, dass der Abbau von Butyrat zunächst zur Produktion von Acetat führt, was wiederum einen inhibierenden Effekt auf den Propionat-Abbau hat. Daraus kann geschlossen werden, dass insbesondere hohe Acetat-Konzentrationen (und niedrige Propionat-Konzentrationen, was auf das hier beschriebene System zutrifft) einen inhibierenden Effekt auf den Propionat-Abbau nehmen. Neben Acetat wurde auch gezeigt, dass entstehender Wasserstoff und Formiat zur Inhibierung der Abbauprozesse von Butyrat und Propionat führen kann (Schmidt und Ahring, 1993).

Ein weiterer Faktor scheint die Temperatur zu sein. Es wurde beschrieben, dass der Propionat-Abbau bei höherer Temperatur (55 °C) schneller abläuft als bei niedrigerer Temperatur (38 °C) (Hegde und Pullammanappallil, 2007). Für alle BES-Versuche in dieser Arbeit wurde eine Temperatur von 30 °C gewählt, da der Starter-Biofilm zu Beginn des Rep-CHR-Versuches Organismen enthielt, deren Optimaltemperatur bei 30 °C liegt (*G. sulfurreducens*, *S. oneidensis*). Da diese beiden Organismen zudem Modellorganismen für exoelektrogene Aktivität sind, wurde die Temperatur angepasst, um die Bedingungen für diese beiden Organismen optimal zu halten. Dies könnte auch ein Grund sein, dass der Abbau organischer Säuren langsamer von Statten ging.

Bei den Läufen 1 - 9 lag die Acetat-Konzentration am Ende der Experimentlaufzeit unter

0,5 mM, die Butyrat-Konzentration sogar unter 0,1 mM. Über den Verlauf der Zeit wurden im Schnitt 83,51 % des TOC abgebaut. In anderen Studien wurden TOC-Abbauraten von 60,78 % (Deval et al., 2017), 77 % (Chianese et al., 2016) oder 80,8 % (H. Li et al., 2016) erreicht, was zeigt, dass die hier erreichten Raten von 83,51 % (Lauf 1 - 9) bzw. 93,25 % (Lauf 10 und 11) auch in diesem Bereich oder sogar höher liegen. Es konnte mit dem System also der Großteil des TOC aus der Flüssigphase entfernt werden. Die verbleibenden 16,49 % (Lauf 1 - 9) enthielten noch Propionat. Von den im Schnitt übrig gebliebenen 0,61 g/l TOC konnten 0,48 g/l Propionat zugeordnet werden, was 79,09 % entspricht. 20,91 % (Lauf 1 - 9) bzw. 4,81 % (Lauf 10 und 11) des TOC wurden daher von anderen Stoffen des Fermentats gestellt. Dies könnten beispielsweise Huminstoffe sein, da auch für Obst- und Gemüseabfall in einem Anaeroben Fermenter gezeigt wurde, dass Humifizierung stattfand (Provenzano et al., 2016). Huminstoffe entstehen beispielsweise bei der Kompostierung und bestehen aus Huminsäuren, Fulvinsäuren und Huminen (Dores-Silva, Landgraf und Rezende, 2018). Aufgrund ihrer komplexen Struktur und ihrer engen Interaktion mit Mineralien sind sie schwer zersetzbar von Mikroorganismen (Trevisan et al., 2010). Sie weisen Farbvariationen von gelb, rotbraun, dunkelbraun bis schwarzbraun auf (Kumada, 1965). Das hier genutzte Fermentat wies ebenfalls eine braune Farbe auf. Auch nach Abzentrifugation von Partikeln und Filtration konnte eine klare, braun bis dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit gewonnen werden, was auf das Vorhandensein von gelösten Huminstoffen hinweist. Interessanterweise identifizierten Lovley et al. (1996) Huminstoffe bzw. Huminsäure als mögliche Elektronenshuttles, die die Reduktion unlöslicher Eisen(III)-Oxide in Anwesenheit von *Geobacter metallireducens* stimulierten. Sie könnten auch als Shuttles für andere Organismen im Fermentat zugänglich sein und so einen vermittelten Elektronentransfer ermöglichen (vgl. Abb. 27).

5.1.1 Coulombsche Effizienz

Die für das Rep-CHR beschriebene Coulomb'sche Effizienz lag im Schnitt bei 13,5 %, was durchaus vergleichbar mit Literaturwerten ist (Asai et al., 2017; Angosto, Fernández-López und Godínez, 2015; L. Huang und Logan, 2008). Methanogenese, die beispielsweise Acetat und Wasserstoff als Substrat nutzt, tritt in Konkurrenz mit exoelektrogenen Bakterien und führt zu einer starken Reduzierung der Coulomb'schen Effizienz (Flayac, Trably und Bernet, 2018). Durch Zugabe des Inhibitors 2-Bromoethansulfonat konnte eine Steigerung der Coulomb'schen Effizienz um das 4,3-Fache erreicht werden. 2-Bromoethansulfonat fungiert als kompetitives Analog zum Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonat) und verhindert die Bildung von Methan (Smith, 1983). Der Stoffwechsel der Methanogenen ist also gehemmt und Substrate sind für andere Organismen verfügbar bzw. Elektronen, die zuvor in die Produktion von Methan geflossen sind, können nun auf die Anode abgegeben werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass insbesondere der Acetat-Abbau nach Inhibitorzugabe stark eingeschränkt war. Beides weist auf die Aktivität von acetoklastischen Methanogenen

hin, die Acetat als Elektronenakzeptor für die Produktion von Methan nutzen. Dies erklärt die niedrige Coulomb'sche Effizienz, da die Elektronen nicht auf die Anode übertragen werden, sondern in Methan fließen. Auch für Butyrat wurde ein verminderter Abbau im Inhibitorversuch festgestellt, was dafür spricht, dass auch dieser teilweise abhängig von Syntrophie mit Methanogenen ist. Für Propionat kann keine Aussage getroffen werden, da dessen Konzentration im Zeitverlauf des Inhibitorexperimentes konstant blieb bis das Experiment gestoppt wurde. Bei Syntrophien greift die hydrogenotrophe Methanogenese, die Wasserstoff zur Reduktion von CO_2 zu CH_4 nutzt. Hierfür werden die Elektronen aus dem Wasserstoff auf Ferredoxin und Coenzym B und M verteilt (Elektronenbifurkation), die im Anschluss zur Reduktion von CO_2 eingesetzt werden. Die Analyse der 16S rRNA-Sequenzierung bestätigt mit den Familien Methanocorpusculaceae und Methanosarcinaceae den Verdacht. Mitglieder der Methanocorpusculaceae nutzen Wasserstoff und Formiat als Elektronendonoren für die Reduktion von CO_2 zu CH_4 , während die Mitglieder der Familie Methanosarcinaceae sowohl H_2 und CO_2 als auch Acetat nutzen. Dabei wird Acetat in eine Methyl- und eine Carboxylgruppe gespalten. Die Methylgruppe wird zu Methan umgesetzt, während die Carboxylgruppe zu CO_2 oxidiert wird (Abbanat und Ferry, 1990).

Die Verteilung zeigt, dass die Familie Methanosarcinaceae einen deutlich kleineren Teil ausmacht, obwohl Acetat im Fermentat stets das Substrat mit der höchsten Konzentration darstellte. Eine mögliche Erklärung ist, dass Acetat nur zum Teil durch Organismen der Methanosarcinaceae abgebaut wird. Auch für Acetat ist bereits ein syntropher Abbau durch Acetat-oxidierende Bakterien und hydrogenotrophe Methanogene beschrieben. Die Reaktion ist nur energetisch sinnvoll, wenn Methanogene den Wasserstoff zur Produktion von Methan nutzen (Hattori, 2008). Es wäre also durchaus möglich, dass ein Teil des Acetats über Syntrophien mit hydrogenotrophen Methanogenen und ein Teil über acetoklastische Methanogenese abgebaut wird. Da nach Zugabe des Inhibitors dennoch etwa 20 % des Acetats und 72,7 % des Butyrats abgebaut wurden, ist zu vermuten, dass auch andere, Wasserstoff konsumierende Organismen vorhanden sind, die die Syntrophie ermöglichen. Dies könnten beispielsweise Sulfatreduzierer wie *Desulfovibrio* sein (Dwyer et al., 1988), deren Familie Desulfovibrionaceae dem Protein Cytochrom c im Transkriptom zugeordnet werden konnte. Über diese Familie könnte daher auch eine Verbindung zwischen Syntrophie und externem Elektronentransfer hergestellt werden.

5.1.2 Metatranskriptom

Die Metatranskriptomanalyse gibt Aufschluss über die Zusammensetzung und Aktivität des Biofilms im bioelektrochemischen System. Für den Acetat-Abbau konnten die meisten Reads den Enzymen Acetat-Kinase und Phosphat-Acetyltransferase zugeordnet werden, sowohl für die *Archaea*, als auch *Bacteria*. Dabei war die Read-Anzahl der *Archaea* für diese Enzyme 3,5- bis 5-Mal so hoch wie für die der *Bacteria* und konnten zu 100 % der Familie Methano-

sarcinaceae zugeordnet werden. Dies zeigt deutlich, dass der größte Teil des Acetatabbaus über acetoklastische Methanogenese erfolgt. Die bakteriellen Enzyme konnten wiederum zum Großteil der Familie Syntrophomonadaceae zugeschrieben werden, die jedoch als Butyrat-Abbauer beschrieben sind, die Acetat produzieren. Wie aus Abb. 27 hervorgeht, postulieren wir für diese Arbeit, dass der Hauptweg des Acetat-Abbaus über die Enzyme Acetat Kinase/Phosphat-Acetyltransferase der Familie Methanosarcinaceae erfolgt. Die zweite Möglichkeit der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA, das Enzym Acetyl-CoA Synthetase, kann vernachlässigt werden, da hier sowohl den Archaea als auch den Bacteria bis zu 25- bzw. 8-Mal weniger Reads zugeordnet werden konnten. Möglicherweise kann diesem Enzym die reversible Reaktion, von anderen Fettsäuren zu Acetat hin, zugeschrieben werden. Familien wie Anaerolineaceae, Ruminococcaceae, Porphyromonadaceae und Clostridiaceae sind beschrieben als Acetat-Produzenten, beispielsweise aus Cellulose. Dies lässt sich auch gut mit einem Gemüsefermentat korrelieren, da hier noch vorhandenes Zellmaterial zu Fettsäuren abgebaut werden kann. Zu einem Teil fand also eine Fortsetzung der Fermentierung statt. Da im Inhibitorversuch gezeigt wurde, dass ohne Methanogenese dennoch ein kleiner Teil Acetat abgebaut wird, könnte eine Syntrophie von Acetat-oxidierenden Organismen mit Wasserstoff konsumierenden Organismen (z.B. Desulfovibrionaceae) vorhanden sein, die den kleineren Teil der Acetat-Oxidation vollzieht. Der Wood-Ljungdahl-Weg wurde sowohl für die acetoklastische Methanogenese als auch als Acetat-abbauender Weg in Bakterien beschrieben, die in Syntrophie mit Methanogenen leben (B. Müller, Sun und Schnürer, 2013; Worm et al., 2014).

Für den Butyrat-Abbau befinden sich die Hauptakteure in der Domäne der *Bacteria*. Wie bereits oben erwähnt, ist die Familie Syntrophomonadaceae bekannt für Butyrat-Abbau. Sie taucht hier für das Enzym Butyryl-CoA:Acetate CoA-Transferase ebenfalls als stärkste Gruppe auf. Die beiden Enzyme Butyrat Kinase und Phosphat-Butyryltransferase können vernachlässigt werden, da hier die Readzahl etwa 7,5-Mal niedriger lag als für die genannte CoA-Transferase. Es wurde zudem bereits für *Syntrophomonas wolfei*, einem Vertreter der genannten Familie, gezeigt, dass eben diese Transferase für die Aktivierung von Butyrat verantwortlich ist (Wofford, Beaty und Mcinerney, 1986). Wie aus Abb. 27 zu entnehmen ist, bietet daher dieses Enzym der Familie Syntrophomonadaceae den Hauptweg des ersten Schrittes des Butyrat-Abbaus. Mögliche Butyrat-Produzenten, die analog zur Acetat-Produktion aus langkettigen Kohlenhydraten oder anderen organischen Säuren Fettsäuren produzieren, sind dabei Clostridiaceae, Synergistaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae und Lachnospiraceae.

Für die Elektronenübertragung auf die Anode wurde Cytochrom *c* als Indikator gewählt. Hier stellt mit über 90 % die Familie Geobacteraceae die Gruppe mit den meisten Reads für Cytochrom *c*. Wie bereits genannt, nutzt diese Familie Acetat als Elektronendonator, wurde jedoch nur mit sehr kleinen Anteilen für die Enzyme Acetat Kinase und Phosphat-Acetyltransferase gefunden.

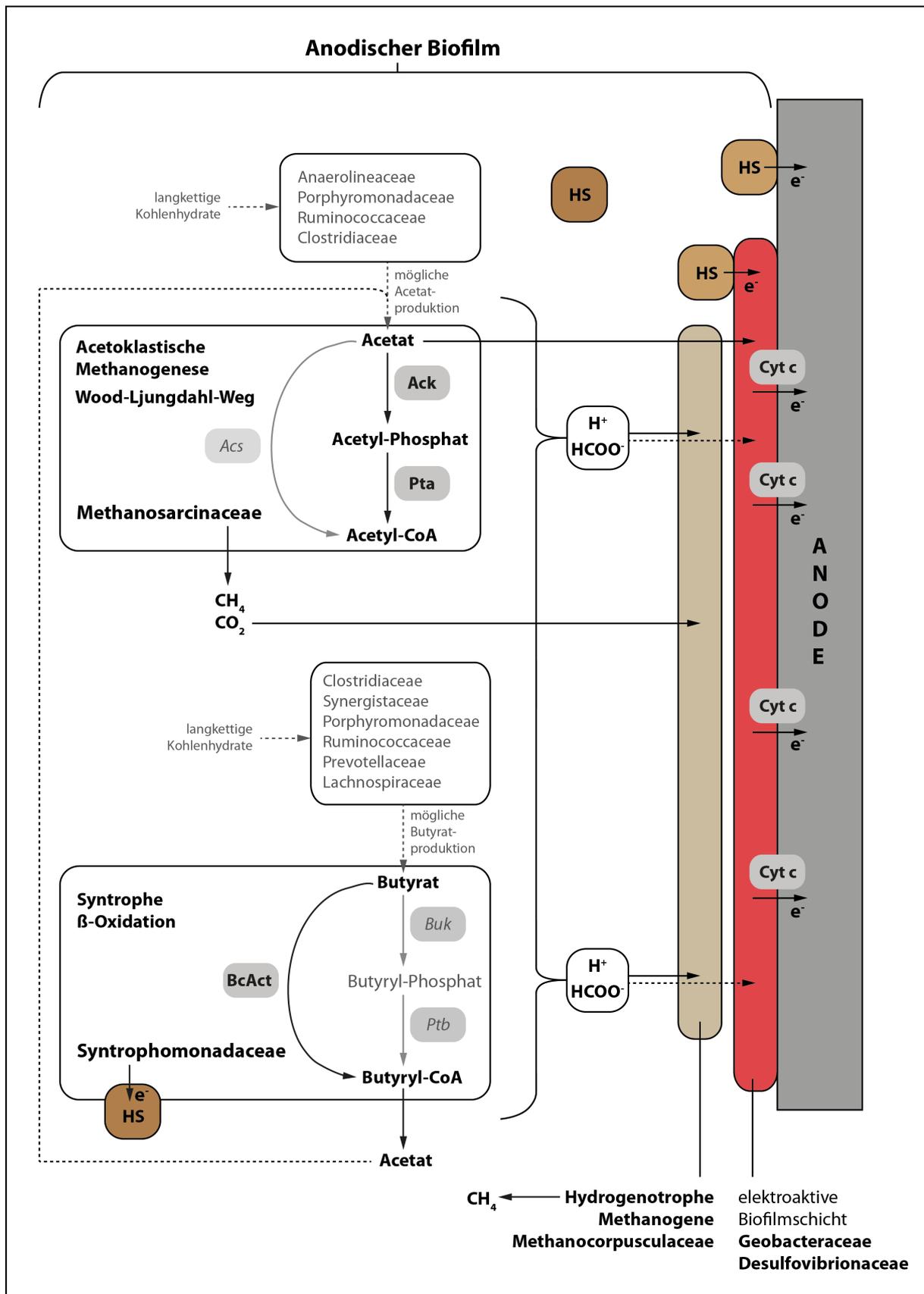


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Hypothese für Stoffwechselverteilungen im bioelektrochemischen System. **Ack** Acetat Kinase; **Pta** Phosphat Acetyltransferase; **Acs** Acetyl-CoA Synthetase; **Buk** Butyrat Kinase; **Ptb** Phosphat Butyryltransferase; **BcAct** Butyryl-CoA:Acetat CoA-Transferase; **Cyt c** Cytochrom c; **HS** Huminstoffe.

Sie stehen in der Verteilung bei diesen Enzymen an fünfter (Acetat Kinase) bzw. achter (Phosphat-Acetyltransferase) Stelle und tragen daher vermutlich zu einem kleinen Teil zur Acetat-Oxidation bei. Ganz offensichtlich sind sie maßgeblich für den externen Elektronentransfer verantwortlich. Vorstellbar wäre auch ein Interspezies-Elektronentransfer, so dass ein großer Teil der Elektronen, die auf die Anode übertragen wurden, nicht aus dem Stoffwechsel der Familie Geobacteraceae selbst stammt, sondern diese nur als Überträger dienen und Elektronen von anderen Organismen erhalten. Es wurde bereits ein direkter Interspezies-Elektronentransfer (DIET) beschrieben, in dem jedoch Methanogene der Familie Methanosarcinaceae Elektronen von einer *Geobacter*-Spezies aufnahmen, und nicht umgekehrt (Yee et al., 2019; Rotaru, Shrestha, F. Liu, Markovaite, et al., 2014). Dabei wurde festgestellt, dass der methanogene Organismus während des DIET eine höhere Expression membrangebundener, redoxaktiver Proteine zeigte, zum Beispiel S-Layer Proteine und Elektronen-Transport-Proteine. Zudem wurde für *M. barkeri* Elektroaktivität gezeigt, indem dieser Organismus mit einer Kathode als Elektronendonator Methan produzierte (Yee et al., 2019). Es wurden auch *c*-Typ Cytochrome in diesem Organismus nachgewiesen. Es wäre also möglich, dass diese Familie Elektronen von anderen Organismen aufnimmt und diese für die Methan-Synthese einsetzt. Dies würde auch die eher niedrige Coulomb'sche Effizienz erklären.

Für *Geobacter*-Spezies in Biofilmen wurde beschrieben, dass sie eher die internen Layer besiedeln, die nah am Elektronenakzeptor liegen. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass *Geobacter* Elektronen aus dem Stoffwechsel anderer Organismen aufnehmen und als eine Art „biologischer Stecker“ zur Anode fungieren könnte. Daher wäre es möglich, indirekt einen elektrischen Strom aus komplexen Substraten wie Zuckern zu erzeugen, die *Geobacter* selbst nicht nutzen kann (Tejedor-Sanz et al., 2018). Des Weiteren wurde auch beschrieben, dass *Geobacter sulfurreducens* auch Wasserstoff als Elektronendonator nutzen kann (Bond und Lovley, 2003). Dies lässt sich sehr gut in Einklang bringen mit den hier präsentierten Ergebnissen. Wie auch in Abb. 27 gezeigt, wäre dementsprechend die Familie Geobacteraceae in der Lage, zum einen Acetat zu oxidieren und zum anderen Elektronen oder Wasserstoff aus dem Stoffwechsel anderer Organismen aufzunehmen und Elektronen auf die Anode zu übertragen. Die zweite identifizierte Gruppe für Cytochrom *c* ist die Familie Desulfovibrionaceae. Für einen Vertreter dieser Familie wurde gezeigt, dass er in einem mediatorlosen bioelektrochemischen System mit Laktat als Elektronendonator Strom produzierte (Kang et al., 2014). In dieser Arbeit wurde kein Laktat im System nachgewiesen und die Familie Desulfovibrionaceae wurde nur in kleinen Anteilen der Acetat Kinase (0,23 %) und der Phosphat-Acetyltransferase (3,96 %) zugeordnet. Kuever (2014) nennt für diese Familie Laktat, Pyruvat, Wasserstoff und Formiat sowie Primäre Alkohole als typische Elektronendonoren. Möglicherweise bietet diese Familie daher einen Partner für syntrophe Butyrat- oder Propionat-Oxidierer, da er bei solchen Reaktionen entstehenden Wasserstoff nutzen kann. *Desulfovibrio*-Spezies wurden bereits benannt als Teilnehmer syntropher

Beziehungen mit Wasserstoff oder Formiat als Elektronenträger, ein DIET wurde jedoch ausgeschlossen (Baek et al., 2018).

Der hier isolierte Organismus *Tepidimicrobium xylanilyticum* aus der Familie Clostridiaceae wurde ebenfalls als Eisen(III)-reduzierend beschrieben. Interessanterweise identifizierte eine Studie Mitglieder der Gattung *Clostridium* (Familie Clostridiaceae) als exoelektrogene Spezies (Jiang et al., 2016). Da Eisen(III) ein unlösliches Mineral ist, müssen Organismen, die es reduzieren, in der Lage sein, ihre Elektronen über die Zellmembran hinaus zu transportieren. In der Literatur ist nichts über *Tepidimicrobium xylanilyticum* in Bezug zu Exoelektrogenität oder Wachstum in einem bioelektrochemischen System bekannt, noch wurde er sequenziert. Daher kann kein Rückschluss auf die Proteine gezogen werden, die in diesem Organismus für die Exoelektrogenität verantwortlich sein könnten. Für Cytochrom *c* konnte keine Bezug zur Familie *Clostridiaceae* hergestellt werden, daher wird deren Beteiligung am externen Elektronentransfer ausgeschlossen.

5.2 OCP und CHR-OCP

Bei Betrachtung des Prozesses unterschieden sich in dieser Arbeit Chronoamperometrie- und Open Circuit Potential Versuche nicht maßgeblich in ihrem Ablauf. Bei allen Versuchen wurde Fermentat eingesetzt, das Acetat, Butyrat und Propionat (sortiert nach Ausgangskonzentration) enthielt. Über den Zeitverlauf wurden in allen Versuchen Acetat und Butyrat abgebaut, während Propionat akkumulierte, unabhängig davon, ob es sich um CHR oder OCP handelte. Wurde ein CHR-Versuch gemacht, konnte stets eine Stromproduktion verzeichnet werden, während sich beim OCP ein Potential zwischen -466,85 und -487,48 mV einstellte. Dies erklärt sich dadurch, dass das gefundene Mikrobiom prinzipiell unabhängig von der Anode als Elektronenakzeptor ist. Das oben beschriebene Modell, das zu einem Großteil auf Methanogenese beruht, zeigt, dass der Prozess auch ohne eine Anode funktioniert, da Elektronen, Protonen und CO₂ in die Produktion von Methan fließen können. Dennoch wurden im Vergleich von Rep-CHR und CHR-OCP bzw. auch zwischen CHR und OCP einige Unterschiede in der 16S-rRNA-Analyse festgestellt.

Ein Unterschied zum Rep-CHR stellt beim CHR-OCP-Versuch bei den Archaea die Ordnung Thermoplasmatales dar. Diese wurde jedoch mit sehr kleinen Anteilen gefunden (2,49 % im CHR und 2,05 % im OCP), im Rep-CHR sogar im Bereich von unter einem 1 % (0,34 %, in Abb. 14 daher nicht aufgeführt). Eine genaue Aussage darüber, was diese Familie für eine Aufgabe übernimmt, kann nicht getroffen werden und scheint anhand des prozentualen Auftretens im Bezug auf das Gesamtsystem zu vernachlässigen.

Im Vergleich der Bacteria zeigen sich mehrere Unterschiede zwischen Rep-CHR und CHR-OCP. Für das Rep-CHR wurden vier Familien, die im CHR-OCP-Versuch mit Anteilen größer 1,17 % auftraten, nicht gefunden. Dabei handelt es sich zum Einen um die Gruppe Clostridiales, die beim CHR-OCP aus nicht kultivierbaren Organismen dieser Ordnung zu-

sammengefasst wurde. Es wurden im Rep-CHR bereits diverse Familien dieser Ordnung gefunden (Christensenellaceae, Lachnospiraceae, Peptococcaceae, Ruminococcaceae, Syntrophomonadaceae), daher wird eine Aussage über die nicht kultivierbaren Organismen erschwert. Es ist zu sagen, dass es sich um anaerob bis aerotolerante, endosporenbildende Bakterien handelt. Ebenso wurden unkultivierbare Organismen aus der Ordnung der *Mollicutes* gefunden, die im Rep-CHR nicht auftraten. In der Literatur ist wenig zu diesen Organismen zu finden. Häufig werden Vertreter dieser Ordnung als Kontaminanten von Säugerzellkulturen und als Pathogene beschrieben. Dies ist für das Fermentat auszuschließen, da es nicht in Kontakt mit Säugerzellen kam und auch keinen menschlichen oder tierischen Ursprung hat. Es enthielt ausschließlich fermentierte Gemüseabfälle. Martini et al. (2014) beschreibt jedoch Organismen dieser Ordnung und auch Mitglieder der zugehörigen Familie *Acholeplasmataceae* (die für das CHR-OCP-Experiment beim CHR ebenfalls in kleinen Anteilen gefunden wurde) auch als Pflanzenpathogene, was auch für diese Arbeit am wahrscheinlichsten erscheint. Aufgrund ihres kleinen Genoms sind ihre metabolischen Möglichkeiten eingeschränkt. Es gibt Arten, die aus Acetat gesättigte Fettsäuren oder Polyterpene herstellen. Insgesamt kann jedoch keine Aussage über die Aktivität dieser Gruppe getroffen werden.

Ebenso wurden unkultivierbare Organismen in der Gruppe Cloacimonetes zusammengefasst. Mitglieder dieser Ordnung wurden in anaeroben Habitaten wie z.B. Biogas-Reaktoren identifiziert. Es wird vermutet, dass sie in den Cellulose-Abbau involviert sind und Acetat und Wasserstoff produzieren, der auch von syntrophen Partnern weiter genutzt wird (Stolze, Bremges, Ruming, et al., 2016). Dies ist für das beschriebene System durchaus denkbar, da Cellulose sich im Gemüsefermentat findet, und bereits viele Möglichkeiten der Syntrophie beschrieben wurden.

Die letzte Familie, die im Rep-CHR nicht vorkam, ist die der Desulfuromonadaceae. Da für diese Familie Eisen(III)-Komplexe als einer der Hauptelektronenakzeptoren genannt wurde (Greene, 2014), ist anzunehmen, dass sie als mögliche exoelektrogene Organismen eingeordnet werden können. Insbesondere im Vergleich zum OCP-Teil, der mit dem gleichen Fermentat durchgeführt wurde, ist zu bemerken, dass diese Familie im CHR-Versuch in deutlich höheren Anteilen zu finden ist (21,12 % im CHR, 1,17 % im OCP). Dies deutet auf eine Anpassung des Mikrobioms an die als Elektronenakzeptor zur Verfügung stehende Anode hin, da exoelektrogene Organismen hierdurch im Vorteil sind. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Familie Syntrophomonadaceae, die dagegen beim OCP-Versuchsteil mit höheren Anteilen zugeordnet werden konnte (16,50 % beim OCP und 7,73 % beim CHR). Diese Verteilung spricht dafür, dass ohne Anode als Elektronenakzeptor der Abbauweg der Syntrophie (z.B. mit Methanogenen) eher überwiegt, und die Elektronen eher in die Produktion von beispielsweise Methan fließen. Dies lässt sich nicht mit der 16S rRNA-Analyse des Rep-CHR korrelieren. Dort konnten keine Eisen(III)-reduzierenden oder als exoelektrogen bekannten Familien als Hauptakteure identifiziert werden, obwohl eine Stromproduktion zu

beobachten war. Nur die Familie Coriobacteriaceae gibt eventuell Hinweise auf exoelektroge-
ne Organismen (diese kam jedoch in den anderen 16S rRNA-Analysen nicht vor). Eine relativ
aktuelle Studie veröffentlichte das Genom eines neuen Coriobacteriaceae-Stammes, der
möglicherweise mit einer Kathode interagiert (Kobayashi et al., 2017). In diesem Organis-
mus wurden Gene für Hydrogenasen und Formiat Dehydrogenasen gefunden. Deutzmann,
Sahin und Spormann (2015) konnten zuvor für ein methanogenes Archaeon zeigen, dass
diese Enzyme eine direkte Elektronenaufnahme vermitteln. Zudem wurden im Genom des
Coriobacteriaceae-Stammes 18 c-Typ Cytochrome und 24 Ferredoxine gefunden, die auf
mögliche Exoelektrogenität hinweisen könnten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die
Zusammensetzung des Biofilms je nach Batch des Gemüsefermentates variieren kann. Da-
bei ist durchaus denkbar, dass verschiedene Organismen die gleiche Aufgabe übernehmen
können und so unterschiedliche Mikrobiome als Ganzes gleiche oder sehr ähnliche Prozesse
vermitteln können.

5.3 Nanofiltration und Produktion von Plattformchemikalien

Es konnte gezeigt werden, dass Propionat im Fermentat verbleibt, während Acetat und
Butyrat abgebaut werden. Der Effluent des bioelektrochemischen Systems enthält daher
noch Propionat, aber wenig bis keine anderen organischen Säuren. Durch Wachstumsversu-
che konnte gezeigt werden, dass es ein gutes Substrat für Produktionsstämme wie *E. coli*
darstellt, wenn es mit einem Puffer versetzt wird, um zu verhindern, dass der pH zu stark
ansteigt.

Um Propionat in größeren Konzentrationen (> 20 mM, höchste gemessene Konzentration im
Fermentat) aus dem Effluent zu erhalten, wurde eine Nanofiltration durchgeführt. Die zuvor
durchgeführte Crossflow Filtration war unbedingt erforderlich, um Schwebstoffe zu entfernen
und so ein Verstopfen der Nanofiltrationsmembran und das dadurch bedingte Erliegen
des Filtrationsprozesses zu verhindern. Die Crossflow Filtration ermöglichte das Filtrieren
des Fermentats mit einer Porengröße von 0,2 μM , was mit einer Dead-End-Filtration nicht
möglich war. Die Nanofiltration selbst war für beide Nanofiltrationsmembranen erfolgreich,
der höhere Ankonzentrierungsfaktor wurde jedoch mit der NF270-Membran erzielt. Dies
war überraschend, da die NF90-Membran die dichtere Struktur aufweist und auch in der
Literatur für eine höhere Rückhaltung von Salzen angegeben ist. Zudem wurde berechnet,
dass der Rückhalt von Propionat mit dieser Membran bei 99,01 % liegt, während dieser mit
der Membran NF270 nur bei 74,68 % lag. Der Filtrationsprozess dauerte mit der Membran
NF90 mehrere Stunden, was möglicherweise auch auf die sehr dichte Porenstruktur zurück-
zuführen ist. Die Filtration erfolgte unsteril bei Raumtemperatur. Es wäre daher denkbar,
dass das Propionat im Überstand oder auch im Filtrat während des Filtrationsprozesses
durch Kontaminanten abgebaut wurde und so das Ergebnis verfälscht wurde. Weitere Filtra-
tionstests, insbesondere unter sterilen Bedingungen, wären nötig, um weitere Rückschlüsse

auf die Performance der Membranen zu ziehen. Insgesamt zeigt sich dennoch, dass die Aneinanderreihung von Zentrifugation, Crossflow Filtration und Nanofiltration erfolgreich ist und zu einem Partikelfreien und ankonzentrierten Fermentat führt.

Weiterhin konnte zunächst gezeigt werden, dass das Fermentat auch für das Wachstum eines *E. coli*-Stammes gut geeignet ist. Wie bereits genannt, wurde dem Fermentat HEPES zugegeben, um eine Wachstumshemmung durch einen pH-Anstieg zu vermeiden. Dieser Puffer besitzt gute Pufferkapazität zwischen pH 6,8 und 8,2 und konnte so dazu beitragen, den pH bei ca. 7 zu halten. Es konnte mit Minimalmedium gezeigt werden, dass *E. coli* in der Lage ist, Propionat als Elektronendonator aerob zu nutzen. Die Deletion der RNase R sowie der Propionyl-CoA:Succinat-CoA Transferase führte zu einem schnelleren Wachstum auf Propionat. Für die RNase R wurde bereits gezeigt, dass sie einen Einfluss auf das *prp*-Operon nimmt, jedoch unter anaeroben Bedingungen. Es wird vermutet, dass diese RNase die mRNA des Operons destabilisiert. Mit dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Deletion der RNase R nicht nur unter anaeroben Bedingungen, sondern auch in Anwesenheit von Sauerstoff einen positiven Effekt auf den Propionat-Stoffwechsel hat. Die Verdopplungszeit konnte um den Faktor 3,59 gesenkt werden. Die zweite Deletion führte zu einer weiteren Abnahme der Verdopplungszeit, so dass diese im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 6,09 reduziert war. Für diese Deletion wurde beschrieben, dass sie dazu führt, dass die CoA-Gruppe von Propionyl-CoA nicht auf Succinat übertragen werden kann. So geht Propionyl-CoA nicht durch die Kopplung an Succinyl-CoA und den Citratzyklus verloren und kann den 2-Methylcitratzyklus weiter durchlaufen.

Durch einen Adaptationsversuch konnte die Verdopplungszeit der Doppelmutante weiter gesenkt werden. So wurde durch drei Transfers auf Minimalmedium mit Propionat als alleinigem Elektronendonator eine Verdopplungszeit von 7,29 Stunden erreicht, was eine Verminderung von einem Faktor von 21,00 im Vergleich zum Wildtyp darstellt. Es handelt sich nicht um eine stabile Mutation im Genom, da sich der Prozess umkehrt, sobald der Stamm auf einem anderen Elektronendonator gewachsen ist und wieder Propionat ausgesetzt wird. Diese Beobachtung beschrieb auch schon Wegener, Reeves und Aji (1968). Daher wird eine Regulation auf Transkriptionsebene angenommen. Möglicherweise kostet die volle Induktion des Operons einige Zeit. Es ist bekannt, dass das Intermediat 2-Methylcitrat als Co-Aktivator für den Transkriptionsregulator PrpR benötigt wird. Damit 2-Methylcitrat zur Verfügung steht, muss für das *prp*-Operon bereits vor der eigentlichen Induktion eine basale Transkription erfolgen. Dies wird durch die Acetyl-CoA Synthetase initiiert, da beschrieben wurde, dass diese auch unspezifische Aktivität für Propionat aufweist. Eine *E. coli*-Mutante mit einer *acs*-Deletion zeigte auf Propionat kein Wachstum (F. Liu et al., 2014). Wegener, Reeves und Aji (1968) zeigte zudem, dass die Zugabe von verschiedenen Co-Substraten in niedriger Konzentration (0,50 $\mu\text{mol/l}$) die Lag-Phase beim Wachstum auf Propionat deutlich reduziert. Es wurde postuliert, dass die Lag-Phase durch Regulation des Propionyl-CoA Carboxylase Weges bedingt sein könnte. Dieses Enzym setzt Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA um,

und fungiert daher als Alternative zum Enzym Methylmalonyl-CoA Decarboxylase. Da gezeigt wurde, dass die simultane Zugabe von Co-Faktoren wie HCO_3^- , Vitamin B₁₂ und Succinat zur erheblichen Reduktion der Lag-Phase führt (Wegener, Reeves und Ajl, 1968), liegt nahe, dass hierdurch der Methylmalonyl-CoA-Weg statt dem 2-Methylcitratzyklus stimuliert wird und zum schnelleren Abbau von Propionat führt. Denkbar wäre auch eine Kombination von oder ein Umschalten zwischen beiden Stoffwechselwegen je nach Bedingungen.

Die Wachstumskurve in Fermentat zeigt, dass der *E. coli*-Stamm keine Lag-Phase zu Beginn aufweist, Propionat im Fermentat jedoch erst nach über 80 Stunden abnimmt. Dies spricht dafür, dass der Stamm eine andere C-Quelle im Fermentat zum Wachsen nutzt, bevor er Propionat verstoffwechselt und erklärt auch die vergleichsweise niedrige Verdopplungszeit (6,52 Stunden).

Zusätzlich zum Wachstum konnte gezeigt werden, dass der *E. coli* K-12 Δrnr -Stamm in der Lage ist, in einem Zellsuspensionsassay in Fermentat Acetoin zu produzieren. Hier wurde eine hohe Umsetzungsrate von 86,01 % erreicht. Im Vergleich wurde mit der Doppelmutante in Minimalmedium zwar in der gleichen Zeit mehr Acetoin produziert, dabei wurde jedoch eine Umsetzungsrate von nur 45,53 % erreicht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Fermentat noch weitere, für die Energiegewinnung nutzbaren Substanzen enthält. In Minimalmedium stand ausschließlich Propionat als Elektronendonator zur Verfügung. Für den ersten Schritt der Acetoin-Produktion muss Propionat zu Propionyl-CoA aktiviert werden, hierfür wird ATP benötigt. Um ATP zu generieren, muss Propionat durch den 2-Methylcitratzyklus fließen und anschließend das entstehene Pyruvat in den Citratzyklus eingehen. Hierdurch wird ein Molekül ATP (bzw. GTP) generiert, das für die Aktivierung von Propionat zu Propionyl-CoA eingesetzt werden kann. Doch das entstandene Pyruvat, das in den Citratzyklus eingeschleust wurde, kann dementsprechend nicht mehr für die Acetoin-Synthese genutzt werden. Dienen andere Substanzen für die Synthese von ATP, kann theoretisch jedes aus Propionat über den 2-Methylcitratzyklus entstandene Pyruvat weiter zu Acetoin umgesetzt werden. So könnten im Fermentat beispielsweise Aminosäuren enthalten sein, die in den Citratzyklus einfließen und so ATP generieren. Aus Propionat gebildetes Pyruvat könnte so zur Synthese von Acetoin genutzt werden. Weitere Zellsuspensionsassays unter Zugabe von zusätzlichen Energiequellen zum Minimalmedium könnten zeigen, ob hierdurch eine höhere Umsetzungsrate erreicht werden kann.

Es konnte auch erfolgreich 1-Propanol aus Propionat produziert werden. Alle Versuche wurden hier mit Minimalmedium durchgeführt, um die verschiedenen Konstrukte zu testen. Es konnte mit allen Konstrukten 1-Propanol produziert werden, die niedrigste Konzentration (2,01 mM) wurde mit dem Konstrukt pBAD-prpE^{mut}-adhE^{mut} erreicht. So scheinen die Mutationen in *prpE* und *adhE* hier eher einen negativen Effekt auf die 1-Propanol-Synthese zu nehmen. Das Konstrukt mit nur einer Mutation in *prpE* produzierte die zweitniedrigste Konzentration (2,96 mM), während das Konstrukt mit der Mutation in *adhE* die nächst höhere Konzentration (3,52 mM) erreichte. Am meisten 1-Propanol wurde mit dem Konstrukt mit

prpE und *adhE* ohne Mutationen produziert (3,65 mM). Dies ist unerwartet, da insbesondere der Mutation in der *adhE* ein positiver Effekt zugeschrieben wurde, da die Alkohol Dehydrogenase unter aeroben Bedingungen reprimiert wird. Erst durch die Punktmutation sollte das Enzym aerob aktiv sein (Holland-Staley et al., 2000). Dies kann hier nicht bestätigt werden, da alle Experimente unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden. Denkbar wäre jedoch, dass sich im Inneren der Kultur im Schüttelkolben eine eher sauerstoffarme Atmosphäre gebildet hat, da in der Kultur mit OD₆₀₀ 5 eine hohe Zelldichte herrscht und möglicherweise nicht genügend Sauerstoff nachdiffundieren kann, um allen Zellen zur Verfügung zu stehen. In diesem Fall wäre Sauerstoff nicht oder nur begrenzt als Elektronenakzeptor verfügbar. Es ist möglich, dass *E. coli* Glycerin fermentativ ohne Elektronenakzeptor nutzt. In diesem Fall wäre eine Umgebung vorherrschend, in der ATP gewonnen werden kann, um Propionat zu Propionyl-CoA zu aktivieren und die Alkohol Dehydrogenase aktiv ist, um Propionyl-CoA zu 1-Propanol umzusetzen. Für die Mutation im *prpE* konnte ebenfalls kein positiver, sondern eher ein negativer Effekt auf die 1-Propanol-Synthese festgestellt werden, da alle Konstrukte mit dieser Mutation eine niedrigere Konzentration des Alkohols produzierten. Die Theorie der Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen, die das Enzym inhibiert, scheint in dieser Arbeit und den verwendeten Bedingungen nicht auf das Enzym zuzutreffen. Das Wildtyp-Enzym weist hier eine höhere Aktivität auf als die Mutante.

Für alle Konstrukte wurden unerwartet hohe Umsetzungsraten von über 100 % erreicht. Da ATP hier aus dem Stoffwechsel von Glycerin gewonnen werden kann, wäre eine theoretisch komplette Umsetzung des Propionats zu 1-Propanol durchaus möglich. Eine Rate >100 % spricht jedoch dafür, dass auch hier ein anderes Substrat zusätzlich in die 1-Propanol-Synthese eingeflossen ist. Da im Minimalmedium neben Propionat nur Glycerin als Elektronendonator verfügbar ist, wäre nur die Nutzung von Glycerin für die 1-Propanol-Synthese möglich. Bisher sind in *E. coli* jedoch nur (zumindest teilweise) synthetische Produktionswege von Glycerin hin zu 1-Propanol beschrieben worden (Jun Choi et al., 2012; Matsubara et al., 2016). Theoretisch möglich wäre eine Umsetzung von Glycerin zu 1-Propanol nur über den Citratzyklus und den verknüpften Methylmalonyl-CoA-Weg (vgl. Abb. 5). Succinyl-CoA aus dem Citratzyklus könnte durch zwei Enzyme des Methylmalonyl-CoA-Weges (die Methylmalonyl-CoA Mutase ScpA und die Methylmalonyl-CoA Decarboxylase ScpB) zu Propionyl-CoA umgesetzt werden. Die weiteren Schritte zu 1-Propanol könnten durch die Alkohol-Dehydrogenase katalysiert werden. Die Methylmalonyl-CoA Mutase ScpA ist Vitamin B₁₂- bzw. Coenzym B₁₂-abhängig, und *E. coli* ist in der Lage, Coenzym B₁₂ aus Vitamin B₁₂ zu synthetisieren (Haller et al., 2000). Es wurde Vitamin B₁₂ im Minimalmedium über die Zugabe der Vitaminlösung supplementiert. Srirangan et al. (2017) postulierten eine Konzentration von 0,2 µM als Schwellenwert für Aktivität des Enzyms. Über die Zugabe der Vitaminlösung wurden 0,001 mg/l zugegeben, was in etwa einer Konzentration von 0,00073 µM entspricht. Daher läge die hier vorliegende Konzentration theoretisch zu niedrig, so dass die Aktivität des Enzyms nicht garantiert ist.

Insgesamt lässt sich die produzierte Konzentration von 456,46 mg/l an 1-Propanol (7,60 mM), zumindest teilweise, mit Literaturwerten vergleichen. Srirangan et al. (2017) produzierten 150 mg/l 1-Propanol (2,50 mM) aus Glucose und Succinat. Hiefür nutzen sie ein Tripel-Plasmid-System und überexprimierten die Succinyl-CoA Synthetase, die Enzyme des Methylmalonyl-CoA-Weges sowie verschiedene Alkohol-Dehydrogenasen. Die Produktion erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit 20 g/l Glucose sowie 4 g/l Succinat und einer OD_{600} von 15. Möglicherweise ist die niedrigere Ausbeute darauf zurückzuführen, dass über den Citratzyklus nicht genug Succinat zur Verfügung gestellt werden konnte und dass auch andere Produkte gebildet wurden (Laktat, Acetat, Ethanol). Eine andere Studie etablierte einen Threonin-überproduzierenden *E. coli*. Aus Threonin wurde über andere Schritte Propionat produziert, das ebenfalls über die Acetyl-CoA:Acetoacetyl-CoA Synthase (AtoDA) und eine Alkohol Dehydrogenase zu 1-Propanol umgesetzt wurde. Mithilfe eines aeroben Fed-Batch Prozesses wurden deutlich höhere 1-Propanol-Konzentrationen von 10,8 g/l (179,73 mM) aus 100 g/l Glucose und 10,3 g/l (171,41 mM) aus 40 g/l Glycerin erreicht (Jun Choi et al., 2012). Dabei stellten sich auch sehr hohe OD_{600} -Werte von 24,5 (Glycerin) und 29,5 (Glucose) ein (Jun Choi et al., 2012). In dieser Arbeit wurde Propionat statt Glucose als Substrat für die 1-Propanol-Synthese genutzt. Der weitere Verlauf mit AtoDA und der AdhE entspricht jedoch auch dem bei Jun Choi et al. (2012). Daher könnte auch in diesem Fall mithilfe eines vergleichbaren Fed-Batch-Verfahrens sehr wahrscheinlich eine höhere 1-Propanol-Ausbeute erreicht werden, sofern Glycerin nachgefüttert wird. In diesem Fall sollte auch eine höhere OD_{600} einen positiven Effekt auf die Ausbeute haben. Ein Zellsuspensionsassay mit Fermentat könnte zudem Aufschluss darüber geben, ob die 1-Propanol-Produktion hier auch ohne oder mit verminderter Zugabe von Glycerin möglich wäre. Es wurde bereits gezeigt, dass der *E. coli*-Stamm in Fermentat besser wächst als in Minimalmedium mit Propionat, daher könnten in Fermentat andere Elektronendonoren verfügbar sein, die für die ATP-Synthese genutzt werden können.

6 Ausblick

Propionat ist eine Fettsäure, die häufig in der Natur und vor allem auch bei der Biogasproduktion auftritt. Mit dem beschriebenen System konnte aus dem Gemüsefermentat Strom produziert werden und Propionat wurde weiter genutzt für die Produktion von Plattformchemikalien. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass sie ebenfalls im System abgebaut werden kann. So kann mit dem System flexibel darüber entschieden werden, ob Propionat zu Strom oder zu Plattformchemikalien umgesetzt werden soll. Im System wurde gezeigt, dass die Coulomb'sche Effizienz eher niedrig liegt, was auf Methanogenese zurückzuführen ist. Über Veränderung des angelegten Potentials könnte möglicherweise eine Verbesserung des Prozesses erreicht werden. Aelterman et al. (2008) und Sleutels et al. (2011) zeigten, dass Werte des Potentials im Bereich zwischen -200 mV und -250 mV (vs. Ag/AgCl) eine höhere Coulomb'sche Effizienz erreichten als niedrigere (-450 mV vs Ag/AgCl). In dieser Arbeit wurde ein Potential von 0 mV vs. SHE angelegt, was -199 mV vs. Ag/AgCl entspricht. Damit liegt dieses System auch in dem beschriebenen Rahmen. Weitere Versuche mit anderen Potentialen könnten Aufschluss darüber geben, ob sich der Prozess diesbezüglich verbessern lässt. Über eine Vergrößerung der Anode könnte ein besseres Anodenoberflächen:Volumen-Verhältnis erreicht und so Anoden-atmende Reaktionen bevorzugt werden. Auch durch andere Materialien oder eine Oberflächenfunktionalisierung/-modifikation könnte die Zugänglichkeit der Anode für die entsprechenden Mikroorganismen verbessert werden. So wurde bereits gezeigt, dass eine Behandlung mit Ammoniumgas zu einer höheren Oberflächenladung und so zu einer verbesserten Performance der verwendeten Mikrobiellen Brennstoffzelle führte (Cheng und Logan, 2007). In Anbetracht dessen, dass sich mit diesem Projekt ein Energie-effizientes System entwickelt werden sollte, muss im Zusammenhang betrachtet werden, ob derartige, zusätzliche Verbesserungen des System eher Energie- bzw. Kostenminimierungen oder -maximierungen für die Gesamtenergiebilanz darstellen. Ein interessanter Ansatz ist daher die erst vor Kurzem beschriebene Verwendung von Biomasse, wie z.B. Kuhdung, als Material für die Carbonisierung und anschließender Nutzung als Anodenmaterial (Feng et al., 2018).

Für die Produktion von Plattformchemikalien ist ebenso eine Verbesserung des Prozesses möglich. Da gezeigt wurde, dass *E. coli* mit Propionat als einziger Kohlenstoffquelle recht langsam wächst, besteht die Möglichkeit, andere Stämme für die Biotransformation zu nutzen. In der Literatur ist wenig beschrieben bezüglich der Produktion von Plattformchemikalien aus Propionat. Es wurde jedoch gezeigt, dass beispielsweise *C. glutamicum* und *Ralstonia eutropha* Propionat als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können (Claes, Pühler und Kalinowski, 2002; Brämer und Steinbüchel, 2001). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass *C. glutamicum* in vom bioelektrochemischen System behandelten Fermentat

schneller wachsen kann als der *E. coli*-Stamm. Weitere Untersuchungen und genetische Modifikationen könnten mit diesen Stämmen durchgeführt werden, um Acetoin, 1-Propanol oder andere Plattformchemikalien herzustellen.

Quellen- und Literaturverzeichnis

- Abbanat, D. R. und J. G. Ferry (1990). "Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*." In: *Journal of bacteriology* 172.12, pp. 7145–50. ISSN: 0021-9193.
- Aelterman, P. et al. (2008). "The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 78.3, pp. 409–418. ISSN: 0175-7598.
- Akuzawa, M. et al. (2011). "Distinctive Responses of Metabolically Active Microbiota to Acidification in a Thermophilic Anaerobic Digester". In: *Microbial Ecology* 61.3, pp. 595–605. ISSN: 0095-3628.
- Aldor, I. S. et al. (2002). "Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium." In: *Applied and environmental microbiology* 68.8, pp. 3848–54. ISSN: 0099-2240.
- Angelidaki, I. et al. (2011). "Biomethanation and its potential". In: *Methods in Enzymology* 494, pp. 327–351. ISSN: 0076-6879.
- Angosto, J., J. Fernández-López und C. Godínez (2015). "Brewery and liquid manure wastewaters as potential feedstocks for microbial fuel cells: a performance study". In: *Environmental Technology* 36.1, pp. 68–78. ISSN: 0959-3330.
- Anthony, R. S. und L. B. Spector (1971). "Exchange reactions catalyzed by acetate kinase." In: *The Journal of biological chemistry* 246.20, pp. 6129–35. ISSN: 0021-9258.
- Appels, L. et al. (2011). "Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges". In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15.9, pp. 4295–4301. ISSN: 1364-0321.
- Arimori, S. et al. (2002). "A D-glucose selective fluorescent internal charge transfer (ICT) sensor". In: *Tetrahedron Letters* 43.5, pp. 911–913. ISSN: 0040-4039.
- Asai, Y. et al. (2017). "Comparative evaluation of wastewater-treatment microbial fuel cells in terms of organics removal, waste-sludge production, and electricity generation." In: *Bioresources and bioprocessing* 4.1, p. 30. ISSN: 2197-4365.
- Baba, T. et al. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection". In: *Molecular Systems Biology* 2.1, p. 2006.0008. ISSN: 1744-4292.
- Baek, G. et al. (2018). "Role and Potential of Direct Interspecies Electron Transfer in Anaerobic Digestion". In: *Energies* 11.1, p. 107. ISSN: 1996-1073.
- Baikar, V., A. Rane und R. Deopurkar (2017). "Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Bacillus megaterium* VB89 Isolated from Nisargruna Biogas Plant". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183.1, pp. 241–253. ISSN: 1559-0291.
- Barchinger, S. E. et al. (2016). "Regulation of gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 during electron acceptor limitation and bacterial nanowire formation". In: *Applied and Environmental Microbiology* 82.17, pp. 5428–5443. ISSN: 1098-5336.
- Barelli, C. et al. (2015). "Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: Implications for conservation". In: *Scientific Reports* 5, p. 14862. ISSN: 2045-2322.
- Bauer, C. et al. (2008). "Methanogens in biogas production from renewable resources - A novel molecular population analysis approach". In: *Water Science and Technology* 58.7, pp. 1433–1439. ISSN: 0273-1223.

- Blankschien, M. D., J. M. Clomburg und R. Gonzalez (2010). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol". In: *Metabolic Engineering* 12.5, pp. 409–419. ISSN: 1096-7176.
- BMWi (2018). *Erneuerbare Energien in Deutschland - Daten zur Entwicklung im Jahr 2017*. Umweltbundesamt, pp. 1–18. ISBN: 2363-829X.
- Bond, D. R. und D. R. Lovley (2003). "Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes." In: *Applied and environmental microbiology* 69.3, pp. 1548–55. ISSN: 0099-2240.
- Bouallagui, H. et al. (2005). "Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes". In: *Process Biochemistry* 40.3-4, pp. 989–995. ISSN: 0032-9592.
- Brämer, C. O. und A. Steinbüchel (2001). "The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism". In: *Microbiology* 147.8, pp. 2203–2214. ISSN: 1350-0872.
- Breuer, M. et al. (2015). "Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: Structures, functions and opportunities". In: *Journal of the Royal Society Interface* 12.102, pp. 20141117–20141117. ISSN: 1742-5662.
- Brown, R. K. et al. (2015). "Examining sludge production in bioelectrochemical systems treating domestic wastewater". In: *Bioresource Technology* 198, pp. 913–917. ISSN: 18732976.
- Brunner, S. et al. (2019). "Efficient Bioelectrochemical Conversion of Industrial Wastewater by Specific Strain Isolation and Community Adaptation". In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, p. 23. ISSN: 2296-4185.
- Buchfink, B., C. Xie und D. H. Huson (2014). "Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND". In: *Nature Methods* 12.1, pp. 59–60. ISSN: 1548-7105.
- Bursac, T., J. A. Gralnick und J. Gescher (2017). "Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*". In: *Biotechnology and Bioengineering* 114.6, pp. 1283–1289. ISSN: 1097-0290.
- Chassard, C. et al. (2012). "*Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota". In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62.1, pp. 138–143. ISSN: 1466-5026.
- Chaudhuri, S. K. und D. R. Lovley (2003). "Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells". In: *Nature Biotechnology* 21.10, pp. 1229–1232. ISSN: 1087-0156.
- Chen, J. et al. (2010). "Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source". In: *Bioresource Technology* 101.22, pp. 8902–8906. ISSN: 0960-8524.
- Chen, Q. et al. (2011). "Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources". In: *Applied and Environmental Microbiology* 77.14, pp. 4886–4893. ISSN: 0099-2240.
- Chen, T. et al. (2013). "Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures". In: *Journal of Biotechnology* 168.4, pp. 499–505. ISSN: 0168-1656.
- Cheng, S., H. Liu und B. E. Logan (2006). "Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells". In: *Environmental Science and Technology* 40.1, pp. 364–369. ISSN: 0013-936X.
- Cheng, S. und B. E. Logan (2007). "Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells". In: *Electrochemistry Communications* 9.3, pp. 492–496. ISSN: 1388-2481.

- Chianese, A. et al. (2016). *Treatment of Wastewater in H-Type MFC with Protonic Exchange Membrane : Experimental Study of Organic Carbon and Ammonium Reduction with Electrochemical Characterization*.
- Choudhury, P. et al. (2017). "Performance improvement of microbial fuel cell (MFC) using suitable electrode and Bioengineered organisms: A review". In: *Bioengineered* 8.5, pp. 471–487. ISSN: 2165-5987.
- Claes, W. A., A. Pühler und J. Kalinowski (2002). "Identification of two prpDBC gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle". In: *Journal of Bacteriology* 184.10, pp. 2728–2739. ISSN: 0021-9193.
- Clavel, T., P. Lepage und C. Charrier (2014). "The Family Coriobacteriaceae". In: *The Prokaryotes*. Ed. by E. Rosenberg et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 201–238. ISBN: 978-3-642-30137-7.
- Datsenko, K. A. und B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.12, pp. 6640–6645. ISSN: 0027-8424.
- Daubinger, P. et al. (2014). "Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes-A cyclic voltammetry study". In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 16.18, pp. 8392–8399. ISSN: 1463-9076.
- Demirer, G. und S. Chen (2004). "Effect of retention time and organic loading rate on anaerobic acidification and biogasification of dairy manure". In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79.12, pp. 1381–1387. ISSN: 0268-2575.
- Deutzmann, J. S., M. Sahin und A. M. Spormann (2015). "Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis". In: *mBio* 6.2, e00496–15. ISSN: 2150-7511.
- Deval, A. S. et al. (2017). "Sequential microbial activities mediated bioelectricity production from distillery wastewater using bio-electrochemical system with simultaneous waste remediation". In: *International Journal of Hydrogen Energy* 42.2, pp. 1130–1141. ISSN: 0360-3199.
- Dhiman, S. S. et al. (2018). "Producing methane, methanol and electricity from organic waste of fermentation reaction using novel microbes". In: *Bioresource Technology* 258, pp. 270–278. ISSN: 1873-2976.
- Dimou, M. et al. (2011). "Cloning, characterization and transcriptional analysis of two phosphate acetyltransferase isoforms from *Azotobacter vinelandii*". In: *Molecular Biology Reports* 38.6, pp. 3653–3663. ISSN: 0301-4851.
- Dolan, S. K. et al. (2018). "Loving the poison: The methylcitrate cycle and bacterial pathogenesis". In: *Microbiology (United Kingdom)* 164.3, pp. 251–259. ISSN: 1465-2080.
- Dolch, K., J. Wuske und J. Gescher (2015). "Genomic barcode-based analysis of exoelectrogens in wastewater biofilms grown on anode surfaces". In: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26.3, pp. 511–520. ISSN: 1738-8872.
- Dores-Silva, P. R., M. D. Landgraf und M. O. O. Rezende (2018). "Humification process in different kinds of organic residue by composting and vermicomposting: have microbioreactors really accelerated the process?" In: *Environmental Science and Pollution Research* 25.18, pp. 17490–17498. ISSN: 0944-1344.
- Du, H. und F. Li (2016). "Size effects of potato waste on its treatment by microbial fuel cell". In: *Environmental Technology* 37.10, pp. 1305–1313. ISSN: 0959-3330.
- Dwyer, D. F. et al. (1988). "Bioenergetic conditions of butyrate metabolism by a syntrophic, anaerobic bacterium in coculture with hydrogen-oxidizing methanogenic and sulfido-

- genic bacteria.” In: *Applied and environmental microbiology* 54.6, pp. 1354–9. ISSN: 0099-2240.
- Engle, M. et al. (2009). “Thermobrachium celere gen. nov., sp. nov., a Rapidly Growing Thermophilic, Alkalitolerant, and Proteolytic Obligate Anaerobe”. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 46.4, pp. 1025–1033. ISSN: 0020-7713.
- Eppinger, M. et al. (2011). “Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319”. In: *Journal of Bacteriology* 193.16, pp. 4199–4213. ISSN: 0021-9193.
- Ersahin, M. E. et al. (2011). “Anaerobic Treatment of Industrial Effluents: An Overview of Applications”. In: *Waste Water - Treatment and Reutilization*. IntechOpen. ISBN: 978-953-307-249-4.
- Esquivel-Elizondo, S. et al. (2017). “Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions.” In: *mSystems* 2.4. ISSN: 2379-5077.
- Estevez-Canales, M. et al. (2015). “A severe reduction in the cytochrome C content of *Geobacter sulfurreducens* eliminates its capacity for extracellular electron transfer”. In: *Environmental Microbiology Reports* 7.2, pp. 219–226. ISSN: 1758-2229.
- Fachverband Biogas (2018). *Branchenzahlen 2017 und Prognose der Branchenentwicklung 2018*.
- FAO (2011). “Global Food Losses and Food Waste - Extent, causes and prevention.” In: *Global Food Losses and Food Waste - Extent, causes and prevention*. Rome. ISBN: 978-92-5-107205-9.
- Feng, H. et al. (2018). “Carbonized cow dung as a high performance and low cost anode material for bioelectrochemical systems”. In: *Frontiers in Microbiology* 9.NOV, p. 2760. ISSN: 1664302X.
- Flayac, J.-C., E. Trably und N. Bernet (2018). “Microbial Ecology of Anodic Biofilms: From Species Selection to Microbial Interactions”. In: *Microbial Fuel Cell*. Cham: Springer International Publishing, pp. 63–85.
- Förster, A. H. et al. (2017). “Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain”. In: *Biotechnology for Biofuels* 10.1, p. 65. ISSN: 1754-6834.
- Freguia, S. et al. (2007). “Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation.” In: *Environmental science & technology* 41.8, pp. 2915–21. ISSN: 0013-936X.
- Frigon, J. C. und S. R. Guiot (1995). “Impact of liquid-to-gas hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor”. In: *Enzyme and Microbial Technology* 17.12, pp. 1080–1086. ISSN: 0141-0229.
- Fukuzaki, S. et al. (1990). “Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate.” In: *Applied and environmental microbiology* 56.3, pp. 719–23. ISSN: 0099-2240.
- Gibson, D. G. et al. (2009). “Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases”. In: *Nature Methods* 6.5, pp. 343–345. ISSN: 1548-7091.
- Gimkiewicz, C. und F. Harnisch (2013). “Waste Water Derived Electroactive Microbial Biofilms: Growth, Maintenance, and Basic Characterization”. In: *Journal of Visualized Experiments* 82, e50800. ISSN: 1940-087X.
- Golitsch, F. (2016). “Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen”. PhD thesis. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), p. 263.

- Gollapalli, M. und S. H. Kota (2018). "Methane emissions from a landfill in north-east India: Performance of various landfill gas emission models". In: *Environmental Pollution* 234, pp. 174–180. ISSN: 1873-6424.
- Goodrich, J. K. et al. (2014). "Human genetics shape the gut microbiome." In: *Cell* 159.4, pp. 789–99. ISSN: 1097-4172.
- Goswami, R. et al. (2016). *An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: A step towards sustainable waste management*.
- Graf, J. (2014). "The Family Rikenellaceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 857–859.
- Greene, A. C. (2014). "The Family Desulfuromonadaceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 143–155.
- Guo, Y. und D. J. Oliver (2012). "E. coli propionyl-CoA synthetase is regulated in vitro by an intramolecular disulfide bond". In: *Applied Biochemistry and Microbiology* 48.3, pp. 257–261. ISSN: 0003-6838.
- Haller, T. et al. (2000). "Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by Escherichia coli." In: *Biochemistry* 39.16, pp. 4622–9. ISSN: 0006-2960.
- Hatti-Kaul, R. et al. (2007). "Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective". In: *Trends in Biotechnology* 25.3, pp. 119–124. ISSN: 0167-7799.
- Hattori, S. (2008). "Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments." In: *Microbes and environments* 23.2, pp. 118–27. ISSN: 1342-6311.
- Hattori, S. et al. (2001). "Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with methanogens." In: *Journal of bioscience and bioengineering* 91.3, pp. 294–8. ISSN: 1389-1723.
- Hegde, G. und P. Pullammanappallil (2007). "Comparison of Thermophilic and Mesophilic One-Stage, Batch, High-Solids Anaerobic Digestion". In: *Environmental Technology* 28.4, pp. 361–369. ISSN: 0959-3330.
- Heilmann, J. und B. E. Logan (2006). "Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell." In: *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation* 78.5, pp. 531–7. ISSN: 1061-4303.
- Hilal, N. et al. (2005). "Characterisation of nanofiltration membranes using atomic force microscopy". In: *Desalination* 177.1-3, pp. 187–199. ISSN: 0011-9164.
- Holland-Staley, C. A. et al. (2000). "Aerobic activity of Escherichia coli alcohol dehydrogenase is determined by a single amino acid." In: *Journal of bacteriology* 182.21, pp. 6049–6054. ISSN: 0021-9193.
- Horschig, T. et al. (2019). "From Paris agreement to business cases for upgraded biogas: Analysis of potential market uptake for biomethane plants in Germany using biogenic carbon capture and utilization technologies". In: *Biomass and Bioenergy* 120, pp. 313–323. ISSN: 0961-9534.
- Horswill, A. R. und J. C. Escalante-Semerena (1999). "Salmonella typhimurium LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle." In: *Journal of bacteriology* 181.18, pp. 5615–23. ISSN: 0021-9193.
- Horswill, A. R. und J. C. Escalante-Semerena (1997). "Propionate catabolism in Salmonella typhimurium LT2: Two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon". In: *Journal of Bacteriology* 179.3, pp. 928–940. ISSN: 0021-9193.

- Huang, B. et al. (2018). "The Functional Mechanisms and Application of Electron Shuttles in Extracellular Electron Transfer". In: *Current Microbiology* 75.1, pp. 99–106. ISSN: 0343-8651.
- Huang, L. und B. E. Logan (2008). "Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 80.2, pp. 349–355. ISSN: 0175-7598.
- Huber, H. und K. O. Stetter (2006). "Thermoplasmatales". In: *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, pp. 101–112.
- Jain, R. et al. (2015). "Systematically Engineering Escherichia coli for Enhanced Production of 1,2-Propanediol and 1-Propanol". In: *ACS Synthetic Biology* 4.6, pp. 746–756. ISSN: 2161-5063.
- Jantsch, T. G. und B. Mattiasson (2004). "An automated spectrophotometric system for monitoring buffer capacity in anaerobic digestion processes". In: *Water Research* 38.17, pp. 3645–3650. ISSN: 0043-1354.
- Jensen, J. S. (2016). "Mycoplasma and Ureaplasma". In: *Infectious Diseases*. Elsevier, 1660–1665.e2. ISBN: 978-1-59259-965-3.
- Jiang, Y.-B. et al. (2016). "Characterization of Electricity Generated by Soil in Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria". In: *Frontiers in Microbiology* 7, p. 1776. ISSN: 1664-302X.
- Jun Choi, Y. et al. (2012). "Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of 1-propanol". In: *Metabolic Engineering* 14.5, pp. 477–486. ISSN: 1096-7176.
- Kang, C. S. et al. (2014). "Enhanced current production by Desulfovibrio desulfuricans biofilm in a mediator-less microbial fuel cell". In: *Bioresource Technology* 165, pp. 27–30. ISSN: 0960-8524.
- Kern, M. (2014). "Aufwand und Nutzen einer optimierten Bioabfallverwertung hinsichtlich Energieeffizienz, Klima- und Ressourcenschutz". In: *Igarss 2014* 43/2010.1, pp. 1–5. ISSN: 1862-4804.
- Kim, B. Y. et al. (2006). "Ureibacillus suwonensis sp. nov., isolated from cotton waste composts". In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56.3, pp. 663–666. ISSN: 1466-5026.
- Kjeldsen, P. et al. (2002). "Present and long-term composition of MSW landfill leachate: A review". In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 32.4, pp. 297–336. ISSN: 1064-3389.
- Kobayashi, H. et al. (2017). "Draft Genome Sequence of a Novel Coriobacteriaceae sp. Strain, EMTCatB1, Reconstructed from the Metagenome of a Thermophilic Electromethanogenic Biocathode". In: *Genome Announcements* 5.10, e00022–17. ISSN: 2169-8287.
- Koros, W. J., Y. H. Ma und T. Shimidzu (1996). "Terminology for membranes and membrane processes". In: *Pure and Applied Chemistry* 68.7, pp. 1479–1489. ISSN: 1365-3075.
- Kosaka, T. et al. (2006). "Reconstruction and regulation of the central catabolic pathway in the thermophilic propionate-oxidizing syntroph Pelotomaculum thermopropionicum". In: *Journal of Bacteriology* 188.1, pp. 202–210. ISSN: 0021-9193.
- Krieg, N. R. et al., eds. (2010). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology - Volume 4*. Second. New York: Springer. ISBN: 978-0-387-95042-6.
- Krishna, K. V., O. Sarkar und S. Venkata Mohan (2014). "Bioelectrochemical treatment of paper and pulp wastewater in comparison with anaerobic process: Integrating chemical coagulation with simultaneous power production". In: *Bioresource Technology* 174, pp. 142–151. ISSN: 1873-2976.

- Kuever, J. (2014). "The Family Desulfovibrionaceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 107–133.
- Kumada, K. (1965). "Studies on the colour of humic acids". In: *Soil Science and Plant Nutrition* 11.4, pp. 11–16. ISSN: 0038-0768.
- Lee, J. W., H. U. Kim, et al. (2011). "Microbial production of building block chemicals and polymers". In: *Current Opinion in Biotechnology* 22.6, pp. 758–767. ISSN: 0958-1669.
- Lee, J. W., T. Y. Kim, et al. (2011). "Systems metabolic engineering for chemicals and materials". In: *Trends in Biotechnology* 29.8, pp. 370–378. ISSN: 0167-7799.
- Lemoigne, M., C. Peaud Lenoel und M. Croson (1950). "Assimilation of acetylacetic acid and beta-hydroxybutyric acid by *B. megatherium*." In: *Annales de l'Institut Pasteur* 78.6, pp. 705–10. ISSN: 0020-2444.
- Lens, P. N. et al. (1996). "Propionate degradation by mesophilic anaerobic sludge: Degradation pathways and effects of other volatile fatty acids". In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82.4, pp. 387–391. ISSN: 0922-338X.
- Li, H. et al. (2016). "Electricity generation from food wastes and characteristics of organic matters in microbial fuel cell". In: *Bioresource Technology* 205, pp. 104–110. ISSN: 0960-8524.
- Liang, B. et al. (2015). "Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation". *eng*. In: *AMB Express* 5.1, p. 117. ISSN: 2191-0855.
- Limenitakis, J. et al. (2013). "The 2-methylcitrate cycle is implicated in the detoxification of propionate in *Toxoplasma gondii*". In: *Molecular Microbiology* 87.4, pp. 894–908. ISSN: 0950-382X.
- Liu, F. et al. (2014). "Acs is essential for propionate utilization in *Escherichia coli*". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449.3, pp. 272–277. ISSN: 1090-2104.
- Liu, H. et al. (2008). "Scale-up of membrane-free single-chamber microbial fuel cells". In: *Journal of Power Sources* 179.1, pp. 274–279. ISSN: 0378-7753.
- Logan, B. E. (2009). "Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells". *en*. In: *Nature Reviews Microbiology* 7.5, pp. 375–381. ISSN: 1740-1526.
- Logan, B. E. et al. (2006). "Microbial fuel cells: Methodology and technology". In: *Environmental Science and Technology* 40.17, pp. 5181–5192. ISSN: 0013-936X.
- London, R. E. et al. (1999). "Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli*". In: *Journal of Bacteriology* 181.11, pp. 3562–3570. ISSN: 0021-9193.
- Lovley, D. R. et al. (1996). "Humic substances as electron acceptors for microbial respiration". In: *Nature* 382.6590, pp. 445–448. ISSN: 0028-0836.
- Lv, Z. et al. (2019). "Effects of various feedstocks on isotope fractionation of biogas and microbial community structure during anaerobic digestion". In: *Waste Management* 84, pp. 211–219. ISSN: 0956-053X.
- Martini, M. et al. (2014). "The Family Achaeplasmataceae (Including Phytoplasmata)". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 469–504.
- Mathuriya, A. S., D. A. Jadhav und M. M. Ghangrekar (2018). "Architectural adaptations of microbial fuel cells". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102.22, pp. 9419–9432. ISSN: 1432-0614.
- Matsubara, M. et al. (2016). "Fermentative production of 1-propanol from D-glucose, L-rhamnose and glycerol using recombinant *Escherichia coli*". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122.4, pp. 421–426. ISSN: 1347-4421.

- McInerney, M. J. et al. (1981). "Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium". In: *Applied and Environmental Microbiology* 41.4, pp. 1029–1039. ISSN: 0099-2240.
- Membrillo-Hernandez, J. et al. (2000). "Evolution of the adhE gene product of Escherichia coli from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins." In: *The Journal of biological chemistry* 275.43, pp. 33869–75. ISSN: 0021-9258.
- Meng, X. et al. (2017). "Methane production and characteristics of the microbial community in a two-stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses". In: *Bioresource Technology* 241, pp. 1050–1059. ISSN: 09608524.
- Milazzo, M. F. et al. (2013). "Brassica biodiesels: Past, present and future". In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 18, pp. 350–389. ISSN: 1364-0321.
- Moqsud, M. A. et al. (2013). "Microbial fuel cell (MFC) for bioelectricity generation from organic wastes". In: *Waste Management* 33.11, pp. 2465–2469. ISSN: 0956-053X.
- Morotomi, M., F. Nagai und Y. Watanabe (2012). "Description of Christensenella minuta gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov." In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62.1, pp. 144–149. ISSN: 1466-5026.
- Müller, B., L. Sun und A. Schnürer (2013). "First insights into the syntrophic acetate-oxidizing bacteria - a genetic study". In: *MicrobiologyOpen* 2.1, pp. 35–53. ISSN: 2045-8827.
- Müller, N. et al. (2010). "Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: From genomes to reaction mechanisms". In: *Environmental Microbiology Reports* 2.4, pp. 489–499. ISSN: 1758-2229.
- Murto, M., L. Björnsson und B. Mattiasson (2004). "Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure". In: *Journal of Environmental Management* 70.2, pp. 101–107. ISSN: 0301-4797.
- Nakamura, L. K., I. Blumenstock und D. Claus (2009). "Taxonomic Study of Bacillus coagulans Hammer 1915 with a Proposal for Bacillus smithii sp. nov." In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 38.1, pp. 63–73. ISSN: 0020-7713.
- Narihiro, T. et al. (2012). "Quantitative detection of previously characterized syntrophic bacteria in anaerobic wastewater treatment systems by sequence-specific rRNA cleavage method". In: *Water Research* 46.7, pp. 2167–2175. ISSN: 0043-1354.
- Nielsen, H. B., H. Uellendahl und B. K. Ahring (2007). "Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter". In: *Biomass and Bioenergy* 31.11-12, pp. 820–830. ISSN: 0961-9534.
- Niu, L. et al. (2009). "Tepidimicrobium xylanilyticum sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus Tepidimicrobium". In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59.11, pp. 2698–2701. ISSN: 1466-5026.
- Oh, S. E. und B. E. Logan (2005). "Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies". eng. In: *Water Research* 39.19, pp. 4673–4682. ISSN: 0043-1354.
- Önen, S., A. Nsair und K. Kuchta (2018). "Innovative operational strategies for biogas plant including temperature and stirring management". In: *Waste Management & Research*, p. 0734242X1881680. ISSN: 0734-242X.
- Oren, A. (2014a). "The family Methanobacteriaceae". In: *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 165–193. ISBN: 978-3-642-38954-2.

- Oren, A. (2014b). "The family Methanosarcinaceae". In: *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 259–281. ISBN: 978-3-642-38954-2.
- Pirbadian, S. et al. (2014). "Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.35, pp. 12883–8. ISSN: 1091-6490.
- Plugge, C. M., C. Dijkema und A. J. Stams (1993). "Acetyl-CoA cleavage pathway in a syntrophic propionate oxidizing bacterium growing on fumarate in the absence of methanogens". In: *FEMS Microbiology Letters* 110.1, pp. 71–76. ISSN: 1574-6968.
- Provenzano, M. R. et al. (2016). "Co-treatment of fruit and vegetable waste in sludge digesters: Chemical and spectroscopic investigation by fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy". In: *Waste Management* 50, pp. 283–289. ISSN: 0956-053X.
- Ramaraj, R. und N. Dussadee (2015). "Biological Purification Processes for Biogas Using Algae Cultures: A Review". In: *International Journal of Sustainable and Green Energy. Special Issue: Renewable Energy Applications in the Agricultural Field and Natural Resource Technology* 4.1, pp. 20–32. ISSN: 2575-1549.
- Ravi, P. P. et al. (2018). "Effects of target pH-value on organic acids and methane production in two-stage anaerobic digestion of vegetable waste". In: *Bioresource Technology* 247, pp. 96–102. ISSN: 1873-2976.
- Rettenberger, G. et al. (2012). "Handbuch Bioabfallbehandlung". In: *Umweltbundesamt* 54, p. 858. ISSN: 1862-4804.
- Ringeisen, B. R., R. Ray und B. Little (2007). "A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber". In: *Journal of Power Sources* 165.2, pp. 591–597. ISSN: 0378-7753.
- Rivière, D. et al. (2009). "Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge". In: *The ISME Journal* 3.6, pp. 700–714. ISSN: 1751-7362.
- Rocco, C. J. und J. C. Escalante-Semerena (2010). "In Salmonella enterica, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis". In: *Journal of Bacteriology* 192.3, pp. 771–778. ISSN: 0021-9193.
- Röling, W. F. M. (2014). "The Family Geobacteraceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 157–172. ISBN: 978-3-642-39044-9.
- Roller, S. D. et al. (2008). "Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria". In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology* 34.1, pp. 3–12. ISSN: 0264-3421.
- Rotaru, A.-E., P. M. Shrestha, F. Liu, T. Ueki, et al. (2012). "Interspecies Electron Transfer via Hydrogen and Formate Rather than Direct Electrical Connections in Cocultures of Pelobacter carbinolicus and Geobacter sulfurreducens". In: *Applied and Environmental Microbiology* 78.21, pp. 7645–7651. ISSN: 0099-2240.
- Rotaru, A.-E., P. M. Shrestha, F. Liu, B. Markovaite, et al. (2014). "Direct interspecies electron transfer between Geobacter metallireducens and Methanosarcina barkeri." In: *Applied and Environmental Microbiology* 80.15, pp. 4599–605. ISSN: 1098-5336.
- Sakamoto, M. (2014). "The Family Porphyromonadaceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 811–824. ISBN: 978-3-642-38954-2.

- Samel, U.-R. et al. (2011). "Propionic acid and derivatives". In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sayed, E. T. und M. A. Abdelkareem (2017). "Yeast as a Biocatalyst in Microbial Fuel Cell". In: *Old Yeasts - New Questions*. Ed. by C. Lucas und C. Pais. InTech. ISBN: 978-953-51-3678-1.
- Schink, B. und R. Muñoz (2014). "The Family Syntrophomonadaceae". In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 371–379. ISBN: 978-3-642-30120-9.
- Schmidt, J. E. und B. K. Ahring (1993). "Effects of hydrogen and formate on the degradation of propionate and butyrate in thermophilic granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor." In: *Applied and environmental microbiology* 59.8, pp. 2546–51. ISSN: 0099-2240.
- Schröder, U. (2007). "Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency". In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 9.21, pp. 2619–2629. ISSN: 1463-9076.
- Scott, K. P. et al. (2014). "Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro". In: *FEMS Microbiology Ecology* 87.1, pp. 30–40. ISSN: 0168-6496.
- Selma, M. V. et al. (2017). "Isolation of human intestinal bacteria capable of producing the bioactive metabolite isourolithin A from ellagic acid". In: *Frontiers in Microbiology* 8.AUG, p. 1521. ISSN: 1664-302X.
- Shimizu, J. et al. (2018). "Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis". In: *PLoS ONE* 13.9. Ed. by B. A. Wilson, e0203657. ISSN: 1932-6203.
- Shin, H. S. et al. (2001). "Performance of UASB reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste". In: *Water Research* 35.14, pp. 3441–3447. ISSN: 0043-1354.
- Shin, J. H. et al. (2012). "Bio-based production of C2-C6 platform chemicals". In: *Biotechnology and Bioengineering* 109.10, pp. 2437–2459. ISSN: 0006-3592.
- Simonte, F. M. et al. (2017). "Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12". In: *Molecular Microbiology* 103.1, pp. 55–66. ISSN: 1365-2958.
- Sleutels, T. H. et al. (2011). "Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems". In: *Bioresource Technology* 102.24, pp. 11172–11176. ISSN: 0960-8524.
- Smith, M. R. (1983). "Reversal of 2-bromoethanesulfonate inhibition of methanogenesis in *Methanosarcina* sp." In: *Journal of bacteriology* 156.2, pp. 516–23. ISSN: 0021-9193.
- Sparling, R. und L. Daniels (1987). "The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate". In: *Canadian Journal of Microbiology* 33.12, pp. 1132–1136. ISSN: 0008-4166.
- Srikanth, S., M. Kumar und S. K. Puri (2018). "Bio-electrochemical system (BES) as an innovative approach for sustainable waste management in petroleum industry". In: *Bioresource Technology* 265, pp. 506–518. ISSN: 1873-2976.
- Srirangan, K. et al. (2017). "Manipulating the sleeping beauty mutase operon for the production of 1-propanol in engineered *Escherichia coli*". In: *Biotechnology for Biofuels* 6, p. 139. ISSN: 1754-6834.
- Stams, A. J. M. et al. (1992). "Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicum*". In: *Applied and Environmental Microbiology* 58.1, pp. 346–352. ISSN: 0099-2240.

- Stolze, Y., A. Bremges, I. Maus, et al. (2018). “Targeted in situ metatranscriptomics for selected taxa from mesophilic and thermophilic biogas plants”. In: *Microbial Biotechnology* 11.4, pp. 667–679. ISSN: 1751-7915.
- Stolze, Y., A. Bremges, M. Rummig, et al. (2016). “Identification and genome reconstruction of abundant distinct taxa in microbiomes from one thermophilic and three mesophilic production-scale biogas plants”. In: *Biotechnology for Biofuels* 9.1, p. 156. ISSN: 1754-6834.
- Strycharz-Glaven, S. M. et al. (2011). “On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms”. In: *Energy and Environmental Science* 4.11, pp. 4366–4379. ISSN: 1754-5692.
- Sturm-Richter, K. et al. (2015). “Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells”. In: *Bioresource Technology* 186, pp. 89–96. ISSN: 1873-2976.
- Suvorova, I. A., D. A. Ravcheev und M. S. Gelfand (2012). “Regulation and evolution of malonate and propionate catabolism in proteobacteria”. In: *Journal of Bacteriology* 194.12, pp. 3234–3240. ISSN: 0021-9193.
- Takeuchi, Y. et al. (2017). “Microbial fuel cells using *Cellulomonas* spp. with cellulose as fuel”. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123.3, pp. 358–363. ISSN: 1347-4421.
- Tarlera, S. et al. (2009). “*Caloramator proteoclasticus* sp. nov., a New Moderately Thermophilic Anaerobic Proteolytic Bacterium”. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 47.3, pp. 651–656. ISSN: 0020-7713.
- Tejedor-Sanz, S. et al. (2018). “*Geobacter* Dominates the Inner Layers of a Stratified Biofilm on a Fluidized Anode During Brewery Wastewater Treatment”. In: *Frontiers in Microbiology* 9, p. 378. ISSN: 1664-302X.
- Textor, S. et al. (1997). “Propionate oxidation in *Escherichia coli*: Evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria”. In: *Archives of Microbiology* 168.5, pp. 428–436. ISSN: 0302-8933.
- Trevisan, S. et al. (2010). “Humic substances biological activity at the plant-soil interface”. In: *Plant Signaling & Behavior* 5.6, pp. 635–643. ISSN: 1559-2324.
- Ucar, D., Y. Zhang und I. Angelidaki (2017). “An overview of electron acceptors in microbial fuel cells”. In: *Frontiers in Microbiology* 8.APR, p. 643. ISSN: 1664-302X.
- Ueda, K. et al. (2014). “Description of *Symbiobacterium ostreiconchae* sp. nov., *Symbiobacterium turbinis* sp. nov. and *Symbiobacterium terraclitae* sp. nov., isolated from shellfish, emended description of the genus *Symbiobacterium* and proposal of *Symbiobacteriaceae* fam. nov.” In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64.Pt 10, pp. 3375–3383. ISSN: 1466-5026.
- Van Lier, J. B. et al. (1993). *Effect of Acetate, Propionate, and Butyrate on the Thermophilic Anaerobic Degradation of Propionate by Methanogen Sludge and Defined Cultures*. eng.
- Vary, P. S. (1994). “Prime time for *Bacillus megaterium*”. In: *Microbiology* 140.5, pp. 1001–1013. ISSN: 1350-0872.
- Venkata Mohan, S., G. Mohanakrishna und P. N. Sarma (2010). “Composite vegetable waste as renewable resource for bioelectricity generation through non-catalyzed open-air cathode microbial fuel cell”. In: *Bioresource Technology* 101.3, pp. 970–976. ISSN: 0960-8524.
- Venkiteswaran, K. et al. (2015). “Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function.” In: *Microbiology insights* 8.Suppl 2, pp. 37–44. ISSN: 1178-6361.

- Vital, M., A. C. Howe und J. M. Tiedje (2014). "Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data." In: *mBio* 5.2, e00889. ISSN: 2150-7511.
- Von Canstein, H. et al. (2008). "Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer." In: *Applied and environmental microbiology* 74.3, pp. 615–23. ISSN: 1098-5336.
- Wang, Y. et al. (2009). "Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria". In: *Biomass and Bioenergy* 33.5, pp. 848–853. ISSN: 0961-9534.
- Wegener, W. S., H. C. Reeves und S. J. Aji (1968). "Propionate metabolism. II. Factors regulating adaptation of *Escherichia coli* to propionate". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 123.1, pp. 55–61. ISSN: 1096-0384.
- Werpy, T. und G. Petersen (2004). "Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas". In: *DOE Energy Efficiency and Renewable Energy Biomass*. Volume I, pp. 1–76. ISSN: 1465-6566.
- Wilken, D. et al. (2017). *Biogas to Biomethane*. Fachverband Biogas e. V. ISBN: ISSN 2510-487X.
- Wofford, N. Q., P. S. Beaty und M. J. Mcinerney (1986). "Preparation of Cell-Free Extracts and the Enzymes Involved in Fatty Acid Metabolism in *Syntrophomonas wolfei*". In: *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 167.1, pp. 179–185.
- Worm, P. et al. (2014). "A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837.12, pp. 2004–2016. ISSN: 0005-2728.
- Xia, Y. et al. (2016). "Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in Anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation". In: *Biotechnology for Biofuels* 9.1, p. 111. ISSN: 1754-6834.
- Xu, Z. et al. (2017). "Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects". In: *Critical Reviews in Biotechnology* 37.8, pp. 990–1005. ISSN: 0738-8551.
- Yang, J. E. et al. (2014). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98.1, pp. 95–104. ISSN: 0175-7598.
- Yang, L. L. et al. (2012). "*Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematicidal volatiles". In: *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 102.1, pp. 53–59. ISSN: 0003-6072.
- Yang, T. H. et al. (2014). "Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*". In: *Journal of Biotechnology* 172.1, pp. 59–66. ISSN: 0168-1656.
- Yee, M. O. et al. (2019). "Extracellular electron uptake by two *Methanosarcina* species". In: *bioRxiv*, p. 458091.
- Yu, J. et al. (2015). "Power densities and microbial communities of brewery wastewater-fed microbial fuel cells according to the initial substrates". In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38.1, pp. 85–92. ISSN: 1615-7591.
- Zellner, G. et al. (1989). "Methanocorpusculaceae fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov." In: *Archives of Microbiology* 151.5, pp. 381–390. ISSN: 1432-072X.

- Zhao, F. et al. (2005). "Application of pyrolysed iron(II) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells". In: *Electrochemistry Communications* 7.12, pp. 1405–1410. ISSN: 1388-2481.
- Zheng, W. et al. (2018). "Influence of polyaluminum chloride on microbial characteristics in anaerobic membrane bioreactors for sludge digestion". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102.2, pp. 1005–1017. ISSN: 1432-0614.
- Zhong, Z. et al. (2014). "Influences of 3-hydroxypropionaldehyde and lactate on the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*". In: *Bioresources and Bioprocessing* 1.1, p. 2. ISSN: 2197-4365.
- Zinder, S. H., T. Anguish und S. C. Cardwell (1984). "Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester." In: *Applied and environmental microbiology* 47.6, pp. 1343–5. ISSN: 0099-2240.
- Zuo, Z. et al. (2013). "Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste". In: *Bioresource Technology* 146, pp. 556–561. ISSN: 0960-8524.