

---

**Universität für Bodenkultur Wien**  
University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna



**Department für Nachhaltige Agrarsysteme**  
Institut für Landtechnik



# **Verbesserter Biomasseaufschluss für die Energieträger der Zukunft – Biotreibstoffe und Biogas**

## **Masterarbeit**

an der Universität für Bodenkultur

Masterstudium: Umwelt und Bioressourcenmanagement

vorgelegt von  
**Özcan Hir, B.Sc.**

betreut von  
**Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Andreas Gronauer**  
**Ass. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Alexander Bauer**  
**MSc.Samira Basyouni-Khamis**

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin / keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird („Verwendung unerlaubter Hilfsmittel“) und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.

Diese Arbeit wurde neben der gedruckten Version auch auf CD-Rom zur Prüfung der o.g. Erklärung bei der zuständigen Prüferin/dem zuständigen Prüfer hinterleg

---

## **DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Abschlussarbeit unterstützt haben.

Ich möchte mich bei meinen BetreuerInnen Univ. Prof. Dipl. –Ing. Dr. Andreas Gronauer, Ass. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Alexander Bauer und MSc.Samira Basyouni-Khamis bedanken, die mich auf verschiedenste Weise unterstützt haben.

Hierbei gilt mein besonderer Dank Ass. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Alexander Bauer, der sich mit Geduld und vor allem mit seinem fachlichen, wissenschaftlichen Gutachten an dieser Arbeit maßgeblich beteiligt hat.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kollegin MSc.Samira Basyouni-Khamis für ihren fachlichen Rat und ihre tatkräftige Unterstützung.

Außerdem möchte ich Deniz Pinar für das Korrekturlesen meiner Masterarbeit danken.

Ich bedanke mich schließlich ganz herzlich bei meinen Eltern und bei meiner lieben Frau Perihan Demirkiran Hir für den moralischen Beistand, ihre Geduld und Unterstützung.

---

## Abstract

One of the methods that increasingly applied is utilizing agricultural raw materials for sustainable and decentralized energy. Therefore, making use of straw as a raw material plays a pivotal role. Maize straw is also known to contain lignocellulose biomass embodies a high amount of cellulose, hemicellulose, and lignin in its structure. Nevertheless, the structure of the lignocellulose biomass is resistant to enzymatic hydrolysis, which requires pretreatment before the enzymatic hydrolysis.

Taking energy efficiency and environmental factors into consideration, biological pretreatment offers advantages over other methods. Although improvements are necessary, biological pretreatments can be used more economically. Biological pre-treatment aims to wipe out the complex structure of the plant biomass. It is therefore necessary to ensure access to the cellulose and hemicellulose components. Pre-Condition for this, lignin should structurally break down. Soft rot fungi preferentially attack cellulose and hemicellulose but cannot break down lignin. White rot fungi attack lignin and break down lignin bonds. Thus, fungal a co-cultivation of a white rot and a soft rot fungus would possibly lead to an efficient strategy for pre-treatment with corn straw.

This master thesis intends to examine an alternative method for the pre-treatment, and conversion of the plant biomass into a biologically usable raw material. For the pre-treatment of maize straw optimized *Trichoderma reesei* strains and white-rot fungi were inoculated together. To provide improvement and to achieve an optimized enzyme effect, the *Trichoderma reesei* strain was sexually crossed in succession. After that, four white-rote fungi were selected. Finally, *T. reesei* strains and white-rote fungi were inoculated for pre-treatment with maize straw in different periods from a few weeks to three months. The white-rote fungi are responsible for degrading of lignin, and *Trichoderma reesei* strains for that of cellulose. Although the maize straw has shown improvement in pretreatment, the desired synergy between *Trichoderma* and white-rote fungi was not achieved. However, cocultivation for eight weeks of white-rote BH31 and *Trichoderma reesei* strain 1A2D15 showed a synergistic effect on the yield of glucose. This cocultivation reached the result of 187 mg per 1 g of maize straw after 6 hours of enzymatic hydrolysis. Similarly, with the same conditions, the achievement of glucose of unpretreated sample is 68 mg per 1 g of maize straw.

---

## Kurzfassung

Die Verwendung landwirtschaftlicher Rohstoffe für nachhaltige und dezentrale Energie ist eine zunehmende Alternative. In dem Kontext spielt die Verwendung des Strohs, insbesondere des Maisstrohs als Rohstoff, eine zentrale Rolle. Maisstroh als lignocellulosehaltige Biomasse enthält in seiner Struktur hohe Mengen an Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Die Struktur der Lignocellulose-Biomasse ist jedoch resistent gegen enzymatische Hydrolyse, so dass vor der enzymatischen Hydrolyse eine Vorbehandlung erforderlich ist.

Unter Berücksichtigung der Energieeffizienz und der Umweltfaktoren bietet die biologische Vorbehandlung Vorteile gegenüber anderen Methoden. Damit die biologischen Vorbehandlungen jedoch wirtschaftlich besser angewendet werden können sind Verbesserungen erforderlich. Biologische Vorbehandlung zielt darauf, dass komplexe Struktur der pflanzlichen Biomasse ausgelöscht. Daher ist es notwendig, dass die Zugänglichkeit zu den Cellulose- und Hemicellulosebestandteilen gewährleisten. Dafür sollte Lignin Anteil abbauen. Moderfäulepilze befallen bevorzugt Cellulose und Hemicellulose, können jedoch Lignin nicht abbauen. Weißfäulepilze greifen Lignin an und bauen Lignin-Bindungen ab. Dadurch könnte eine Co-kultivierung eines Weißfäule- und eines Moderfäulepilze zu einer effizienten Strategie für eine Vorbehandlung mit dem Maisstroh führen.

In der vorliegenden Masterarbeit wird eine alternative Methode zur Vorbehandlung und Umsetzung der pflanzlichen Biomasse, insbesondere Maisstroh in biologisch weiterbenutzbaren Grundstoffen, untersucht. Es wurden die optimierten *Trichoderma reesei* Stämme und Weißfäulepilzisolaten zur Vorbehandlung von Maisstroh zusammen inokuliert. Dafür wurden die *Trichoderma reesei* Stämme nacheinander sexual gekreuzt, um die Enzymaktivität zu verbessern und zu optimieren. Dann wurden vier Weißfäulepilze ausgewählt. Als letztes wurden *T. reesei* Stämme und Weißfäulepilzisolaten zur Vorbehandlung mit Maisstroh von einigen Wochen bis zu drei Monaten inokuliert. Hier sind die Weißfäulepilze für den Ligninabbau und die *Trichoderma reesei* Stämme für den Celluloseabbau verantwortlich. Obwohl die Verbesserung der Vorbehandlung zu Maisstroh festgelegt wurde, wurde die gewünschte Synergie zwischen *Trichoderma* und den Weißfäulepilze wegen langer Dauer der Versucher nicht erreicht. Jedoch zeigte die Co-Kultivierung für acht Wochen des Weißfäulepilzisolats BH31 und des *Trichoderma reesei* Stamms 1A2D15 eine synergistische Auswirkung auf die Ausbeute an Glucose auf. Diese Co-Kultivierung erreichte ihren Wert von 187 mg pro 1g Maisstroh nach sechsständiger enzymatischer Hydrolyse. Unter den gleichen Bedingungen beträgt die Ausbeute an Glucose von unbehandelten Proben 68 mg pro 1g Maisstroh.

---

# Inhalt

Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis .....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation .....	1
1.2 Charakterisierung lignocellulosehaltiger Biomasse .....	2
1.2.1 Cellulose.....	3
1.2.2 Hemicellulose.....	3
1.2.3 Lignin .....	4
1.3 Vorbehandlung von Lignocellulosehaltiger Biomasse .....	5
1.3.1 Physikalische Vorbehandlungsmethoden.....	5
1.3.2 Chemische Vorbehandlungsmethoden.....	6
1.3.3 Physikochemische Vorbehandlungen.....	6
1.3.4 Biologische Vorbehandlungen .....	6
1.4 Ascomyceten und Basidiomyceten.....	7
1.4.1 Ascomyceten und <i>Trichoderma reesei</i> .....	7
1.4.2 Basidiomyceten .....	7
1.5 Enzyme zum Abbau von Lignocellulose.....	7
1.5.1 Cellulasen .....	8
1.5.2 Hemicellulosen.....	8
1.5.3 Ligninasen .....	9
2 Zielsetzung und Abgrenzung der Fragenstellung .....	10
3 Material und Methoden.....	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Pilzstämmе .....	11
3.1.2 Rohstoffe, Enzyme, Filter und die Silicaplatte .....	12
3.1.3 Chemikalien .....	13
3.2 Methoden .....	14
3.2.1 Pilzanzucht und Ernten der Pilzplatte .....	14
3.2.2 Vorbehandlung von Biomasse .....	14
3.2.3 Enzymatische Hydrolyse.....	17
3.2.4 Bestimmung von Cellulose-, Hemicellulose- und Ligningehalt durch Säurehydrolyse.....	18
3.2.5 Analyse der Zuckerkonzentration mittels HPTLC .....	19

---

3.2.6	Bestimmung Trockenmasse (TM) von Maisstroh.....	21
3.2.7	Bestimmung von Cellulose-, Hemicellulose- und Ligningehalt durch Van Soest 21	
3.2.8	Statistische Datenauswertung.....	23
4	Ergebnisse .....	24
4.1	Analyse Ausgangsmaterial .....	24
4.2	Analyse der Leistung von Basidiomyceten in Kombination mit den Stämmen von Trichoderma reesei .....	25
4.3	Einfluss des Zeitabstands auf die Ausbeute an Glucose.....	26
4.4	Einfluss der Inkubationszeit auf die Ausbeute an Glucose .....	27
4.5	Analyse der synergistische Co-Kultivierung für acht Wochen .....	29
4.5.1	Co-Kultivierung I .....	29
4.5.2	Co-Kultivierung II.....	35
4.5.3	Co-kultivierung III.....	41
4.6	Analyse der synergistischen Co-Kultivierung für drei Monate.....	46
4.6.1	Co-Kultivierung IV .....	46
5	Diskussion.....	51
6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	53
7	Literaturverzeichnis .....	54

---

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BESTANDTEIL DER LIGNOCELLULOSE-STRUKTUR, DIE AUS CELLULOSE, HEMICELLULOSE UND LIGNIN BESTEHT (HERNÁNDEZ ENCISO ET AL. 2017).....	2
ABBILDUNG 2: CELLULOSE-MOLEKÜL MIT B-1,4-GLYKOSIDISCHE BINDUNGEN (SUNASEE UND HEMRAZ 2018).....	3
ABBILDUNG 3: MONOSACCHARIDE, DIE IN HEMICELLULOSE VORKOMMEN (ZHAO ET AL. 2020)4	
ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUREN FÜR LIGNINSORTEN (WIKIMEDIA AUGUST 2011) .....	4
ABBILDUNG 5: HYDROLYTISCHE UND OXIDATIVE SPALTUNG DER KRISTALLINEN CELLULOSE ZU MONOMEREN ZUCKERN. CMB (CARBOHYDRATE-BINDING MODULE), LPMOS (LYTIC POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASES), CBH (CELLOBIOHYDROLASES) (GUPTA, ET AL. 2016).....	8
ABBILDUNG 6: ÖSTERREICHISCHE TRICHODERMA REESEI-RELATION, PROJECT FUNGI4BIOENERGIE .....	11
ABBILDUNG 7: DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZISOLATEN ZUR VORBEHANDLUNG VON MAISSTROH .....	14
ABBILDUNG 8: HPTLC MIT DER MERCK AMD-SILICA-PLATTE, VORGEWASCHEN UND MIT NATRIUMDIHYDROGENPHOSPHAT-DINATRIUMHYDROGENPHOSPHATPUFFER (PH 6,8, 0,2 M) IMPRÄGNIERT, ZWEI ENTWICKLUNGEN UND DERIVATISIERUNG MIT ANILINDIPHENYLA.....	19
ABBILDUNG 9: GLUCOSEERTRAG DURCH DIE KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN UND KONTROLLSTÄMME .....	25
ABBILDUNG 10: BOXPLOT DER SYNERGISTISCHEN CO-INOKULIER.....	25
ABBILDUNG 11:LEISTUNG VON BASIDIOMYCETEN IN KOMBINATION MIT DEN KONTROLLSTÄMMEN FÜR VERSCHIEDENE ZEITABSTÄNDE .....	27
ABBILDUNG 12: LEISTUNG VON BASIDIOMYCETEN IN KOMBINATION MIT DEN KONTROLLSTÄMMEN FÜR VERSCHIEDENE INKUBATIONSZEITEN. ....	28
ABBILDUNG 13: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	30
ABBILDUNG 14: DER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN GLUCOSEAUSBEUTEN NACH SECHSSTÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON VORBEHANDLUNG DURCH KOMBINATION BH31+1A2D15 UND UNBEHANDELTEM MAISSTROH. ....	31
ABBILDUNG 15:DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1 G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH. ....	32
ABBILDUNG 16:DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH. ....	34
ABBILDUNG 17:DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH. ....	34
ABBILDUNG 18: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH.....	35
ABBILDUNG 19:DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH.....	37

---

ABBILDUNG 20: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH.....	37
ABBILDUNG 21: DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH. ....	40
ABBILDUNG 22: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH NULL-, DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZE) MAISSTROH. ....	42
ABBILDUNG 23: DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96-STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	43
ABBILDUNG 24: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	44
ABBILDUNG 25: DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1 G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	45
ABBILDUNG 26: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1 G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	47
ABBILDUNG 27: DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	48
ABBILDUNG 28: DIE AUSBEUTE AN GLUCOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	49
ABBILDUNG 29: DIE AUSBEUTE AN XYLOSE (MG PRO 1G MAISSTROH) NACH DREI-, SECHS-, 24- UND 96- STÜNDIGER ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON UNBEHANDELTEM (EMPTY) UND VORBEHANDELTEM (DURCH DIE KOMBINATIONEN VON T. REESEI STÄMMEN UND WEIßFÄULEPILZEN) MAISSTROH. ....	50

---

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ANTEIL VON CELLULOSE, HEMICELLULOSE UND LIGNIN IN VERSCHIEDENEN LIGNOCELLULOSEHALTIGEN BIOMASSEN .....	2
TABELLE 2: DIE FILTER, DIE BEI DER HYDROLYSE VERWENDET WURDEN .....	12
TABELLE 3: DIE CHEMIKALIEN, DIE IN DEN VERSUCHEN VERWENDET WURDEN. SIE WURDEN MIT DER ARTIKELNUMMER, DER KONZENTRATION SOWIE DEN LIEFERANTEN DARGESTELLT .....	13
TABELLE 4: TRICHODERMA REESEI STÄMME FÜR DIE VORBEHANDLUNG, VORTEST: 06.08.2018 .....	15
TABELLE 5 : TRICHODERMA REESEI STÄMME ZUR VORBEHANDLUNG, VORTEST: 20.11.2018....	15
TABELLE 6: TRICHODERMA REESEI STÄMME ZUR KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN, VORBEHANDLUNG, VORTEST: 21.12.2018.....	16
TABELLE 7: TRICHODERMA STÄMME ZUR KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN (E10 UND BH31), VORBEHANDLUNG: 28.01.2019.....	16
TABELLE 8:TRICHODERMA STÄMME ZUR KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN (E10 UND BH31), VORBEHANDLUNG: 04.02.2019.....	16
TABELLE 9: TRICHODERMA STÄMME ZU KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN (HLK140716B UND MB52), VORBEHANDLUNG:11.02.2019.....	17
TABELLE 10: TRICHODERMA STÄMME ZUR KOMBINATION VON BASIDIOMYCETEN (E10 UND BH31), VORBEHANDLUNG: 18.03.2019.....	17
TABELLE 11: ZUSAMMENFASSUNG DER CHEMISCHEN ANALYSEERGEBNISSE DES AUSGANGSMATERIALS .....	24
TABELLE 12: DER ZWEIFACH VARIANZANALYSE FÜR DIE WEIßFÄULEPILZE.....	26
TABELLE 13: DER ZWEIFACH VARIANZANALYSE FÜR DIE ZEITABSTÄNDE .....	27
TABELLE 14: DER EINFACHER ANOVA-TEST FÜR ACHT WOCHEN UND DREI MONATEN CO-KULTIVIERUNG .....	28

## Abkürzungsverzeichnis

ADC .....	Automatic Developing Chamber
ADF.....	Acid Detergent Fiber
ADL .....	Acid Detergent Lignin
AMD .....	Automated Multiple Development
CAZy.....	Carbohydrate Active Enzyme
CBH .....	Cellobiohydrolases
CFU .....	Colony Forming Units/ml
CMB.....	Carbohydrate-Binding Module
HPTLC .....	High-Performance Thin-Layer Chromatography
ILUC .....	Indirect Land Use Change
LPMOs .....	Lytic Polysaccharide Monooxygenases
Milli-Q Wasser .....	Das Milli-Q® Reference System erzeugt Reinstwasser vom Typ 1
NB.....	Nicht bestimmt
NDF.....	Neutral Detergent Fibe
NREL .....	National Renewable Energy Laboratory
OD600.....	Optical Density 600nm
rpm .....	Revolutions Per Minute
STD .....	Standard
TLC .....	Thin-Layer Chromatography
TM.....	Trockenmasse
UV.....	Ultra-Violet

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Eine nachhaltige, wettbewerbsfähige und sichere Energieversorgung sowie der Klimawandel zählen zu den vorrangigen gesellschaftlichen und politischen Herausforderungen. Die Weltwirtschaft basiert auf verschiedenen fossilen Energieträgern wie Kohle, Erdöl und Erdgas. Diese Ressourcen werden als Rohstoff verwendet um Elektrizität, Chemikalien und Brennstoff zu produzieren. Einerseits wird die Nutzung von diesen Energieträgern nicht als nachhaltig angesehen (Uihlein und Schebek 2009), andererseits führt übermäßiger Verbrauch des fossilen Brennstoffs zu einer hohen Verschmutzung der Umwelt (Ballesteros et al. 2006). Es ist daher notwendig, die Nutzung erneuerbarer Energieträger als Alternativen zu Fossilen zu verstärken. Aus diesen Gründen haben die westlichen Staaten, insbesondere die europäische Union, auf diesem Gebiet neue politische Strategien entwickelt. Die europäische Union zielt darauf ab, bis 2020 die Energieeffizienz um 20% zu steigern, 20% ihrer Energie aus erneuerbaren Quellen zu beziehen und weitere Treibhausgasemissionen um 20% zu reduzieren (Europäische Kommission 2012). In dem Kontext spielt Energie aus Biomasse eine zentrale Rolle. Biomasse ist der allgemeine Name für alle nicht versteinerten biologischen Materialien, die von lebenden oder kürzlich lebenden Lebewesen stammen (Energieschweiz 2017). Gleichwohl wird Energie aus Biomasse sowohl in der Politik als auch in der Wissenschaft und der Gesellschaft intensiv diskutiert (Zichy et al. 2014).

Aus Biomasse erzeugte Biotreibstoffe unterscheiden sich als erste und zweite Generation voneinander. Die erste Generation (hauptsächlich aus Nahrungspflanzen wie Getreide, Zucker und Ölsaaten hergestellt) verursacht aber Probleme (Lee 2017), wie z.B. Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion sowie Futtermittelproduktion sowie Abholzung und Intensivierung (UN 2007). Aktuelle Studien weisen auf die negativen Auswirkungen dieser Generation auf das Treibhausgas (Havlík et al. 2011) hin. Negative Auswirkungen der ersten Generation haben das Interesse für die zweite Generation erhöht.

Biotreibstoffe der zweiten Generation basieren auf der Verwendung von landwirtschaftlichen-kommunalen- und industriellen Reststoffen, auf Holz und auf den spezifischen Biomassekulturen. Damit eliminieren sie die Probleme der ersten Generationen (UN 2007). Vor allem gefährdet sie die Nahrungsmittelsicherheit nicht und konkurrieren auch nicht um. Stattdessen bietet die zweite Generation die Entwicklung effizienter Nutzung von pflanzlichen Abfällen aus der Agrarwirtschaft und/oder aus der Industrie (Havlík, et al. 2011).

Um effizient genutzt zu werden, muss lignocellulosehaltige Biomasse vorbehandelt werden.

## 1.2 Charakterisierung lignocellulosehaltiger Biomasse

Lignocellulose ist eine regenerative Kohlenstoffquelle, die als nachhaltiger Rohstoff verwendet. Dennoch muss dieses Material für die effiziente Nutzung in löslichen Produkten wie Einfachzucker oder Zweifachzucker umgewandelt werden. Allgemein besteht Lignocellulosehaltige Biomasse aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Gupta et al. 2016). Diese Bestandteile der Biomasse bilden eine hierarchische, komplexe Struktur. Diese komplexe Struktur ist verantwortlich für die Widerstandsfähigkeit von Lignocellulose (Abb.1)

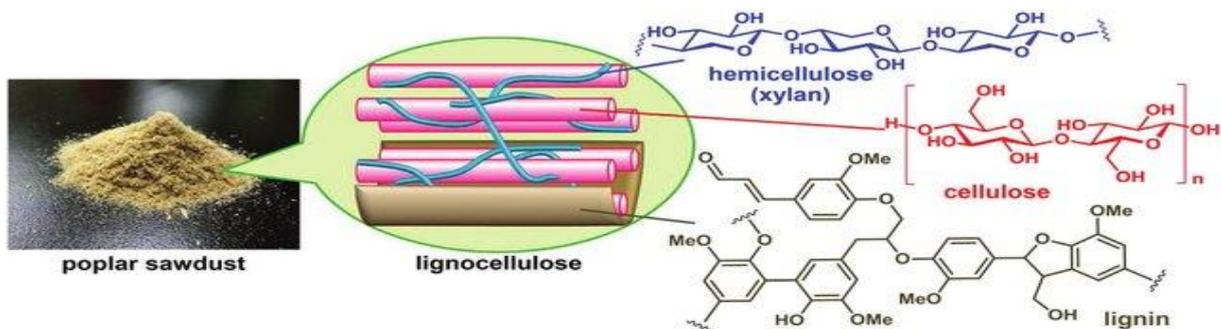


Abbildung 1: Bestandteil der Lignocellulose-Struktur, die aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin besteht (Hernández Enciso et al. 2017)

Tabelle 1: Anteil von Cellulose, Hemicellulose und Lignin in verschiedenen Lignocellulosehaltigen Biomassen

Lignocellulosehaltige Biomasse	Cellulose % TM Glucan	Hemicellulose % TM			Lignin % TM
		Xylan	Arabinan	Galaktan	
Maisstroh (Li et al. 2010)	38.3	21.0	2.7	2.1	17.4
Weizenstroh (I. Ballesteros et al. 2006)	30.2	18.7	2.8	0.8	17.0
Reisstroh (Chen et al. 2011)	31.1 ±0.8	18.7±0.2	3.6 ±0.1	-	13.3± 0.6

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der wichtigsten Komponenten in verschiedenen Stroharten. Nach Li, Kim und Nghiem lässt der Gehalt von Cellulose, Hemicellulose und Lignin für Maisstroh mit jeweils 38,3 %, 25,8 % und 17,4% TM auf einen hohen Faseranteil schließen.

## 1.2.1 Cellulose

Cellulose ( $C_6H_{10}O_5$ ) ist den Hauptbestandteil aller Pflanzenfasern, die aus mehreren Glucosemolekülen besteht. Cellulose ist ein lineares Polymer von  $\beta$ -D-Glucose, das durch  $\beta$ -1-4 glycosidische Bindungen miteinander verbunden ist (Li et al. 2010). Die Anhydroglucose-Einheit verbindet sich durch glycosidische Bindungen miteinander. Die Wiederholungseinheit besteht aus einem Dimer von Glucose (Cellobiose), wobei jedes Monomer eine primäre und zwei sekundäre Hydroxylgruppen besitzt (Abb.2). Die Anzahl von Anhydroglucose-Wiederholungen bestimmen den Polymerisationsgrad der Cellulose. Anhydroglucose-Einheiten sind abwechselnd bei  $180^\circ$  ausgeglichen, was eine lineare Anordnung ermöglicht. Der Polymerisationsgrad der Cellulose variiert je nach Quelle der Biomasse (George und Sabapathi 2015). Die Löslichkeit der Cellulose hängt von deren Polymerisationsgrad ab. Mit steigendem Polymerisationsgrad nimmt die Löslichkeit der Cellulose ab (Zhang und Lynd 2004). Die Stärke der Wasserstoffbindungen von diesen Hydroxylgruppen ist die Hauptursache für einige andere Eigenschaften, wie die multidimensionale, mikrofibrillierte Struktur und kristalline, amorphe Fraktionen (Lavoine et al. 2012) der Cellulose. Diese Strukturen können durch bestimmte Enzyme oder Säuren hydrolysiert werden. Glucose wird dabei als Reaktionsproduktion und Cellobiose als Zwischenprodukt erzeugt.

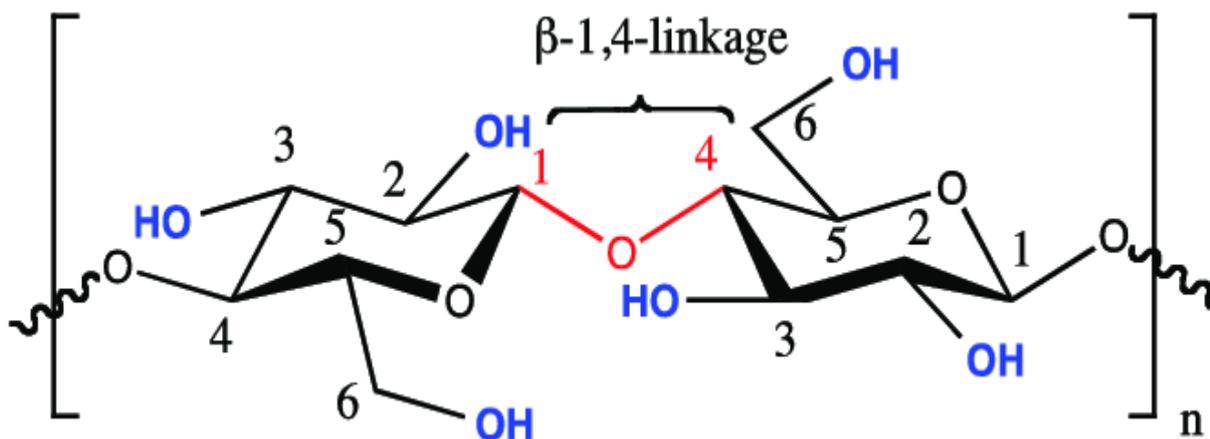


Abbildung 2: Cellulose-Molekül mit  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindungen (Sunasee und Hemraz 2018)

## 1.2.2 Hemicellulose

Hemicellulose ist der Sammelbegriff für die Polysaccharide, die eine heterogene Klasse von den Polymeren darstellen. Sie enthält mehrere Arten von Zuckereinheiten mit verschiedene glycosidischen Bindungen, die Pentosen ( $\beta$ -D-Xylose und  $\alpha$ -L-Arabinose) sowie die Hexosen ( $\alpha$ -d-Galactose und  $\beta$ -D-Mannose) sind (Gírio et al. 2010). Hemicellulose wird leichter als Cellulose hydrolysiert, weil sie ein verzweigtes Molekül ist und grundlegend leicht für Enzyme und Säure zugänglich ist (Oetken 2019). Xylan und Glucomannane sind zwei wichtige Gruppen von Hemicellulose. Wobei die vorkommenden Xylane am häufigsten über  $\beta$ -1-4-glycosidische

Bindungen verknüpft sind, welche die Hauptkomponenten in Hemicellulose sekundärer pflanzliche Zellwände sind (Heinze et al. 2005).

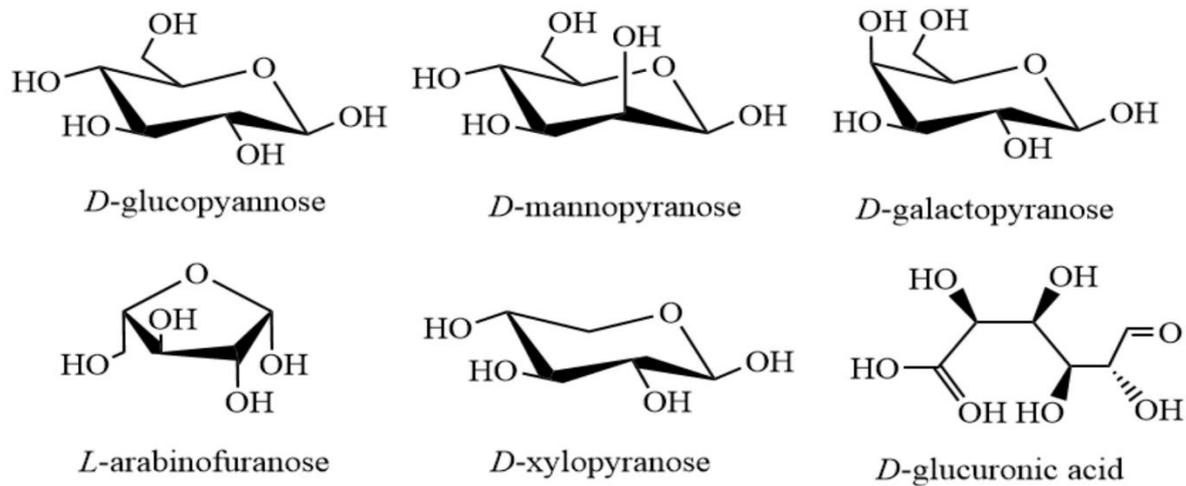


Abbildung 3: Monosaccharide, die in Hemicellulose vorkommen (Zhao et al. 2020)

### 1.2.3 Lignin

Der prozentuale Anteil des Lignins variiert je nach Art der Biomasse. Bei landwirtschaftlicher Biomasse ist dieser Anteil zwischen 9-32%. Das Lignin verhindert das Eindringen von Wasser in die Struktur der Pflanze und schützt die Pflanze vor Mikroorganismen. Das heißt, dass der Abbau der Lignocellulose verhindert wird. Lignin ist ein dreidimensionales Makromolekül, das ein aromatisches Polymer ist und aus Phenylpropan-Einheiten synthetisiert wird (Benedix 2015). Die Phenylpropan-Einheiten des Lignins bestehen aus Syringyl-, Guaiacyl- und p-Hydroxypheno, die miteinander verbunden sind und eine komplexe Matrix erstellen. Die Heterogenität des Lignins ist verantwortlich dafür, dass die Struktur schlecht aufzubrechen ist. (Buzdar et al. 2001). In Abbildung 4 ist die Struktur des Lignins abgebildet.

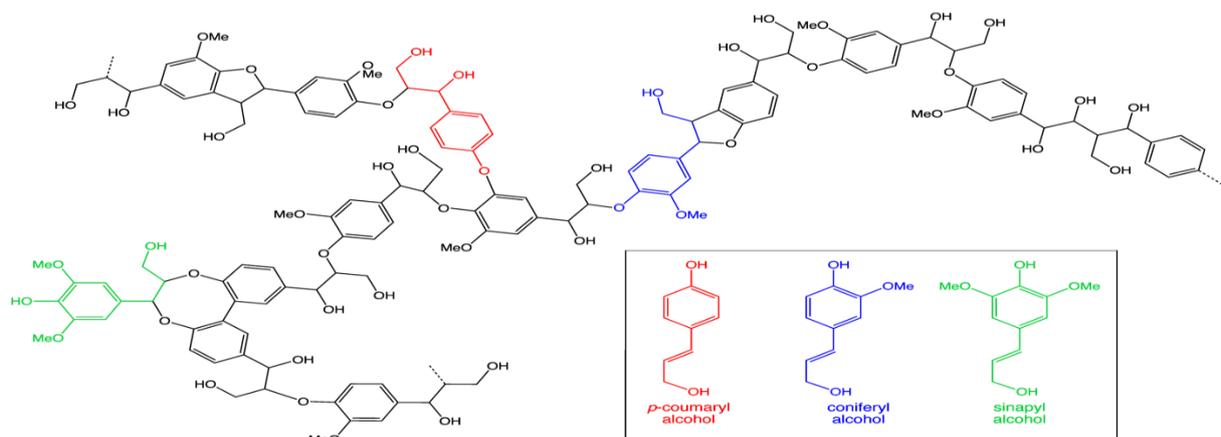


Abbildung 4: Chemische Strukturen für Ligninsorten (Wikimedia August 2011)

---

### **1.3 Vorbehandlung von Lignocellulosehaltiger Biomasse**

Der erste Schritt des Bioenergieprozesses ist die Vorbehandlung. Er wird als einer der schwierigsten und kritischsten Schritte betrachtet, der einen großen Einfluss auf den Abbau von Cellulose hat. Die komplexe Struktur der Lignocellulose ist entweder nur schwer oder gar nicht abbaubar. Durch die Vorbehandlung werden die Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin voneinander separiert, um die Biomasse zur weiteren chemischen, physikalischen oder biologischen Behandlung besser zugänglich zu machen (Demirbas 2005). Die Struktur von Lignocellulose besteht aus Cellulose und Lignin, die durch eine Kette aus Hemicellulose verbunden sind. Die Vorbehandlung zielt darauf ab, dass diese Matrix gebrochen werden soll, um den Kristallinitätsgrad der Cellulose zu verringern und die Anteile der amorphen Cellulose zu erhöhen. Während der Vorbehandlung soll ein Großteil der Hemicellulose hydrolysiert werden und Lignin freigesetzt und/oder abgebaut werden (Sánchez und Cardona 2008). Dabei muss gleichermaßen berücksichtigt werden, dass sowohl der Energiebedarf reduziert werden muss als auch die Kosten und Materialien minimiert werden müssen (Poth 2013). Physikalische, chemische, physikochemische und biologische Behandlungen sind die vier Vorbehandlungsmethoden, die in der Praxis verwendet werden. Im Allgemeinen werden diese Methoden alleine oder miteinander verwendet.

#### **1.3.1 Physikalische Vorbehandlungsmethoden**

Verschiedene Arten der physikalischen Vorbehandlungen werden verwendet, sowohl um die zugängliche Biomasseoberfläche als auch die Größe der Poren zu vergrößern. Während der physikalischen Vorbehandlung wird die Kristallinität des Materials und der Polymerisationsgrad der Cellulose verringert (Taherzadeh et al. 2008). Verschiedene Typen der physikalischen Vorbehandlungsmethoden wie mechanische Zerkleinerung, Extraktion und Bestrahlung können verwendet werden, um die enzymatische Hydrolyse oder biologische Abbaubarkeit zu verbessern. Große Nachteile dieser Methoden sind die Energieintensivität und Investitionskosten für die motorisierte Ausrüstung. Ebenso sind sie unfähig, die Abbaubarkeit einiger härterer lignocellulosehaltiger Biomassen zu verbessern. Die Vorbehandlungsmethoden funktionieren auf unterschiedliche Weise um Eigenschaften von lignocellulosehaltiger Biomasse (z.B. Lignin- und Hemicellulosegehalt, Cellulose Kristallinität) zu verändern. Aus diesem Grund ist die Kombination mit anderen Vorbehandlungsmethoden viel wirksamer (Dahadha et al. 2017). Eine andere physikalische Vorbehandlungsmethode ist die Bestrahlung. Diese Methode basiert auf der Verwendung von Strahlungsenergie von Mikrowellen, Gammastrahlen und Ultraschall. Die Hauptfunktion solcher Methoden ist die Anwendung physikalischer Kraft, um die Partikel zu zersetzen und die Größe der Substratpartikel zu verringern. Dies vergrößert direkt die für enzymatische Angriffe verfügbare Oberfläche. Die Hauptnachteile dieser Methode sind sehr lange Vorbehandlungsperioden und konstanter Energiebedarf. Diese Methode ist jedoch leicht und einfach zu implementieren (Dahadha, et al. 2017).

---

### 1.3.2 Chemische Vorbehandlungsmethoden

Diese Methode basiert auf der Verwendung von Chemikalien wie Säuren, Basen und ionischen Flüssigkeiten, um die chemischen sowie physikalischen Eigenschaften der Lignocellulose zu verändern. Obwohl diese Methode in der Praxis oft verwendet wird, hat sie einen der größten Nachteile. Die Notwendigkeit der ständigen Dosierung von Chemikalien macht dieses Verfahren sowohl teuer als auch umweltbelastend (Dahadha, et al. 2017).

### 1.3.3 Physikochemische Vorbehandlungen

In der Praxis sind die am meisten bevorzugten Verfahren die Steam Explosion, die Heißwassermethode (liquid hot water), die Ammonia Fiber Explosion und die CO<sub>2</sub> Explosion. Studien auf diesem Gebiet fokussieren sich insbesondere auf die Steam Explosion. Bei dieser Methode wird die Lignocellulose mit Hochdruckdampf für einige Minuten erhitzt. Dann wird der Druck plötzlich entspannt, wodurch die Lignocellulose explosionsartig dekomprimiert wird. Dies liegt daran, dass sich die Biomasse in einzelne Fasern trennt (Bauer et al. 2014). Die Amino Fiber Explosion hat den Nachteil, dass diese Methode weniger effizient für Biomasse mit höheren Ligningehalt ist. Ebenfalls hat die CO<sub>2</sub> Explosion auch Nachteile, da diese Methode ist für industrielle Anwendungen zu teuer ist (Taherzadeh, et al. 2008).

### 1.3.4 Biologische Vorbehandlungen

Die biologischen Vorbehandlungsmethoden sind die am wenigsten energieverbrauchenden Methoden, die auf Mikroorganismen und Enzymen besonderer Pilze basieren. Das liegt vor allem daran, dass diese Methoden keinen hohen Energieeintrag und keine Chemikalien erfordern. Generell werden drei verschiedene Arten von Pilzen für diese Methode verwendet, die Weißfäulepilze (White Rot Fungi), Braunfäulepilze (Brown Rot Fungi) und Moderfäulepilze (Soft rot Fungi). Der Grund der starken Abbaufähigkeit von Weißfäulepilzen ist sowohl die intensive oxidative Aktivität als auch die geringe Substratspezifität ihrer ligninolytischen Enzyme. Weißfäulepilze bauen bevorzugt Lignin ab. Diese Eigenschaften sind wichtige Merkmale bei der Vorbehandlung (Shirkavand et al. 2016). Dagegen sind Braunfäulepilze fähig Holocellulose (nämlich Cellulose und Hemicellulose) abzubauen. Diese Pilze können Cellulose-Kristallstruktur abbauen, aber sie sind nicht oder nur kaum fähig, Lignin abzubauen (Monrroy et al. 2011). Die andere Gruppe der Pilze sind Moderfäulepilze, die Biomasse auf zwei Arten angreifen, sie werden als Typ I und Typ II bezeichnet (Sista Kameshwar und Qin 2018). Typ I bildet charakteristische Lücken in die sekundären Zellwände. In einer sekundären Schicht zerstört Typ II die Zellwand. *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) wird am häufigsten zur Vorbehandlung von lignocellulosehaltiger Biomasse verwendet. Die lange Reaktionszeit macht diese Methode bisher unwirtschaftlich (Jaeger et al. 2018).

---

## 1.4 Ascomyceten und Basidiomyceten

### 1.4.1 Ascomyceten und *Trichoderma reesei*

Die Ascomyceten werden oft verwendet, um lignocellulosehaltiger Biomasse abzubauen. Eine von ihnen ist *Trichoderma reesei*. Der Moderfäulepilz *Trichoderma* ist ein Anamorph von *Hypocrea jecorina* (Seidl et al. 2009), der während des zweiten Weltkrieges auf den Solomon Inseln entdeckt wurde. Das Isolat wurde zuerst als *Trichoderma viride*, später *Trichoderma reesei* identifiziert und wurde mit dem Namen „QM6a“ als Teil der Sammlung im «*US Army QuarterMaster Research and Development Center*» gespeichert. (Peterson und Nevalainen 2012). *T. reesei* QM6a und *T. reesei* RUT-C30 sind bekannte Organismen, um Enzyme zu produzieren. QM6a bzw. alle *T. reesei* können Cellobiohydrolase, Endoglucanasen und  $\beta$ -Glucosidasen herstellen, um Cellulose in Glucose umzuwandeln (Zhang et al. 2016). *T. reesei* muss verbessert werden, um effizienten Biokraftstoff zu produzieren. Die erste Möglichkeit ist die sexuelle Kreuzung, um dieses Ziel zu erreichen. Jedoch wurde *Trichoderma reesei* bis 2009 als asexuell angenommen. Ascomyceten können zwei Kreuzungstypen haben, diese sind MAT1-1 und MAT1-2. Die Entdeckung vom Kreuzungstyp MAT1-2 in *Trichoderma* QM6a ist ein Hinweis für seinen heterothallic Sexuallebensstil. Die Kreuzungsmöglichkeit der verschiedenen *T. reesei*-Stämmen ermöglicht die Optimierung für die Bedingungen, um den Stamm zu verbessern (Seidl et al. 2009).

### 1.4.2 Basidiomyceten

Obwohl *T. reesei* der wichtigste Referenzpilz bezüglich lignocellulosehaltiger Biomasse ist, ist *T. reesei* nicht fähig Lignin abzubauen. Untersuchungen bezüglich des Abbaus von Biomasse durch saprobische Basidiomyceten haben sich stark auf den Abbau des aromatischen Polymerlignin konzentriert (Mäkelä et al. 2014). Basidiomyceten (Weißfäulepilze) können in der Porosität und Oberfläche der degradierten Zellwände einen signifikanten Anstieg verursachen, dies bietet Vorteile für den nachfolgenden enzymatischen Hydrolyseschritt, da die Enzyme leicht in die poröseren Zellwände diffundieren können (Vaidya und Singh 2012). Durch die Herstellung verschiedener Klassen von Peroxidasen können diese Pilze Lignin oxidieren. *Porostereum spadiceum* und *Bjerkandera adusta* sind zwei wichtige Arten von Basidiomyceten, die Lignin effektiv abbauen können. (Casieri et al. 2010)

## 1.5 Enzyme zum Abbau von Lignocellulose

Enzyme sind hochspezifische Katalysatoren. Sie werden nach Zielsubstraten aufgeteilt. Nach der Vorbehandlung der Biomasse spielen die Enzyme eine wichtige Rolle um Cellulose, Hemicellulose und Lignin abzubauen (Rytioja et al. 2014). *Trichoderma reesei* ist der wichtigste Produktionsorganismus, da es in vielen biotechnologischen Industrien eingesetzt wird. Enzyme, die an der Polysaccharid-Dekonstruktion beteiligt sind, sind im kohlenhydrataktiven Enzym (CAZy) zusammengefasst. Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen

und  $\beta$ -Glucosidasen sind drei komplementäre enzymatische Aktivitäten, die durch *T. reesei* für den Celluloseabbau verantwortlich sind. Diese Enzyme können die kovalenten  $\beta$ -1,4-Bindungen hydrolysieren, die die Glucoseeinheiten in Celluloseketten verbinden (Gupta, et al. 2016). Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und  $\beta$ -Glucosidasen können die kovalenten  $\beta$ -1,4-Bindungen hydrolysieren, die die Glucoseeinheiten in Celluloseketten verbinden. Endoglucanasen spalten zufällig  $\beta$ -1,4-Bindungen in amorphen Bereichen der Cellulose (Abb.5).

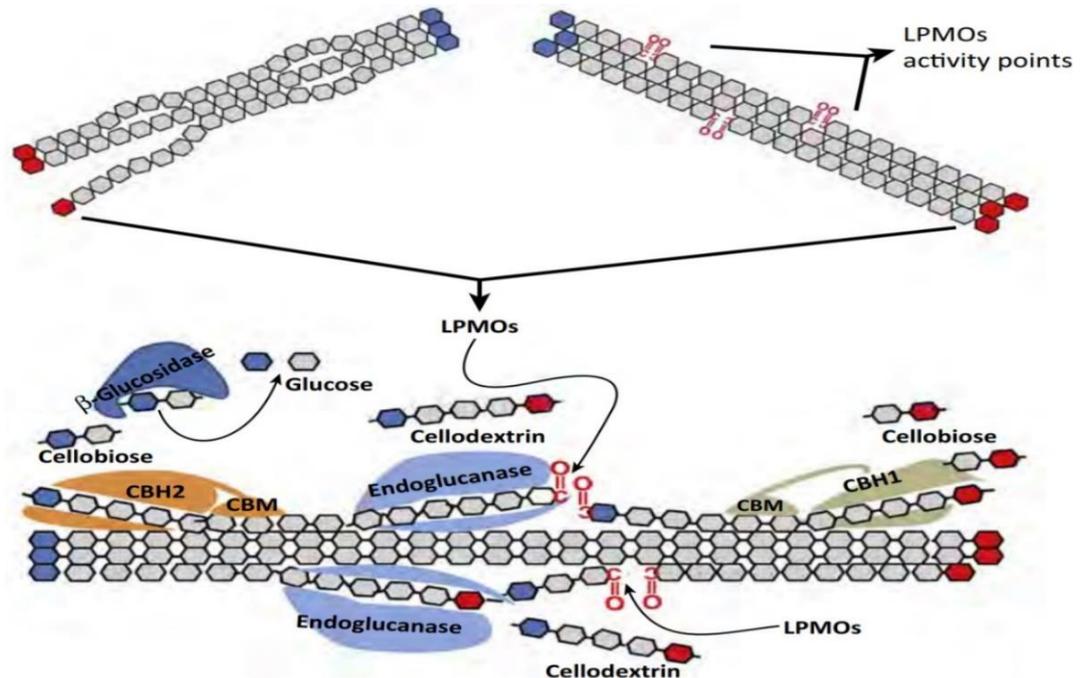


Abbildung 5: hydrolytische und oxidative Spaltung der kristallinen Cellulose zu monomeren Zuckern. CMB (Carbohydrate-binding module), LPMOs (Lytic polysaccharide monooxygenases), CBH (Cellobiohydrolases) (Gupta, et al. 2016)

### 1.5.1 Cellulasen

Die wichtigsten Enzyme, die Cellulose hydrolysieren, werden Cellulasen genannt. Diese werden in Cellobiohydrolasen, Endoglucanasen,  $\beta$ -Glucosidasen und Polysaccharid-Monooxygenasen aufgeteilt. Cellulasen werden aus manchen Pilzen wie *T. reesei* und *Aspergillus niger* sekretiert. *T. reesei* ist der wichtigste Enzymproduzent. *T. reesei* sekretiert hohe Konzentrationen und wird auch als *T.* Hauptquelle für verschiedene Cellulosecocktails verwendet (Jaeger et al. 2018).

### 1.5.2 Hemicellulosen

Xylanasen, Arabinofuranosidasen, Mannanasen und Galactosidase gehören zu der Enzymklasse der Hemicellulasen. Xylanasen verursachen Endo-Spaltungen der  $\beta$ -1,4-Bindungen, Arabinofuranosidasen hydrolysieren  $\alpha$ -l Arabinofuranosidreste und Mannanasen

---

katalysieren Endo-Spaltungen von 1,4- $\beta$ -d-Bindungen und Galactosidasen bauen  $\beta$ -Galactose von galactosidischen Biomolekülen ab (Jaeger et al. 2018).

### **1.5.3 Ligninasen**

Die Enzyme aus Weißfäulepilze sind bislang am effizientesten, um Lignin abzubauen. Ihre Verwendung ist begrenzt, weil sie noch nicht in große Mengen rekombinant hergestellt werden können. Diesen Pilzen können ligninolytischer Enzyme produzieren. Nach der CAZy-Datenbank werden diese Enzyme in drei Kategorien wie Phenol-Oxidasen, Häm-Peroxidasen und unterstützende Enzyme aufgeteilt (Jaeger et al. 2018).

---

## 2 Zielsetzung und Abgrenzung der Fragenstellung

Der Biomasseaufschluss für Ethanol und Biogas durch Pilze weckte sowohl in der Industrie als auch in der Wissenschaft Interesse (Mäkelä et al. 2014). Es gab viele Studien und praktische Erfahrungen zu bestehenden Vorbehandlungsmethoden. Diese Vorbehandlungsmethoden werden sowohl in der Industrie als auch in der Forschung verwendet. Somit sind die Vor- und Nachteile von diesen Vorbehandlungsmethoden bekannt.

Mit der vorliegenden Masterarbeit soll eine alternative Methode zur Vorbehandlung und Umsetzung der lignocellulosehaltigen Biomasse, insbesondere Maisstroh, in biologisch weiter verwertbaren Rohstoffen untersucht werden. Dies soll durch die Anwendungen von natürlich ausgewählten Bodenpilzen während der Lagerung von Maisstroh bis zur weiteren Nutzung erreicht werden. Die *Trichoderma reesei* Stämme werden durch die Kreuzung für die gegebenen Bedingungen optimiert. Die verwendeten Pilze, die Ascomyceten und Basidiomyceten sind, werden kombiniert. Der Effekt dieser Kombination soll – nach dem Aufschluss mit Pilzen mittels enzymatischer Hydrolyse –, für die Ethanol- und Biogasherstellung aufgeklärt werden. Als Ergebnis soll eine leistungsfähige Kombination zweier Pilzspezien gefunden werden, die synergistisch funktioniert. In diesem Kontext wurde folgende Forschungsfrage behandelt.

- Welche Ausbeuten an Glucose sind durch die Kombination zweier Pilzspezien möglich?

Folgende Unterfragen wurden bearbeitet, um die Forschungsfrage der Masterarbeit auszuformulieren.

- Wie ist die optimale Inkubationszeit, wenn zwei Pilzspezien kombiniert werden?

- Wie sind die optimalen Zeitabstände für die enzymatische Hydrolyse, wenn zwei Pilzspezien kombiniert werden?

- Welche Pilzspezien gehören zu der besten Kombination?

- Welche Nachkommen gehören zu der besten Kreuzung?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Pilzstämme

E10 (*Porostereum spadiceum*), MB52 (*Trametes versicolor*), HLK140716b (*Irpex lacteus*) und BH31 (*Bjerkandera adusta*) sind Isolate von Basidiomyceten. Sie wurden aus einer AIT-eigenen Stammsammlung in Tulln, Österreich (Austrian Institut of Technology) erhalten. Die *Trichoderma reesei* Stämme wurden bei dem FUNGI4BIONERGIE Project durch Kreuzung optimiert und dafür wurden die Pipettierroboter der Inhouse-Forschungseinrichtung Bioactive Microbial Metabolites (BiMM) in Tulln, Österreich verwendet. Diese Stämme werden in Abbildung 6 dargestellt. F0 stellt die *Trichoderma reesei* Stämme dar, die aus dem Boden isoliert wurden. Die Stämme, die in Grün dargestellt wurden, wurden in der vorliegenden Masterarbeit verwendet. Die Nachkommen der Kreuzung sind wie folgt: F1 sind Nachkommen der Kreuzungen von F0-Stämmen, F2 sind Nachkommen der Kreuzungen von F1-Stämmen und F3 sind Nachkommen der Kreuzungen von F2 Stämme.

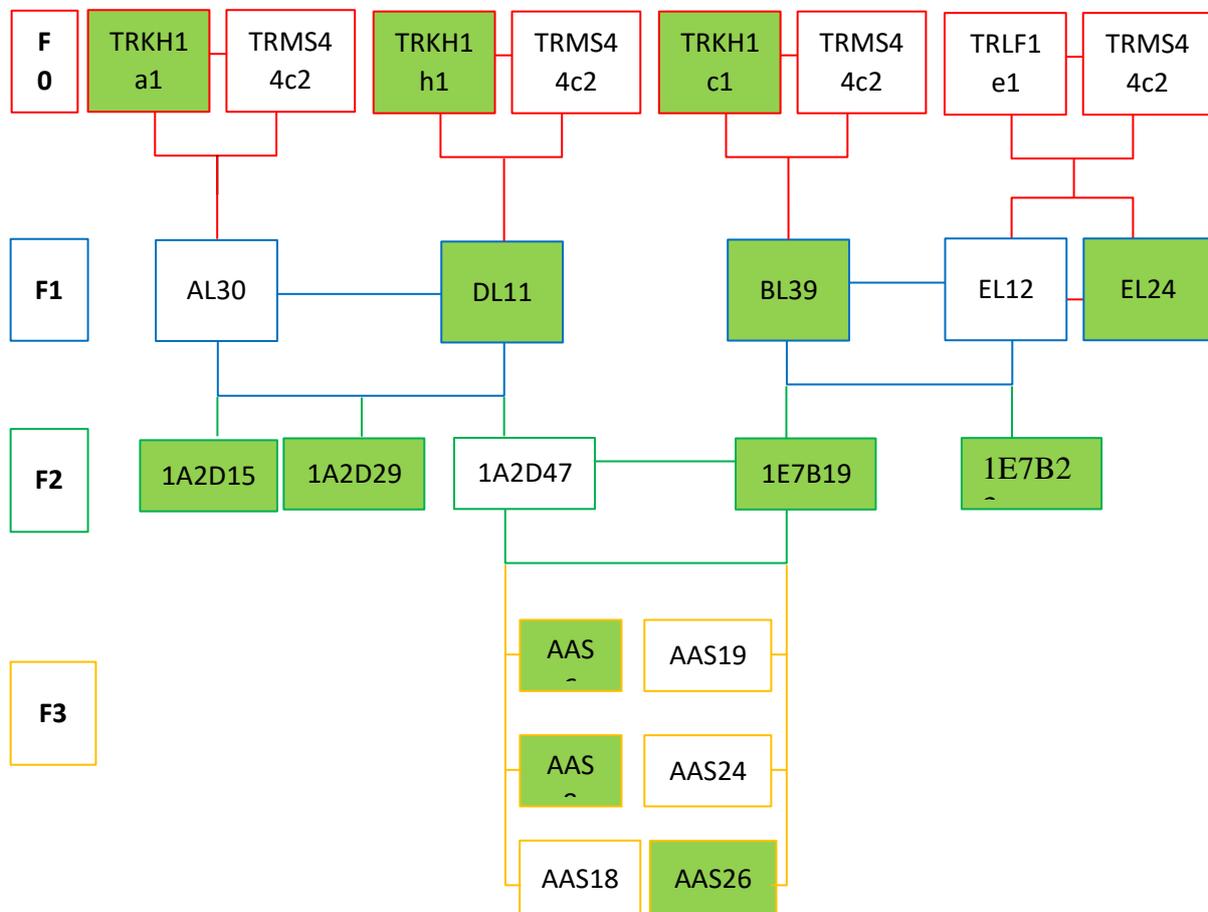


Abbildung 6: Österreichische *Trichoderma reesei*-Relation, Project FUNGI4BIOENERGIE

---

Die Stämme, die zu F0 gehören, wurden wie folgt kodiert:

TRKH1a1 =A    TRKH1h1=D    TRLF4a2 =G    TRLF4f1 =J  
TRKH1c1 =B    TRLF1e1 =E    TRLF4d2 =H    TRLF4h1=K  
TRKH1d1 =C    TRLF4a1 =F    TRLF4e1 =I    TRMS44c2=L

Die Nachkommen von F1 wurden wie folgt kodiert:

AL30=1A    BL39=7B    DL11=2D    EL12=1E    EL24=2E

Die Nachkommen von F2 wurden wie folgt kodiert:

1A2D47=AA    1E7B19=S

Somit wurden die Namen der Nachkommen wie folgt bestimmt: Der Name DL11 bedeutet, dass D von TRKH1h1 kommt und L von TRMS44c2 kommt. 11 bedeutet elfter Nachkommen der Kreuzung von TRKH1h1 und TRMS44c2. Die anderen Namen der Nachkommen wurden mit dieser Methode erstellt.

### 3.1.2 Rohstoffe, Enzyme, Filter und die Silicaplatte

In den Versuchen wurde als Ausgangsmaterial das Maisstroh verwendet, das in Königsbrunn am Wagram (Niederösterreich) geerntet wurde. Für die Vorbehandlung wurde das Maisstroh mittels einer Messermühle auf einer Partikelgröße von <1mm gemahlen. Für Säurehydrolyse und Van Soest wurde es mittels Kugelmühle zu Pulver gemahlen.

Die Enzymatische Hydrolyse wurde mittels einem industriellen Enzymemix durchgeführt. Der Enzymemix (Cellic CTec2, Cellulase, enzyme blend, > 1000U/g) wurde von der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, US) gekauft.

Bei der Hydrolyse wurden zwei Typen von Filtern verwendet. Bei der enzymatischen Hydrolyse wurde ein 0.45µm Filter und bei der Säurehydrolyse wurde einer mit 0.20µm verwendet. Die Eigenschaften dieser Filter wurden in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Die Filter, die bei der Hydrolyse verwendet wurden

Name	Artikelnummer	Größe	Steril/ unsteril	Lieferant
LLG-Spritzenvorsatzfilter	9.055 503	0.45µm	unsteril	LLG Labware/USA
LLG-Spritzenvorsatzfilter	9.055 500	0.20µm	unsteril	LLG Labware/USA

Bei der Zuckeranalyse (HPTLC) wurden Merck AMD-Silica-Platten (20 × 10 cm mit 100 µm Schichtdicke, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

### 3.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien, die in den Versuchen verwendet wurden, werden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Die Chemikalien, die in den Versuchen verwendet wurden. Sie wurden mit der Artikelnummer, der Konzentration sowie den Lieferanten dargestellt.

Name	Artikelnummer	Konzentration	Lieferant
Aceton	361007.1612	≥99.9 %	AppliChem GmbH/Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N)	HN44.2	≥99.9 %	AppliChem GmbH/Darmstadt, Deutschland
Acid Detergent Solution	FAD20C	-	Ankom/ NY, USA
Anilin (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N)	131156.1609	99.5 %	AppliChem GmbH/Darmstadt, Deutschland
Arabinose	5118.2	≥99 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Bernsteinsäure (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> )	2725.3	≥99.9 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Butanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	CL00.0243.2500	≥99.8+%	Chem-Lab NV /Zedelgem, Belgien
Decahydronaphthalin (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> )	D1738	≥99 %	TCI/Tokyo, Japan
Galactose	4987.1	≥98 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Glucose	X997.2	Wasserfrei	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	T876.1	≥98 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Diphenylamin (C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N)	112763	99 %	Sigma-Aldrich/Missouri, US
Mannose	42220.2	≥99.5 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Methanol (MeOH)	34860-2.5L	≥99.9 %	Honeywel/Polen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	T879.1	≥99.9 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxide (NaOH)	T196:3	32 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	8637.1	≥98 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Neutral Detergent Solution	FND20C	-	Ankom/ NY, USA
Orthophosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	30417-1L	≥85 %	Honeywel/Polen
Pentanol (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O)	138975-1L	≥99.9 %	Honeywel/Polen
Triethylenglykol	TT0250	100 %	Ankom/ NY, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	9316	96%	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4319.3	75%	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland
Xylose	5537.1	≥99 %	Carlroth/Karlsruhe, Deutschland

---

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Pilzanzucht und Ernten der Pilzplatte

Die *Trichoderma reesei* Stämme wurden auf 3% Malzextrakt Agar angezüchtet. Malzextrakt Agar setzt sich aus 3% Malzextrakt und 1.5% Agar und Leitungswasser zusammen. Die Stämme wurden in Triplikaten inokuliert. 5µL Sporensuspension wurden für drei Platten verwendet. Die Platten wurden in der Mitte beimpft und nach einem Tag umgedreht. Die beimpften Platten wurden mit Deckel nach unten gelagert, damit Kondenswasser nicht auf die Platte tropft. Die Pilze wuchsen bei 28°C für sieben Tage. Die Sterilisation wurde durch den Autoklav bei 120°C für 20 Minuten durchgeführt. Nach sieben Tagen wurden die Pilze geerntet. Myzel und Sporen wurden steril in Eppis mit 1ml Sporesolution (0.8 % NaCl, 0.05 % Tween 80 und 25 % Glycerol in Milli-Q Wasser) überführt. Am Ende wurden sie durch die Glaswolle in andere Eppis abgefiltert. Um das Pilzwachstum der Kulturen zu ermitteln, wurde die optische Dichte gemessen. Dabei wurde die optische Dichte bei 600nm (OD600) der Sporesuspensionen gemessen. Die Sporen wurden in einem verschiedenen Verhältnis verdünnt. Dieses Verhältnis wird in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

### 3.2.2 Vorbehandlung von Biomasse



Abbildung 7: Die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzisolaten zur Vorbehandlung von Maisstroh

1.5g gemahlene Stroh wurde in 50ml Zentrifugentubes eingewogen. Die Vorbehandlungen wurden in verschiedenen Zeiträumen und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Bedingungen, Zeiträume und verwendeten Stammarten wurden in den folgenden Tabellen dargestellt.

Nach Einzelinokulierung der beiden Pilzspezies wurden die Besten für die Koinokulierung ausgewählt.

Tabelle 4: *Trichoderma reesei* Stämme für die Vorbehandlung, Vortest: 06.08.2018

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	3x10 <sup>6</sup> Sporen/mL		µL für 10 <sup>5</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
Qm6a	0,363	1,04E+09	6	1994	500
RUTC30	0,111	3,18E+08	19	1981	500
DL11	0,456	1,31E+09	5	1995	500
EL24	0,424	1,21E+09	5	1995	500

Für die erste Vorbehandlung wurden die Stämme verwendet, die in Tabelle 4 dargestellt werden. Die Sporensuspensionen wurden auf 3x10<sup>6</sup> CFU/ml (Colony Forming Units/ml) verdünnt. 500µL der 3x10<sup>6</sup> CFU/ml- Sporensolution und 5ml Leitungswasser wurden in 50ml Zentrifugentubes mit 1.5g Maisstroh hinzugefügt. Die Proben wurden bei 28°C für neun Wochen inkubiert (Tabelle 4). QM6a und RUTC30 sind Kontrollstämme und sie wurden für jede Inokulation verwendet.

Tabelle 5 : *Trichoderma reesei* Stämme zur Vorbehandlung, Vortest: 20.11.2018

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	3x10 <sup>6</sup> Sporen/mL		µL für 10 <sup>5</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
TRKH1a1	0,458	1,31E+09	2	998	170
TRKH1c1	0,126	3,61E+08	8	992	170
TRKH1h1	0,148	4,24E+08	7	993	170
BL39	0,332	9,51E+08	3	997	170
DL11	0,314	9,00E+08	3	997	170
EL24	0,403	1,15E+09	3	997	170
QM6a	0,499	1,43E+09	2	998	170
RUTC30	0,174	4,99E+08	6	994	170
Empty	-	-	-	-	-

Tabelle 5 stellt den zweiten Vortest dar. Das Verdünnungsverhältnis war das Gleiche wie das Erste. 170µL der 3x10<sup>6</sup> CFU/ml- Sporensolution und 5ml Leitungswasser wurden in 50ml Zentrifugentubes mit 1.5g Maisstroh hinzugefügt. Die Proben wurden bei 28°C für 14 Tage inkubiert. Als Kontrolle wurde Empty (unbehandeltes Maisstroh) verwendet.

Tabelle 6: Trichoderma reesei Stämme zur Kombination von Basidiomyceten, Vorbehandlung, Vortest: 21.12.2018

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	3x10 <sup>6</sup> Sporen/mL		µL für 10 <sup>5</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
QM6a	0,345	9,89E+08	3	997	170
RUTC30	0,284	8,14E+08	4	996	170
TRKH1c1	0,365	1,05E+09	3	997	170
DL11	0,508	1,46E+09	2	998	170
1A2D29	0,182	5,21E+08	6	994	170
AAS8	0,297	8,51E+08	4	996	170

Die Trichoderma-Stämme wurden mit BH31 und mit E10 getrennt kombiniert. Das Stroh wurde jeweils in 1.5g in 50ml Zentrifugentubes eingewogen. Es wurde in einem Ofen bei 105°C für 24 Stunden gelagert, um Semisterilisation zu gewährleisten. Nach der Sterilisation wurde 170µL der 3x10<sup>6</sup> CFU/ml- Sporensolution und 5ml Leitungswasser dazugegeben (Tabelle 6). Pro Tube wurden drei Agar Plug Basidiomyceten verwendet. Die Proben wurden bei 28°C für vier Wochen inkubiert. Zwei Mal pro Woche wurden sie geschüttelt und kontrolliert.

Tabelle 7: Trichoderma Stämme zur Kombination von Basidiomyceten (E10 und BH31), Vorbehandlung: 28.01.2019

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	10 <sup>8</sup> Sporen/mL		µL 2,5*10 <sup>7</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
QM6a	0,264	7,56E+08	132	868	125
RUTC30	0,541	1,55E+09	65	935	125
TRKH1a1	0,708	2,03E+09	49	951	125
BL39	0,500	1,43E+09	70	930	125
1A2D15	0,987	2,83E+09	35	965	125
AAS6	0,587	1,68E+09	59	941	125

Tabelle 8: Trichoderma Stämme zur Kombination von Basidiomyceten (E10 und BH31), Vorbehandlung: 04.02.2019

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	10 <sup>8</sup> Sporen/mL		µL 2,5*10 <sup>7</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
QM6a	0,550	1,58E+09	63	937	125
RUTC30	0,503	1,44E+09	69	931	125
TRKH1h1	0,542	1,55E+09	64	936	125
EL24	0,372	1,07E+09	94	906	125
1E7B23	0,700	2,01E+09	50	950	125
AAS26	0,267	7,65E+08	131	869	125

Tabelle 9: Trichoderma Stämme zu Kombination von Basidiomyceten (HLK140716b und MB52), Vorbehandlung: 11.02.2019

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	10 <sup>8</sup> Sporen/mL		µL 2,5*10 <sup>7</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
QM6a	0,311	8,91E+08	112	888	125
RUTC30	0,135	3,87E+08	259	741	125
TRKH1c1	0,261	7,48E+08	134	866	125
DL11	0,283	8,11E+08	123	877	125
1A2D29	0,247	7,08E+08	141	859	125
AAS8	0,401	1,15E+09	87	913	125

Die Trichoderma-Stämme wurden mit BH31, E10, HLK140716b und MB52 getrennt kombiniert. Im Unterschied zum Vorherigen wurden die Sporsuspensionen auf 10<sup>8</sup> CFU/ml verdünnt, 125µL der 10<sup>8</sup> CFU/ml- Sporensolution dazugegeben und die Proben wurden für acht Wochen inkubiert. Zwei Mal pro Woche wurden sie geschüttelt und kontrolliert. Bei der vierten Woche wurden die Deckel getauscht. Statt Plastikdeckel wurde Vlies verwendet. Somit wurden die Pilze gut belüftet. Das Vertauschen wurde in der Sterilwerkbank durchgeführt. Zusätzlich wurden 5ml Leitungswasser hinzugefügt (Tabellen 7,8 und 9).

Tabelle 10: Trichoderma Stämme zur Kombination von Basidiomyceten (E10 und BH31), Vorbehandlung: 18.03.2019

ID	OD600	Konz (Sporen/mL)	10 <sup>8</sup> Sporen/mL		µL für 2,5*10 <sup>6</sup> Sporen
	1:100		µL cells	µL spore solution	
QM6a	0.192	5.50E+08	182	818	125
RUTC30	0.150	4.30E+08	233	767	125
TRKH1c1	0.124	3.55E+08	281	719	125
DL11	0.207	5.93E+08	169	831	125
1A2D29	0.101	2.89E+08	346	654	125
AAS8	0.313	8.97E+08	112	888	125

Die Trichoderma-Stämme wurden mit BH31 und E10 getrennt kombiniert. Die Sporsuspensionen wurden auf 10<sup>8</sup> CFU/ml verdünnt, 125µL der 10<sup>8</sup> CFU/ml- Sporensolution dazugegeben und die Proben wurden für drei Monaten inkubiert. Zwei Mal pro Woche wurden sie geschüttelt und kontrolliert. Statt Plastikdeckel wurde Vlies verwendet. Somit wurden die Pilze gut belüftet. Zusätzlich wurden 5ml Leitungswasser hinzugefügt (Tabelle 10).

### 3.2.3 Enzymatische Hydrolyse

Um die enzymatische Hydrolyse zu starten, müssen die folgenden Bedingungen gelten: pH 5.0-5.5 und Temperatur 50-55 °C. Die pH-Stabilisierung wurde mit Hilfe einer Pufferlösung geschaffen. Für diesen Schritt wurde 0.2 M Succinat-Buffer hergestellt. Für den Puffer wurden

---

zwei Lösungen von 0.2 M Bernsteinsäure ( $C_4H_6O_4$ ) und 0.2 M Natriumhydroxid (NaOH) vorbereitet. 23.6 g  $C_4H_6O_4$  wurde in 500ml doppelt destilliertem Wasser gelöst und 19.23 ml 32 % NaOH hinzugefügt, dann wurde mit doppelt destilliertem Wasser auf 500ml aufgefüllt. Mehr NaOH wurde hinzugefügt, bis der pH-Wert auf fünf stieg. Die Pufferlösung wurde bis zur Verwendung bei  $-4^\circ C$  gelagert. Die Zeitabstände für enzymatische Hydrolyse waren wie Folgende bestimmt: Für die erste Vorbehandlung (Vortest): 0,4h, 7h, 24h, für die zweite Vorbehandlung: 0,3h, 6h, 9h, 24h und für die Nachfolgenden in 0,3h, 6h, 24h und 96h. 15 ml Succinatpuffer, 9,8 ml doppelt destilliertes Wasser und vier Stahlkugeln wurden in die Tubes dazugegeben. Für T0 wurde eine 2ml Probe genommen. Dann wurde 200 $\mu$ L Enzymemix in die Tubes zugegeben. Die enzymatische Hydrolyse wurde bei  $50^\circ C$  im Wasserbad (130 rpm) unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Zeitpunkt wurden 2ml Proben genommen. Dann wurden diese Proben abzentrifugiert und über 0,45 $\mu$ m oder 0,2 $\mu$ m Filter in die Vials filtriert. Bis zur Messung wurden sie bei Minus  $20^\circ C$  gelagert.

### **3.2.4 Bestimmung von Cellulose-, Hemicellulose- und Ligningehalt durch Säurehydrolyse**

Die Bestimmung von Cellulose-, Hemicellulose- und Ligningehalt durch Säurehydrolyse wurde anhand NREL-Methode TP-510-42618 (2012) durchgeführt (Sluiter 2008). Zur Säurehydrolyse von Maisstroh wird das Stroh durch die Kugelmühle zu feinem Pulver gemahlen. Das gemahlene Stroh wurde dann in einem Ofen bei  $40^\circ C$  getrocknet. 0,3 g Proben wurden in ein Glasrohr eingewogen. Als nächster Schritt wurden 3ml 72%iger Schwefelsäure zugegeben. Die Glasrohre wurden bei  $30^\circ C$  im Wasserbad für eine Stunde kontinuierlich mit einem Glasstab gerührt. Anschließend wurden die Proben durch doppelt destilliertes Wasser auf 4% verdünnt und das Gemisch bei  $121^\circ C$  für eine Stunde gekocht. Nach Abkühlung wurden sie durch Filtertiegel mit Hilfe eines Vakuums filtriert. Ein Teil der filtrierten Flüssigkeit wurde in die Tubes abgefüllt. Die Flüssigkeit wurde später über 0,2 $\mu$ m Filter in die Vials filtriert und folglich wurden die Proben 1:6 verdünnt und bis zur Messung bei Minus  $20^\circ C$  gelagert. Der Inhalt der Filter wurde mit heißem, destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in einem Ofen bei  $105^\circ C$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und nach Abkühlung eingewogen. Die Filtertiegel wurden in einem Muffelofen gelagert und mit einer Rampe in drei Stunden auf  $500^\circ C$  erhitzt und über fünf Stunden verascht. Trockenmasse (Abschnitt 3.3.3) minus Asche ist gleich Lignin. Hemicellulose- und Cellulosegehalt wurden durch HPTLC gemessen. Bei der HPTLC-Analyse stellt die Menge an Glucose den Cellulosegehalt dar, sowie die Menge an Xylose, Arabinose, Mannose und Galactose den Hemicellulosegehalt. Dazu wurden die notwendigen Zuckerstandards wie folgt hergestellt: Jeweils 0.125 g Zucker (Glucose, Mannose, Xylose, Arabinose und Galactose) wurden in die Tube gegeben. 50ml doppelt destilliertes Wasser wurde zugegeben und vor der Verdünnung geschüttelt. Die Verdünnungsverhältnisse wurden wie folgt berechnet:

S(Standard)1, was Oben hergestellt wurde.

S2: 5ml S1 + 5ml H2O (1:2)

CVS: 5ml S1 + 10ml H2O (1:3)

S3: 5ml S2 + 5ml H2O (1:4)

S4: 5ml S3 + 5ml H2O (1:8)

S5: 5ml S4 + 5ml H2O (1:16)

### 3.2.5 Analyse der Zuckerkonzentration mittels HPTLC

Nach Oberlechner (2018) wurde die Quantifizierung der Zucker mittels HPTLC durchgeführt. Vor der Messung wurde die Merck AMD Silica Platte zuerst vorgewaschen, dann imprägniert. Für das Vorwaschen wurde die Platte in MeOH: H<sub>2</sub>O (6:1, v/v) für 15 Minuten gewaschen, dann wurde sie herausgenommen und bei der Raumtemperatur für 20 Minuten in aufrechter Position getrocknet. Für den nächsten Schritt wurde sie wieder in MeOH: H<sub>2</sub>O (6:1, v/v) für eine Minuten gewaschen. Danach wurde sie wieder bei Raumtemperatur für 20 Minuten in aufrechter Position gelagert. Am Ende wurde sie in einem Ofen bei 105°C für 15 Minuten getrocknet

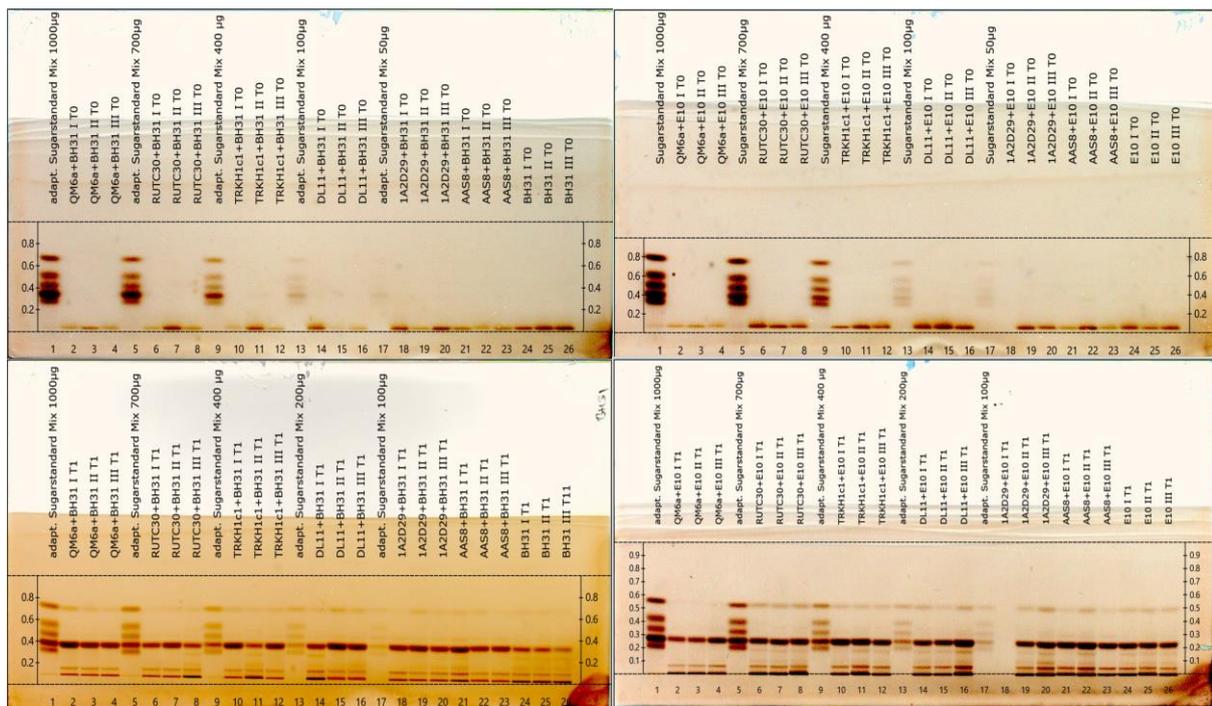


Abbildung 8: HPTLC mit der Merck AMD-Silica-Platte, vorgewaschen und mit Natriumdihydrogenphosphat-Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 6,8, 0,2 M) imprägniert, zwei Entwicklungen und Derivatisierung mit Anilindiphenyl

---

Die vorgewaschenen Platten wurden mit einem Natriumdihydrogenphosphat-Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH 6,8, 0,2 M) imprägniert. Für den Puffer wurden zwei Lösungen vorbereitet. Erste Lösung war 0.5 M Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ): 109,1539g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  wurde in einem Liter doppelt destilliertem Wasser gelöst. Für die zweite Lösung wurde 78.05g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in 500ml doppelt destilliertem Wasser gelöst. 92.52 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wurde mit 107.5ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung kombiniert und pH wurde auf 6.8 korrigiert.

Für die Standardlösungen wurden Galactose (0.05g), Glucose (0.1g), Mannose (0.05g), Arabinose (0.05g) und Xylose (0.05g) in die 100ml Tube eingewogen und mit doppelt destilliertem Wasser auf 100ml aufgefüllt. Dann wurden diese Standardlösung auf 700 $\mu\text{g}$  / ml, 400 $\mu\text{g}$  / ml, 100mg / ml, 50 $\mu\text{g}$  / ml und 25 $\mu\text{g}$  / ml verdünnt, um Standardmix zu erhalten. Dieses wurde wie folgt erhalten:

Stock Lösung: 1000 $\mu\text{g}$ /ml, STD1 (Standard)= 1000 $\mu\text{g}$ /ml

STD 2=700 $\mu\text{g}$ /mL	7mL STD1	+	3mL ddH <sub>2</sub> O
STD 3=400 $\mu\text{g}$ /mL	4mL STD1	+	6mL ddH <sub>2</sub> O
STD 4=100mg/mL	1mL STD1	+	9mL ddH <sub>2</sub> O
STD 5=50 $\mu\text{g}$ /mL	500 $\mu\text{L}$ STD1	+	9.5mL ddH <sub>2</sub> O
STD 6=25 $\mu\text{g}$ /mL	250 $\mu\text{L}$ STD1	+	9.75mL ddH <sub>2</sub> O

Proben und Standards wurden unter Verwendung eines automatischen TLC-Samplers 4 (ATS 4, Camag, Muttenz, Schweiz) aufgetragen. 100 $\mu\text{l}$  Proben und STD-Mischung wurden in HPLC-Vials überführt. Die Sequenztabelle wurde nach Proben programmiert. Die Auftragung wurde wie die folgenden Einstellungen durchgeführt: Bandlänge 8mm, Track-Distanzen 10mm, Dosiergeschwindigkeit 150nl s<sup>-1</sup>, Anwendungsposition für die X-Achse 10mm und für die Y-Achse 8mm, Nadelheizung 40°C. Es wurden 1 $\mu\text{l}$  oder 2 $\mu\text{l}$  STD und Proben aufgetragen. Das Instrument wurde unter Verwendung der Software-Plattform VisionCATS 2,2 (Camag, Muttenz, Schweiz) gesteuert.

Die Entwicklung wurde in einer automatisierten Entwicklungskammer (ADC2, Camag, Muttenz, Schweiz) durchgeführt. Die Platte wurde im Magnetplattenhalter der Entwicklungskammer platziert. Vor-, nach- und zwischen der Benutzung wurde die Entwicklungskammer mit Aceton gespült. Der Gasaustausch wurde mit der Software aktiviert. Die Feuchtigkeit wurde mit LiCl auf 11% für zehn Minuten eingestellt. Die Migrationdistanz wurde auf 60mm und die Trockenzeit auf zehn Minuten eingestellt. Für die erste Entwicklung wurde 8ml Acetonitril-Pentanol-H<sub>2</sub>O und für die zweite Entwicklung 8ml Acetonitril-Butanol-H<sub>2</sub>O in den ersten Kanal gefüllt. Die verbrauchte Lösung wurde wie folgt hergestellt:

Acetonitril-Pentanol-H<sub>2</sub>O: 4/1/1(v/v/v) =400ml Acetonitril+100ml Pentanol+100ml H<sub>2</sub>O

Acetonitril-Butanol-H<sub>2</sub>O: 4/1/1(v/v/v) =400ml Acetonitril+100ml Butanol+100ml H<sub>2</sub>O

Die nach chromatographische Derivatisierung wurde mit Anilin-Diphenylamin-Lösung durchgeführt. Für diese Lösung wurde zuerst 5g Diphenylamin durch Hinzufügen von Aceton zu 250ml vervollständigt. Dann wurde 5ml Anilin durch Hinzufügung von Aceton auf 250ml

---

vervollständigt. Anschließend wurden 70ml von beiden mit 10ml Orthophosphorsäure gemischt. Die Lösung wurde bei Minus 20°C in Dunkelheit bis zur Verwendung gelagert. Die Entwickelte Platte wurde für eine Sekunde in die Anilin-Diphenylamin-Lösung eingetaucht. Die Rückseite der Platte wurde mit einem Papiertuch abgewischt. Anschließend wurde die Platte auf der Heizplatte (Ceran 500, LHG, Leipzig, Deutschland) bei 120°C für drei Minuten getrocknet.

Ein Camag TLC-Visualizer wurde verwendet, um die Platte zu fotografieren. Die derivatisierte Platte wurde mit der Silicaseite nach oben und mit der Beschriftung auf der Rückseite im Visualizer gelegt. Die Bilder wurden mit weißem Licht, und UV 254 und UV 366nm aufgenommen. Messungen zur Quantifizierung wurden unter Verwendung eines TLC-Scanners III (Camag, Muttenz, Schweiz) bei 366nm durchgeführt. Der Spektrum-Scan betrug 0-700nm für interessierende Banden in interessierenden Proben. Die Chromatogramme der Proben wurden visuell geprüft und die Rf-Werte markiert. Die Höhe des Werts für die bekannten Standards wurde nach dem Scannen übernommen. Des Weiteren konnten die Standard-Rf-Werte festgestellt werden, die zur Ermittlung der Höhe und Fläche der untersuchten Substanzen in den Proben herangezogen wurden. Unter Verwendung der Kalibrierungsgleichung wurde der Wiederfindungswert unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Besten Regressionsmodell von Mime1 und Mime2 wurde verwendet, welches gut angepasst wurde. Dabei muss der R Wert  $\geq 99\%$  sein.

### **3.2.6 Bestimmung Trockenmasse (TM) von Maisstroh**

Die Trockenmasse oder Trockensubstanz des Maisstrohs wurde durch Abzug der Masse des erhaltenen Wassers in einem Trockenofen bei 105°C ermittelt. 4g Maisstroh wurden gewogen und in einem Ofen bei 105°C für 24 Stunden getrocknet. Dann wurde das Maisstroh in einem Exikator für eine Stunde abgekühlt. Anschließend wurde das Stroh wieder ausgewogen und die Massdifferenz wurde bestimmt. Diese Differenz wurde durch die Menge an Trockenmasse dargestellt.

### **3.2.7 Bestimmung von Cellulose-, Hemicellulose- und Ligningehalt durch Van Soest**

Die Van Soest-Analyse ist eine verbreitete Methode, um die Erfassung der Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin zu bestimmen. Diese Methode basiert auf der Bestimmung der Neutral-Detergenz Fasern (NDF) und Säure-Detergenz-Fasern (ADF) (Van Soest 1965).

Vor der NDF-Analyse wurde eine NDF-Lösung hergestellt. Für 500ml Lösung wurden 30g Neutral-Detergent Lösung, 5ml Triethylenglykol und 500ml H<sub>2</sub>O verwendet. Die Chemikalien wurden auf der CAT-Heizplatte in die NDF-Glasflasche gefüllt. Das zu analysierende Stroh wurde zuerst zu Pulver gemahlen, dann wurden 0.5g in die NDF-Glasflasche eingewogen. Danach wurden 50ml NDF-Lösung, 1ml Decahydronaphthalin und 0.25g Natriumsulfat

---

zugefügt. Die Analyse wurde unter Verwendung des Speed Digesters durchgeführt (Speed Digester K-439, Büchi, Flawil, Schweiz). Die Glaskolben wurden mittels Halterung in den Speed Digester gestellt und aus den Einstellungen wurde die VanSoest ausgewählt. Nach dem Kochen wurden die Proben abgekühlt und durch Filtertiegel mit Hilfe eines Vakuums filtriert. Vor der Verwendung wurden die Filtertiegel in einem Muffelofen bei 500°C für drei Stunden verascht. Nach dem Erhitzen wurden der Filter im Exikator zuerst abgekühlt und dann gewogen. Das war als erste Einwaage. Die Glasflasche wurden mit heißem Wasser in dem Filter unter Vakuum gewaschen. Die Filter wurden bis zur Farblosigkeit mit Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Filtertiegel in einem Ofen bei 105°C für acht Stunden getrocknet, dann im Exikator gekühlt und gewogen. Das war die zweite Einwaage. Der NDF wurde wie folgt berechnet.

$$NDF = \frac{(\text{erstes Gewicht des Filters} - \text{zweites Gewicht des Filters}) * 100}{(\text{Gewicht der Biomasse}) * (TM/100)}$$

Die NDF beinhaltet die gesamten Faserbestandteile und ist somit Cellulose, Hemicellulose und Lignin. ADF beinhaltet Cellulose und Lignin. Vor der ADF-Analyse wurde Maisstroh zu Pulver gemahlen. 0.5g Maisstroh wurde in die Glasflasche eingewogen. Dann wurden 50ml ADF-Lösung und 0.5ml Decahydronaphthalin hinzugefügt. Für die ADF-Lösung wurden 10g Acid Detergent Solution und 0.5M Schwefelsäure zusammengefügt. 500ml 0.5M Schwefelsäure wurden durch Mischung von 500ml H<sub>2</sub>O und 12,79ml 96% Schwefelsäure hergestellt. Die Analyse wurde unter Verwendung des Speed Digesters durchgeführt (Speed Digester K-439, Büchi, Flawil, Schweiz). Nach dem Kochen wurden die Proben abgekühlt und durch die vorbereiteten Filtertiegel filtriert. Die Glasflasche wurde mit heißem Wasser gewaschen und diese Waschung wurde auch durch die Filtertiegel filtriert. Dann wurden die Filtertiegel mit Aceton bis zur Farblosigkeit gewaschen. Die Filtertiegel wurden vor dem Filtrieren in einem Muffelofen gelagert und mit einer Rampe von drei Stunden auf 500°C für fünf Stunden erhitzt. Im Exikator wurden diese Filtertiegel abgekühlt und dann wurden sie eingewogen. Nach Verwendung bzw. nach Filtration wurden die Filtertiegel in einem Ofen bei 105°C für drei Stunden getrocknet. Am Ende wurden sie nach der Abkühlung wieder eingewogen. Die restlichen Filtrate wurden für die Lignin Analyse (ADL) aufbewahrt.

$$ADF = \frac{(\text{erstes Gewicht des Filters} - \text{zweites Gewicht des Filters}) * 100}{(\text{Gewicht der Biomasse}) * (TM/100)}$$

Nach der ADF-Analyse wurden die restlichen Filtrate verwendet, um eine ADL-Analyse durchzuführen. 8ml 72% Schwefelsäure wurde in die Filtrate von ADF hinzugefügt. 960ml 75% Schwefelsäure und 40ml H<sub>2</sub>O wurden verwendet, um 72% Schwefelsäure herzustellen. Mit einem Glasrührer wurde diese Mischung gerührt. Dann wurden 7ml 72% Schwefelsäure hinzugefügt und wieder gerührt. Danach wurde die Mischung bei 20-23°C für drei Stunden stehen gelassen und alle zehn Minuten gerührt. Nach den drei Stunden wurden die Proben mit Hilfe eines Vakuums filtriert, und wurden mit heißem Wasser bis zu einem pH-Wert von 6-7

---

gewaschen. Nach dem Waschen wurden sie zuerst in einem Ofen bei 105°C für drei Stunden getrocknet, dann wurden sie in einem Exikator gekühlt und am Ende wurden sie eingewogen. Die Filter mit Inhalt wurden in einem Muffelofen mit einer Rampe für drei Stunden bis 500°C ruhen gelassen. Dann wurden die Proben bei 500°C für zwei Stunden verascht. Im Exikator wurden sie für eine Stunde gekühlt und dann wurden sie eingewogen.

### **3.2.8 Statistische Datenauswertung**

Die in Tabellen und Abbildungen angegebenen Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten Versuche.

Die statistische Analyse wurde mit der R Version 3.6.2 durchgeführt. Die Daten wurden mit ANOVA-Test analysiert und das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  determiniert.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse Ausgangsmaterial

Cellulose und Hemicellulose wurden unter Verwendung von zwei verschiedenen Standardverfahren bestimmt, der Van-Soest-Methode und der Säure Hydrolyse des National Renewable Energy Laboratory (NREL). Die Analyseergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst und wurden im Folgenden besprochen.

Tabelle 11: Zusammenfassung der chemischen Analyseergebnisse des Ausgangsmaterials

Parameter		Inhalt	
TM		% FM	92,85
Cellulose (nach Van Soest)		% TM	31,93
Hemicellulose (nach Van Soest)		% TM	25,95
Lignin (nach Van Soest)		% TM	17,33
Cellulose (nach Säure Hydrolyse) (Glucan)		% TM	26,91
Hemicellulose (nach Säure Hydrolyse)	Xylan	% TM	19,44
	Arabinan	% TM	1,82
	Galaktan	% TM	NB
	Mannan	% TM	NB
Lignin (nach Säure Hydrolyse)		% TM	17,86

Durch Gewichtsreduktion der Frischmasse in einem Trockenofen bei 105°C wurde eine Trockenmasse von 92,85% gemessen. Nach Van Soest lassen der Gehalt von Cellulose, Hemicellulose und Lignin mit jeweils 31,93 %, 25,95 % und 17,33% TM auf einen hohen Faseranteil schließen.

Die Menge an Cellulose ist mit einem Wert von 31,95% um absolut 6,93 % geringer, als der Wert, der von Li, Kim und Nghiem (Li et al. 2010) mit 38,3% festgestellt wurde. Die festgestellte Menge an Hemicellulose von 25,8% stimmt sehr genau mit dem hier festgestellten überein. Ebenso stimmt die festgelegte Menge an Lignin von 17,4% sehr genau mit dem hier festgestellten Wert von 17,33% überein. Nach der Säure Hydrolyse lässt sich der Gehalt von Cellulose, Hemicellulose und Lignin mit jeweils 26,91%, 21,26% und 17,86% festlegen. Da die Menge an Galactose und Mannose in der Zuckeranalyse nicht bestimmt wurden, wurden diese Gehalte bei der Berechnung der Menge an Hemicellulose nicht berücksichtigt.

Die festgestellte Menge von 17,4% an Lignin stimmt sehr genau mit dem durch Säure Hydrolyse festgestellten Werts von 17,86% überein. Wenn man die Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Analysen in Tabelle 10 vergleicht, ist zu sehen, dass die Menge an Cellulose und Hemicellulose bei der säure Hydrolyse etwas geringer ist.

## 4.2 Analyse der Leistung von Basidiomyceten in Kombination mit den Stämmen von *Trichoderma reesei*

Die ausgewählte Weißfäulepilze, die einen erhöhten Ligninabbau aufweisen, wurden mit den Stämmen von *Trichoderma reesei* kombiniert, um synergistisches Potential für die Vorbehandlung zu bekommen.

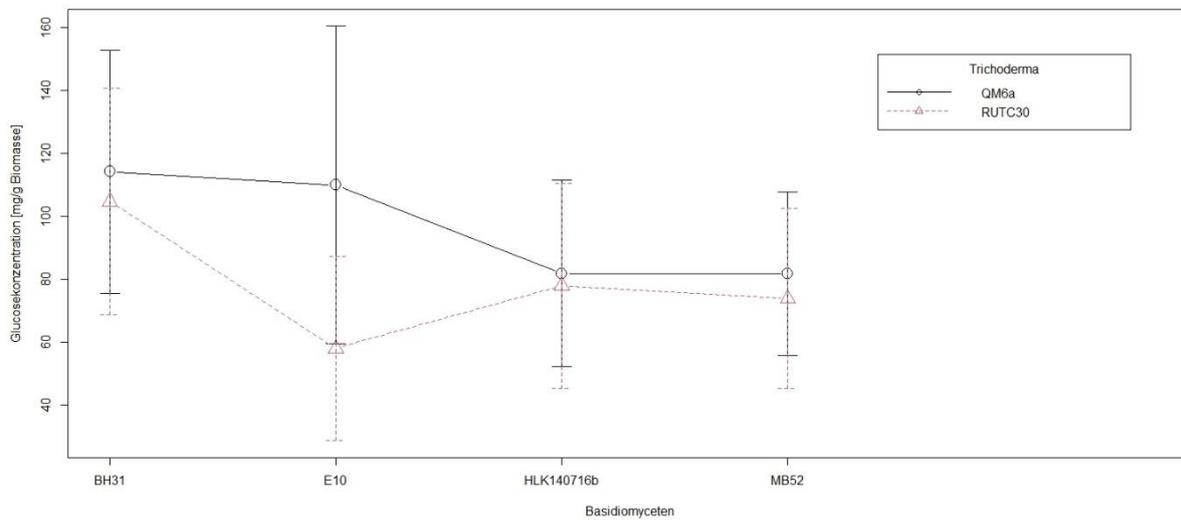


Abbildung 9: Glucoseertrag durch die Kombination von Basidiomyceten und Kontrollstämme

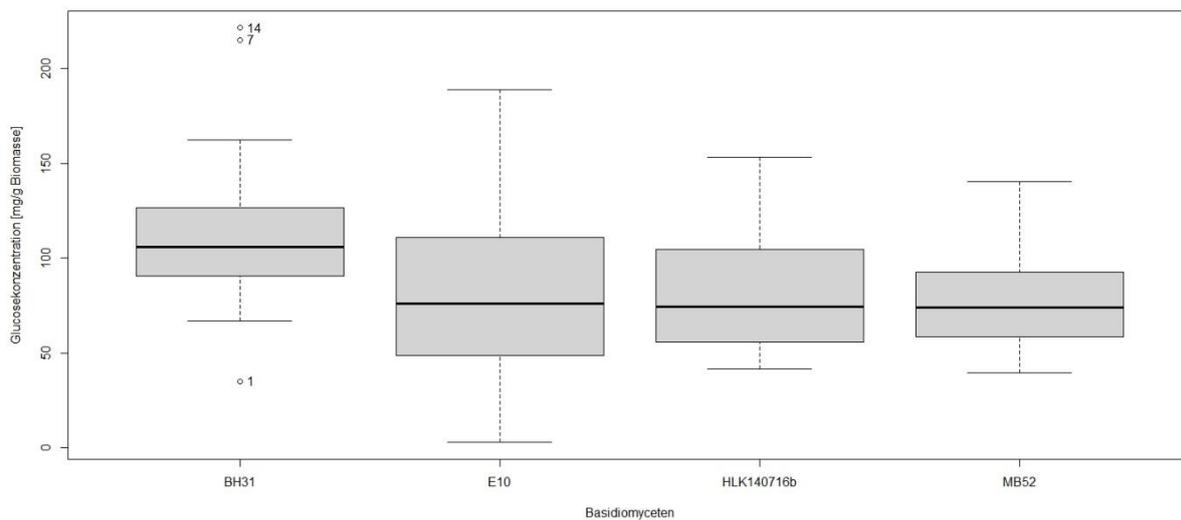


Abbildung 10: Boxplot der synergistischen Co-Inokulier

In Abbildung 9 und 10 sind die Leistungen (Glucoseertrag) von vier ausgewählten Weißfäulepilze bzw. Basidiomyceten in Kombination mit Kontrollstämmen angegeben. Gleichzeitig ist die Verteilung der Leistung der Kombinationen von Basidiomyceten und Kontrollstämmen von *Trichoderma reesei* dargestellt. In beiden Abbildungen kann beobachtet werden, dass sich die Zuckerkonzentration bzw. Glucosekonzentration zwischen den Basidiomyceten mit einer Kombination von *Trichoderma reesei* unterscheidet.

Tabelle 12: Die zweifach Varianzanalyse für die Weißfäulepilze

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
E10 - BH31 == 0	-25.473	9.212	-2.765	0.0330 *
HLK140716b - BH31 == 0	-29.548	11.282	-2.619	0.0480 *
MB52 - BH31 == 0	-31.691	11.282	-2.809	0.0291 *
HLK140716b - E10 == 0	-4.076	11.282	-0.361	0.9836
MB52 - E10 == 0	-6.218	11.282	-0.551	0.9454
MB52 - HLK140716b == 0	-2.142	13.028	-0.164	0.9984

Der Einfacher ANOVA Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen BH31-E10, B31-MB52 und BH31-HLK140716b. Der Test ergab aber keinen signifikanten Unterschied zwischen E10-MB52, E10-HLK140716b und MB52-HLK140716b. Die Beobachtung für diese Basidiomyceten können als gleich angenommen werden (Tabelle 12).

### 4.3 Einfluss des Zeitabstands auf die Ausbeute an Glucose

In Abbildung 11 sind die Leistungen von Basidiomyceten in Kombination mit den Kontrollstämmen für verschiedene Zeitabstände zu beobachten. Der einfacher ANOVA Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten. Der Test ergab aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten 6-24 Stunden und Zeitpunkten 3-96 Stunden. Die Abbildung 12 zeigt, dass optimale Zeitabstände für eine enzymatische Hydrolyse sechs Stunden und 24 Stunden sind.

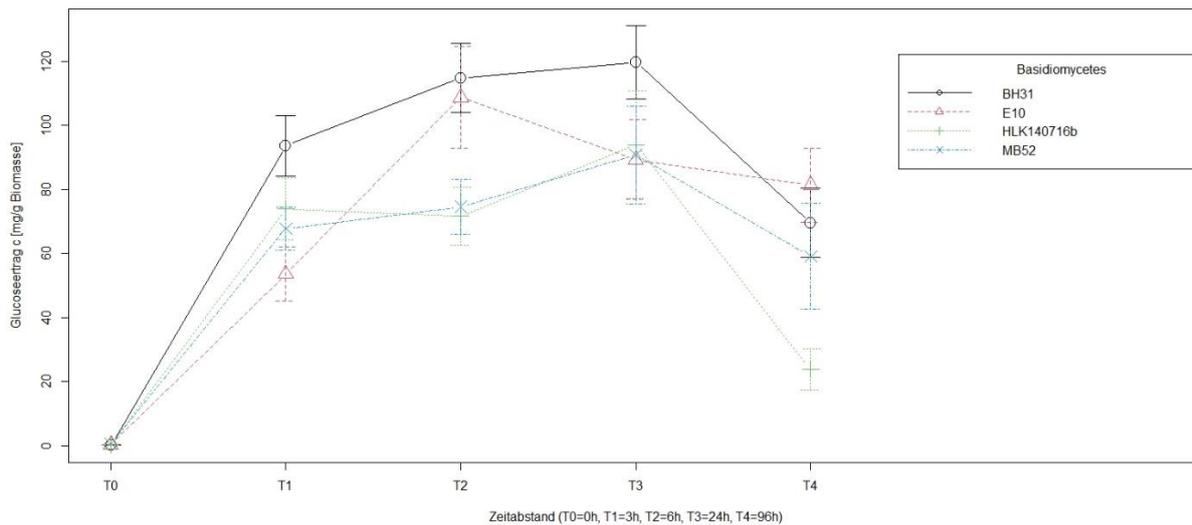


Abbildung 11: Leistung von Basidiomyceten in Kombination mit den Kontrollstämmen für verschiedene Zeitabstände

Entsprechen der statistischen Analyse hat Co-Inokulierung jedoch negative Einflüsse auf die Ausbeute an Glucose nach drei und 96 Stunden für die enzymatische Hydrolyse (Tabelle 13). Die enzymatische Hydrolyse kann nicht bei dem Ausgangspunkt (Zeitpunkt Null) erwähnt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden noch keine Enzyme aktiviert. Die Ausbeute an Glucose zu diesem Zeitpunkt wurde durch Co-Inokulierung erhalten.

Tabelle 13: Die zweifach Varianzanalyse für die Zeitabstände

Linear Hypotheses:					
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
24h - 0h == 0	100.132	10.078	9.936	< 0.001	***
3h - 0h == 0	72.378	10.078	7.182	< 0.001	***
6h - 0h == 0	98.576	10.078	9.782	< 0.001	***
96h - 0h == 0	66.183	10.186	6.497	< 0.001	***
3h - 24h == 0	-27.754	8.651	-3.208	0.01368	*
6h - 24h == 0	-1.556	8.651	-0.180	0.99976	
96h - 24h == 0	-33.949	8.777	-3.868	0.00141	**
6h - 3h == 0	26.198	8.651	3.028	0.02353	*
96h - 3h == 0	-6.196	8.777	-0.706	0.95460	
96h - 6h == 0	-32.394	8.777	-3.691	0.00281	**

#### 4.4 Einfluss der Inkubationszeit auf die Ausbeute an Glucose

Die Inokulierungen wurden innerhalb von 14 Tagen bis drei Monaten durchgeführt. In der Vortestphase wurden die Proben für 14 Tage, vier und neun Wochen inkubiert. Die

Vorversuche zeigten, dass Inkubationszeiten von weniger als acht Wochen nicht optimal sind. Daher wurden die *Trichoderma reesei* Stämme und Weißfäulepilzisolaten zur Co-Inokulierung für acht Wochen und drei Monate inkubiert. Nachdem vier ausgewählte Weißfäulepilze mit *Trichoderma reesei* Stämmen für acht Wochen inkubiert wurden, wurden zwei ausgewählt, um die Inkubationszeit für drei Monate testen zu können. Hier wurden die Isolate BH31 und E10 ausgewählt.

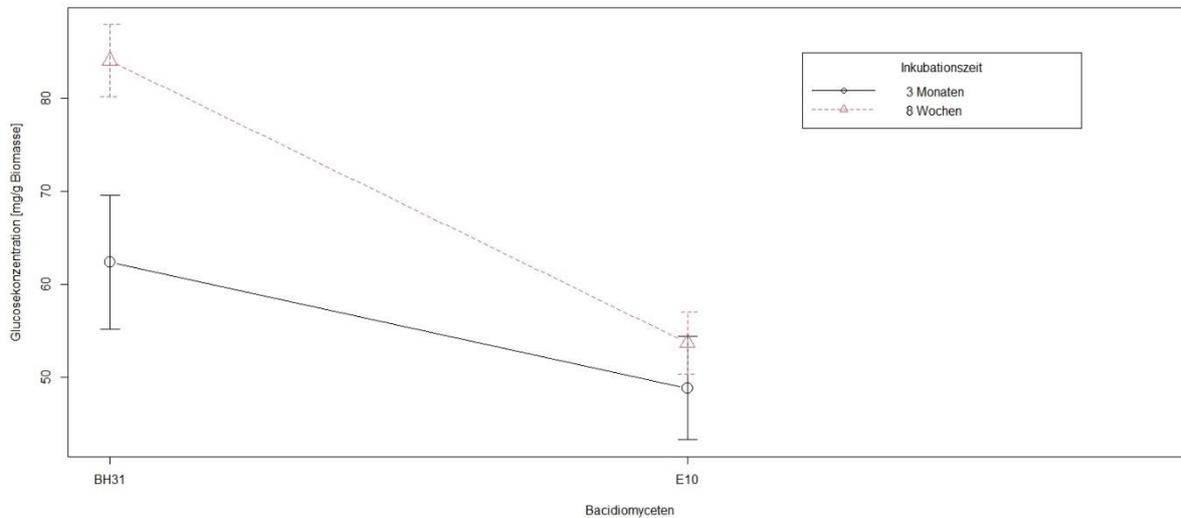


Abbildung 12: Leistung von Basidiomyceten in Kombination mit den Kontrollstämmen für verschiedene Inkubationszeiten.

In Abbildung 12 ist die synergistische Co-Inokulierung für verschiedene Inkubationszeiten ersichtlich. Abbildung 12 zeigt, dass eine Inkubationszeit von acht Wochen die optimale Zeit für die Co-Inokulierung gegenüber einer Inkubationszeit von lediglich drei Monaten ist. Die Inkubationszeit von acht Wochen hat einen positiven Einfluss sowohl auf BH31 in Kombination *Trichoderma reesei* Stämme als auch auf E10. Die Inkubationszeiten unterscheiden sich hoch signifikant voneinander ( $p < 0.00825$ ) (Tabelle 14).

Tabelle 14: Der einfache ANOVA-Test für acht Wochen und drei Monate Co-Kultivierung

summary (AnovaModel)						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Inkubationszeit	1	16949	16949	7.04	0.00825	**

---

## 4.5 Analyse der synergistische Co-Kultivierung für acht Wochen

In diesem Abschnitt wird die Ausbeute an Zucker nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem und vorbehandeltem Maisstroh diskutiert.

### 4.5.1 Co-Kultivierung I

Im folgenden Kapitel wird die Ausbeute an Glucose und Xylose für verschiedene Kombinationen von Weißfäulepilzisolaten und *Trichoderma reesei* Stämme behandelt.

Abbildung 13 und 15 stellen die freigesetzte Glucose und Xylose durch die Kombination von Weißfäulepilzisolat-BH31 und *Trichoderma reesei* Stämmen (TRKH1a1, BHL39, 1A2D15, AAS6) dar. In Abbildung 13 ist die Ausbeute der Glucose nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger Hydrolyse von unbehandeltem und vorbehandeltem Maisstroh angegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung von Glucose durch Co-Inokulierung bzw. durch Vorbehandlung stark beeinflusst wird. Nach sechsständiger enzymatischer Hydrolyse erreicht die Glucoseausbeute für die Kombination BH31-1A2D15 ihren Maximalwert von 187 mg pro 1g Biomasse. Während dieses Zeitintervalls erreichte, das hydrolysierte, unbehandelte Maisstroh 69 mg freigesetzte Glucose pro 1g Maisstroh.

Nach 24 Stunden sinkt die Ausbeute an Glucose von hydrolysiert behandeltem Maisstroh durch die Kombination BH31-1A2D15 auf 116 mg/g. Die freigesetzte Glucose von hydrolysierten, unbehandelter Biomasse ist nach 24 Stunden mit 74 mg/g fast gleich wie zuvor. Nach sechs und 24 Stunden erreichen alle Kombinationen ihren Maximalwert mit der Ausnahme von den Kombinationen BH31-AAS6 und BH31- BL39. Nach drei Stunden Beobachtung lässt sich feststellen, dass diese zwei Kombinationen effektiver sind. Die Ausbeute an Glucose der Vorbehandlung durch alle Kombinationen liegt unter 100 mg pro 1g Maisstroh für die drei- und 96-stündige enzymatische Hydrolyse. Dieses Ergebnis zeigt, dass sehr kurze und sehr lange Zeitintervalle für die enzymatische Hydrolyse der obigen Kombination nicht geeignet sind. Die Ausbeute an Glucose nach 24-stündiger enzymatischer Hydrolyse des unbehandelten Maisstrohs ist höher als die Ausbeute an Glucose der Kombinationen BH31-AAS6 und BH31-BL39. Nach 96 Stunden ist die freigesetzte Glucose für alle Proben weniger als die freigesetzte Glucose der unbehandelten Probe nach 24 Stunden mit Ausnahme von QM6a. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pilze die freigesetzte Glucose als Quelle für Energie verwenden.

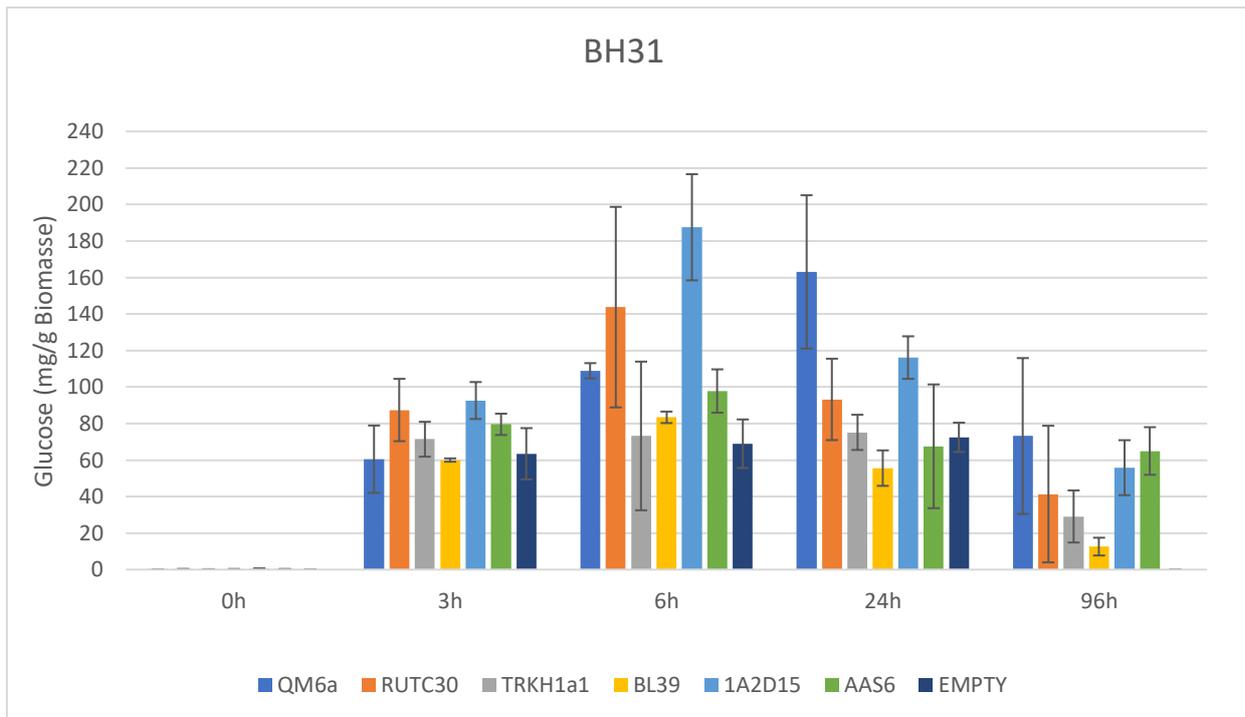


Abbildung 13: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Bei dem Ausgangspunkt (Zeitpunkt Null) wurden die Proben noch nicht hydrolysiert. Daher ist die vorhandene freigesetzte Glucose zu diesem Zeitpunkt fast null und die Kombination BH31-1A2D15 zeigt mit dem Wert von 0.4mg pro 1g Maisstroh den höchsten Wert. Mit diesem Ergebnis ist ersichtlich, dass die enzymatische Hydrolyse einen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute an Glucose hat. Nach den obigen Ergebnissen sind sechs und 24 Stunden die effizientesten Zeitintervalle für die enzymatische Hydrolyse. Die Kombination des Isolats BH31 und dem Stamm 1A2D15 ist die effektivste Kombination unter allen.

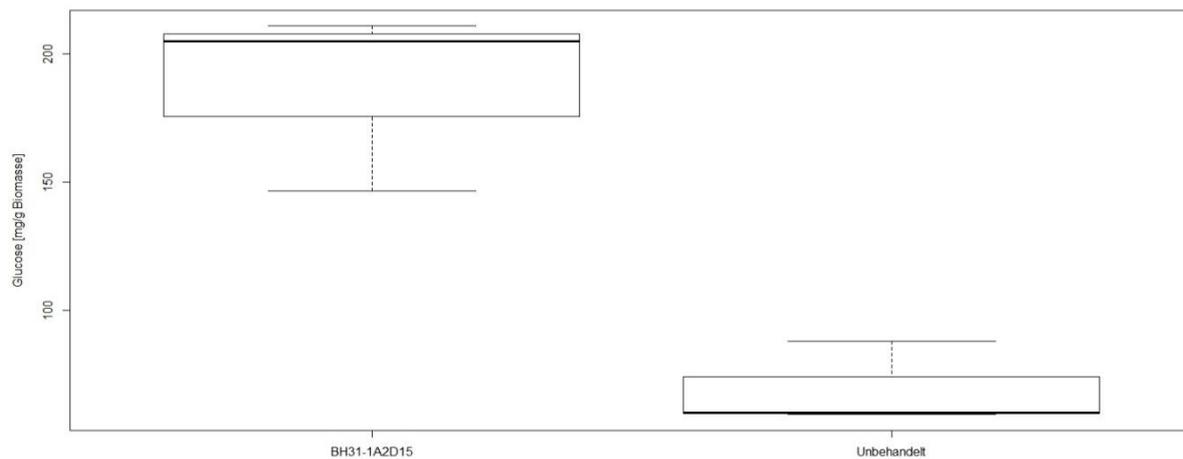


Abbildung 14: Der Unterschied zwischen den Glucoseausbeuten nach sechsständiger enzymatischer Hydrolyse von Vorbehandlung durch Kombination BH31+1A2D15 und unbehandeltem Maisstroh.

Bei der Co-Kultivierung I ist die Kombination BH31-1A2D15 für die sechsständige enzymatische Hydrolyse die effektivste Kombination unter allen. Die statische Analyse ist wie folgt: Wenn die Zeitabstände für die Kombination BH31-1A2D15 verglichen werden, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der sechsständigen enzymatischen Hydrolyse und der drei-, 24- und 96-stündigen enzymatischen Hydrolyse. Da ist der p-Wert kleiner als 0.05 (6h - 3h p-Wert= 0.00106 \*\*, 6h - 24h p-Wert= 0.00888 \*\*, 96h - 6h p-wert= 0.001 \*\*\*). Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der Ausbeute an Glucose von der Kombination BH31+1A2D15 und den Kombinationen BH31+BL39 (p-Wert=0.0474) und BH31+TRKH1a1 (p-Wert=0.0263). Aber es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Glucoseertrag der Kombination BH31+1A2D15 und der Kombinationen BH31+QM6a (p-Wert =0.1935), BH31+RUTC30 (p-Wert= 0.7603), sowie BH31+AAS6 (p-Wert=0.1784). Wenn die behandelten und unbehandelten Proben verglichen werden, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Ausbeuten an Glucose von vorbehandeltem und unbehandeltem Maisstroh. Der p-Wert beträgt dabei 0.00632. Die Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung von Glucose durch Co-Inokulierung bzw. durch Vorbehandlung stark beeinflusst wird. Das Isolat BH31 und der Trichoderma-Stamm 1A2D15 wurden für acht Wochen zusammen kultiviert (Abb. 14).

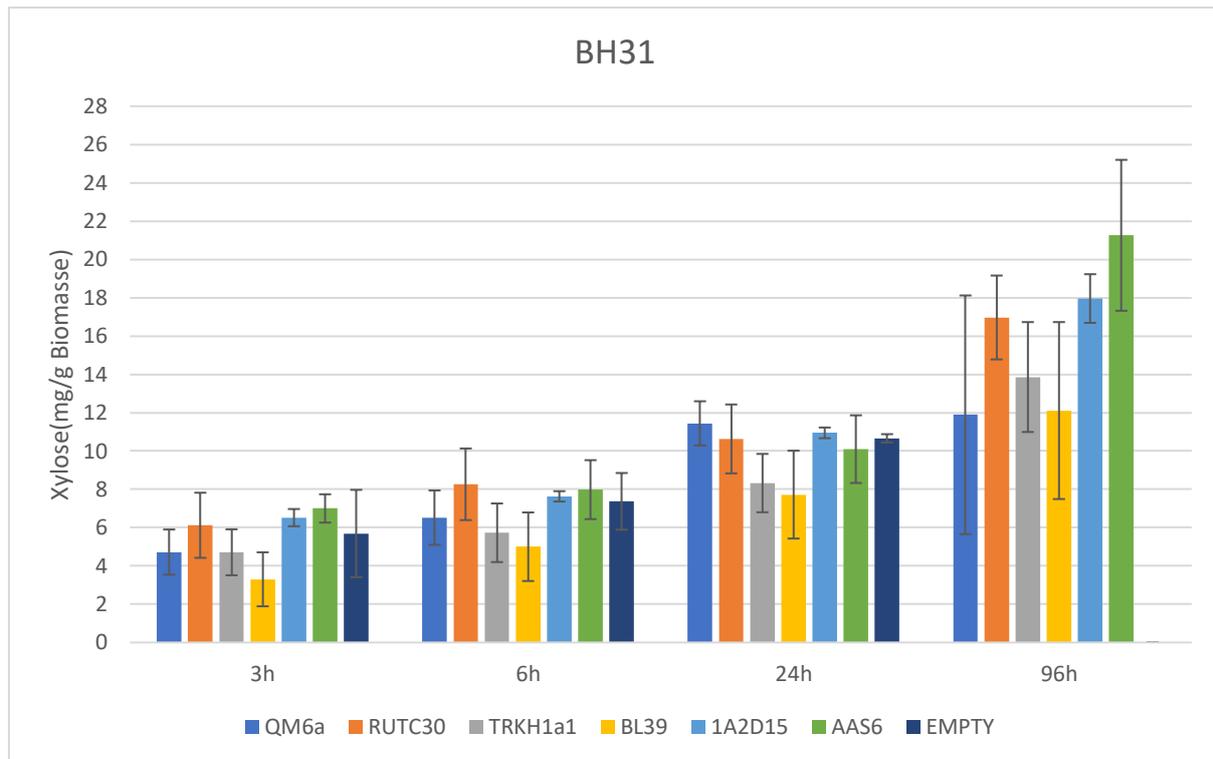


Abbildung 15: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1 g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

In Abbildung 15 ist die freigesetzte Xylose durch die Kombination von Isolate-BH31 und *Trichoderma reesei* Stämmen (TRKH1a1, BHL39, 1A2D15, AAS6) angegeben. Mit steigendem Zeitintervall steigt die Ausbeute an Xylose. Nach 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse hat die Kombination von BH31-AAS6 den höchsten Wert von 21 g freigesetzter Xylose pro 1g Maisstroh. Dann folgt die Kombination von BH31-1A2D15 mit ihrem Wert von 18 mg Xylose nach 96 Stunden. Die Leistung der Kombinationen variiert in Abhängigkeit von den Zeitintervallen. Beispielsweise sind nach drei und 96 Stunden die Kombinationen BH31-1A2D15 (18mg/g nach 96 Stunden, 6 mg/g nach drei Stunden) und BH31-AAS6 (21 mg/g nach 96 Stunden, 7 mg/g nach drei Stunden) effektiver als die anderen. Jedoch ist die Kombination BH31-RUTC30 mit ihrem Wert von 8 mg/g effektiver als die anderen Kombinationen für eine sechsstündige enzymatische Hydrolyse. Für eine 24-stündige Hydrolyse ist die Kombination BH31-QM6a mit ihrem Wert von 11 mg/g am effektivsten.

In den Abbildungen 16 und 17 sind die freigesetzte Glucose und Xylose durch die Kombination von Basidiomycet-E10 mit den *Trichoderma reesei* Stämmen (TRKH1a1, BHL39, 1A2D15, AAS6) dargestellt. Die *Trichoderma reesei* Stämme, die in der Co-Inokulierung I verwendet wurden, sind dieselben, wie im Versuch. Aber E10 wurde anstelle von BH31 als Weißfäulepilz verwendet.

Abbildung 16 zeigt, dass die Kombination E10-QM6a die effizienteste Kombination aller Kombinationen ist. Die Menge an freigesetzter Glucose von dieser Kombination ist nach dreistündiger enzymatischer Hydrolyse pro 1g Biomasse 61 mg, nach sechs Stunden 157 mg, nach 24 Stunden 145 mg und nach 96 Stunden 105 mg pro 1g Biomasse. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Ausbeute an Glucose nach sechsstündiger

---

enzymatischer Hydrolyse und nach 24- und 96-stündiger enzymatische Hydrolyse (6h - 24h = p-Wert 0.98212, 96h - 6h p-Wert= 0.18546). Es gibt aber einen signifikanten Unterschied zwischen dem Glucoseertrag nach drei- und sechsständiger enzymatischer Hydrolyse (6h - 3h= p-Wert <0.00778 \*\*). Statistisch besteht zwischen der Kombination E10+QM6A und den Kombinationen E10+1A2D15, E10+AAS6, E1031+BL39, E10+RUT30 ein signifikanter Unterschied (QM6a - 1A2D15 =p-Wert < 0.001 \*\*\*, QM6a - AAS6=p < 0.001 \*\*\*, QM6a - BL39 =p-Wert < 0.001 \*\*\*, RUTC30 - QM6a =p-Wert < 0.001 \*\*\*)).

Nach sechs und 24 Stunden zeigt die unbehandelte Probe die höchsten Werte. Diese Werte sind mit der Reinform 104 mg/g und 104 mg/g zu nennen. Vor der enzymatischen Hydrolyse bzw. bei dem Zeitpunkt Null (0h) ist die Kombination E10-QM6a mit ihrem Wert von 0.8 mg freigesetzte Glucose pro 1g Maisstroh wieder die effizienteste Kombination unter anderen Kombinationen. Außer der Kombination E10-QM6a sind alle Werte für alle Kombination für alle Zeitintervalle unter 100 mg. Nach 24 Stunden erreicht die Kombination E10-AAS6 ihren maximalen Wert von 100 mg freigesetzter Glucose pro 1g Biomasse. Die Kombination E10-BL39 ist die ineffizienteste. Die Werte von dieser Kombination sind unter 30 mg pro 1g Biomasse für alle Zeitintervalle.

T. reesei Stämme, die in der Co-Inokulierung I verwendet wurden, sind dieselben. Daher können die Isolate BH31 und E10 verglichen werden. Den Ergebnissen zufolge scheint BH31 wirksamer zu sein.

Die Ausbeute an Xylose nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem und vorbehandeltem Maisstroh ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Kombination E10-QM6a hat unter allen Kombinationen die höchsten Werte nach drei, sechs, 24 und 96 Stunden enzymatischer Hydrolyse. Nach 94 Stunden hat diese Kombination den höchsten Wert mit 17 mg/g und nach 24 Stunden 15 mg/g. Die zweit effizienteste Kombination ist E10-AAS6. Diese Kombination erreicht nach 96 Stunden 12 mg freigesetzte Xylose pro 1g Maisstroh. Jedoch ist diese Kombination mit ihrem Wert von 12 mg/g effektiver nach 24 Stunden. Vor der enzymatischen Hydrolyse bzw. bei dem Zeitpunkt Null (0h) ist die Kombination von E10-RUTC30 mit ihrem Wert von 0.7 mg freigesetzter Glucose pro 1g Biomasse am effektivsten unter allen Kombinationen. Darauf folgt E10-AAS6 mit einem Wert von 0,6mg.

Die Ergebnisse der unbehandelten Proben sind höher als die behandelten Proben mit Ausnahme der Kombinationen E10-QM6a und E10-AAS6 nach 24 bis 96 Stunden. Man kann deutlich sagen, dass die Pilze auch die freigesetzte Xylose als Quelle für Energie verwenden.

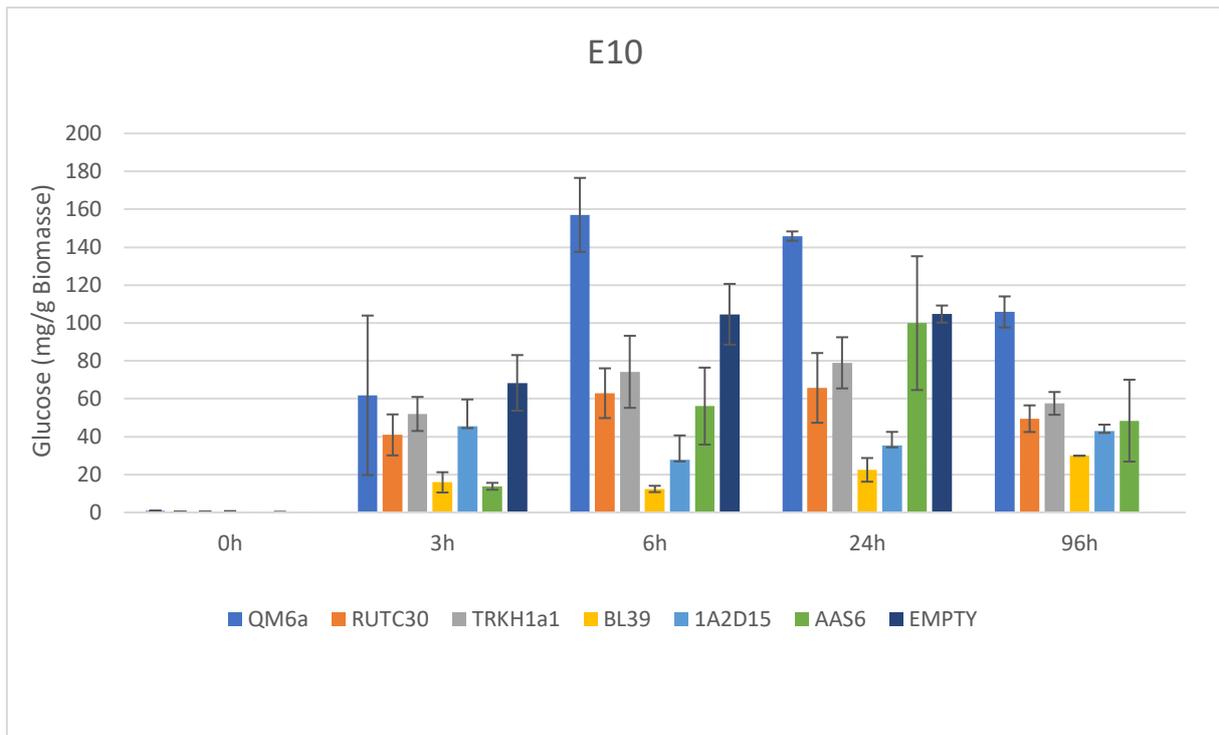


Abbildung 16: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

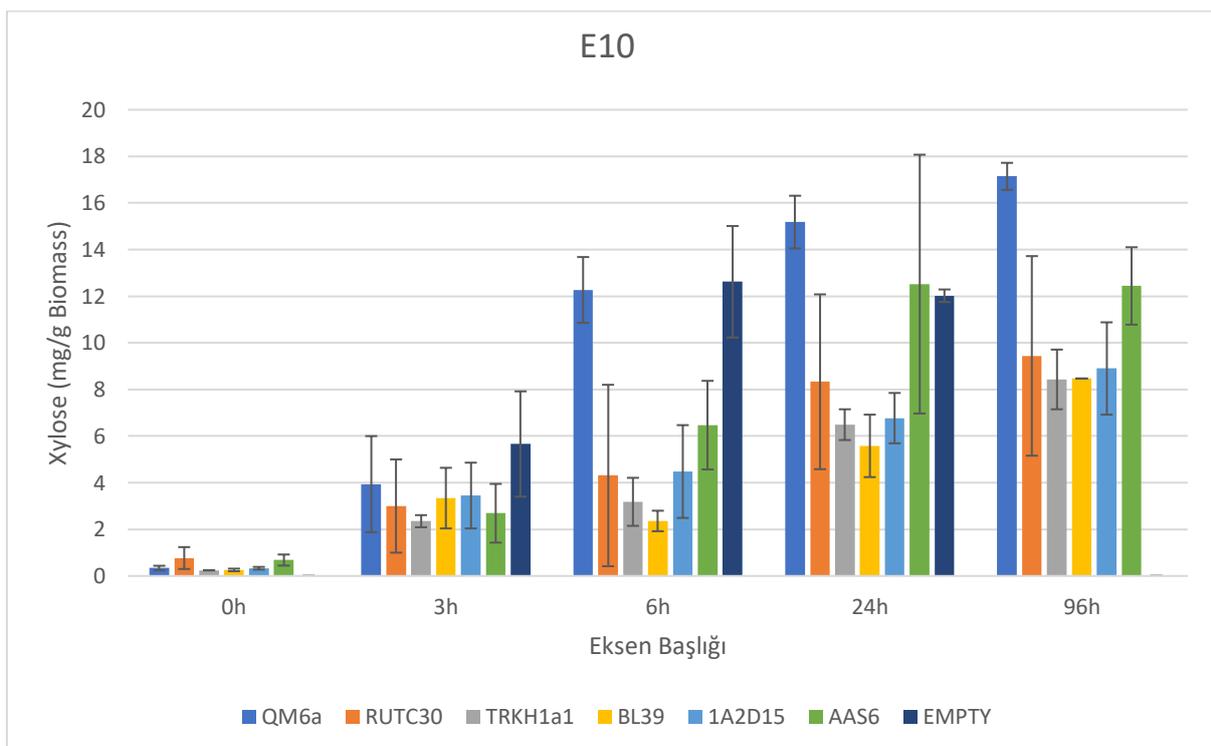


Abbildung 17: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

## 4.5.2 Co-Kultivierung II

In diesem Abschnitt werden die Ausbeute an Glucose und Xylose nach der Vorbehandlung durch die Kombination von Weißfäulepilze (BH31 und E10) und Trichoderma reesei Stämmen (TRKH1h1, EL24, 1E7B23, AAS26, zusätzlich Kontrolle der Stämme QM6a und RUT30) betrachtet. Hier wurde auch unbehandeltes Maisstroh als Kontrollprobe verwendet. Nach Ablauf der Vorbehandlung wurde die enzymatische Hydrolyse für drei, sechs, 24 und 96 Stunden ausgeführt, um die freigesetzten Glucosen und Xylose analysieren zu können. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 18, 19, 20 und 21 dargestellt.

In Abbildung 18 wird die freigesetzte Glucose nach drei, sechs, 24, 96 Stunden enzymatischer Hydrolyse betrachtet. Das unbehandelte Maisstroh wurde für drei, sechs und 24 Stunden hydrolysiert. Nach 24 Stunden ist BH3-EL24 mit ihrem Wert von 178 mg freigesetzte Glucose pro 1g Biomasse die beste Kombination unter allen Kombinationen. Nach drei, sechs und 96 Stunden sind die Mengen an freigesetzter Glucose nach der Reihenfolge 104, 120, 133 mg pro 1g Biomasse. Diese Kombination ist die effizienteste unter anderen für alle Zeitintervalle außer der dreistündigen Hydrolyse. Dann kommt die Kombination von BH31-TRKH1h1 mit ihrem Wert 143 g freigesetzter Glucose pro 1g Biomasse für die 24-stündige Hydrolyse. Die Kombinationen, die mit den Kontrollstämmen (QM6a und RUT30) kombiniert wurden sind die effizientesten Kombinationen nach einer dreistündigen Hydrolyse.

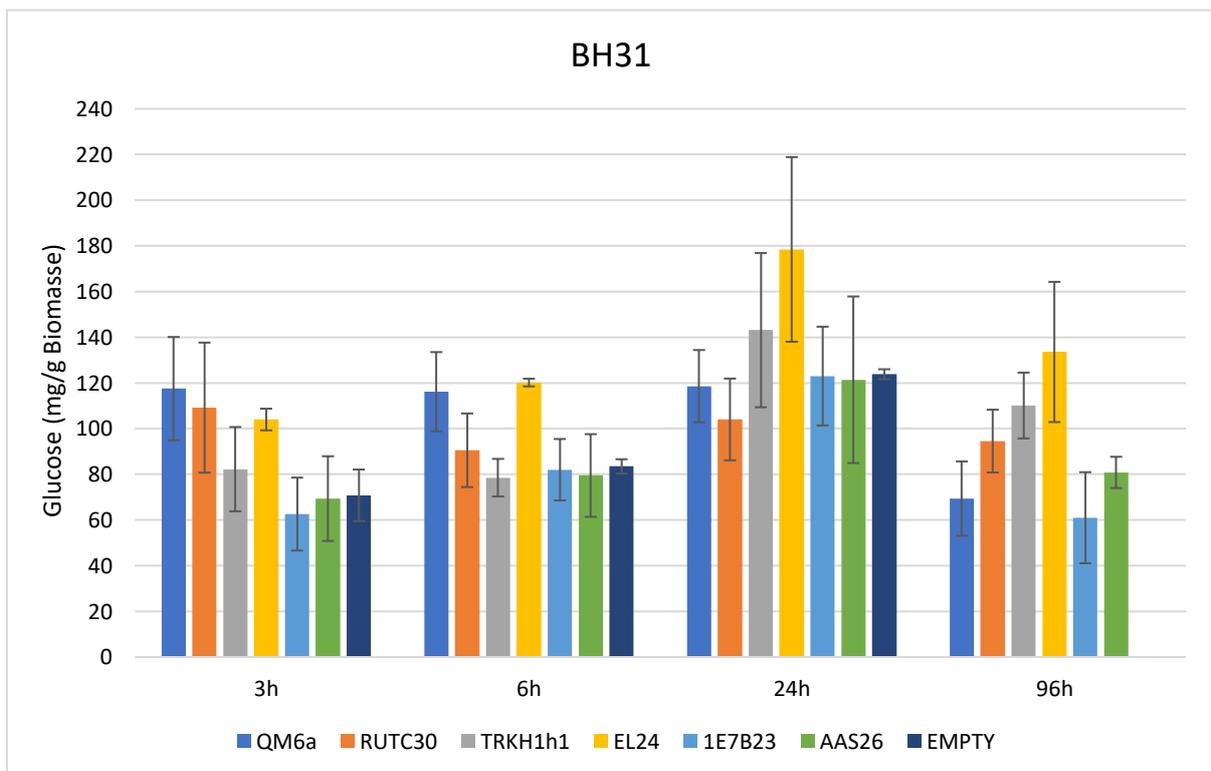


Abbildung 18: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von T. reesei Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

---

Nach drei Stunden sind die Werte der Kombinationen BH31-QM6a 117 mg/g und BH31-RUTC30 109 mg/g. Die unbehandelte Probe wurde als Kontrollprobe verwendet und in der Abbildung als EMTY dargestellt. Hier wurde eine enzymatische Hydrolyse ohne Pilze durchgeführt. Somit kann die Auswirkung der Pilze auf die Vorbehandlung als auch ihre Fähigkeit der Verwendung von Zucker klar verstanden werden. Mit zunehmender Zeit steigt die freigesetzte Glucose, nach 24 Stunden nimmt sie aber ab. Das heißt, dass die Pilze den Zucker als Energiequelle verwenden. Da die Menge an freigesetzter Glucose von EMPTTY für eine 24-stündige Hydrolyse größer ist als die Menge an freigesetzter Glucose von allen vorbehandelten Proben nach einer 96-stündigen Hydrolyse mit der Ausnahme BH31-EL24. Somit ist es ersichtlich, dass die optimale Zeit für die enzymatische Hydrolyse für diese Kombinationen 24 Stunden ist (Abbildung 18). Obwohl BH31-EL24 die effektivste Kombination unter allen ist, besteht statistisch gesehen kein signifikanter Unterschied zwischen dieser Kombination und den anderen Kombinationen (EL24 - 1E7B23 = p-Wert 0.43, EL24 - AAS26 = p-Wert 0.400, QM6a - EL24 = p-Wert 0.350, EMPTTY2 - EL24 = p-Wert 0.447, RUTC30 - EL24 p-Wert 0.157). Für diese Kombination gibt es auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitabständen (3h - 24h = p- Wert 0.0744, 6h - 24h = p- Wert 0.1805, 96h - 24h = p- Wert 0.3561, 6h - 3h = p- Wert 0.9180, 96h - 3h = p- Wert 0.6665, 96h - 6h = p Wert 0.9507).

In Bezug auf freigesetzte Xylose ist die Kombination von BH31-QM6a effektiver als die anderen nach 96 Stunden. Die Ausbeute an Xylose durch diese Kombination ist 25 mg/g Biomasse für eine 96-stündige Hydrolyse, dann folgt EL24-BH34 mit ihrem Wert 24 mg/g. Nach drei, sechs und 24 Stunden ist die BH31-TRKH1h1 am effektivsten (Abbildung 19).

Die Kombinationen BH31-1E7B23 und BH31-AAS26 weisen schwache Leistung sowohl bezüglich der Ausbeute an Glucose als auch der Ausbeute von Xylose auf (Abbildung 18 und 19). Nach drei, sechs, 24 und 96 Stunden sind die Werte von BH31-1E7B23 mit der Reihenfolge 6 mg/g, 10 mg/g, 15 mg/g und 19 mg/g pro 1g Biomasse zu nennen. Auf ähnliche Weise sind die Werte von BH31-AAS26 nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger Hydrolyse 7 mg/g, 10 mg/g, 9 mg/g und 18 mg/g pro 1g Biomasse. Mit zunehmender Zeit für die Hydrolyse steigt die Ausbeute an Xylose. Optimales Zeitintervall für enzymatische Hydrolyse sind 96 Stunden bezüglich der Ausbeute an Xylose. Nach 96 Stunden erreichen alle Kombinationen ihre höchsten Werte (Abbildung 19).

Die enzymatische Hydrolyse, die mit der unbehandelten Probe durchgeführt wurde, erreicht ihren höchsten Wert nach 24 Stunden. Jedoch ist dieser Wert nicht größer als die anderen (Abbildung 19). Somit kann man sagen, dass die Mikroorganismen eher Glucose als Energiequelle im Vergleich zu Xylose verwenden (Abbildung 18 und 19).

Die *Trichoderma reesei* Stämme, die in der Co-Inokulierung II verwendet wurden, sind dieselben wie im Versuch, jedoch wurde das Isolat E10 anstelle des Isolats BH31 verwendet. Damit kann verglichen werden, welche Basidiomyceten mit welchen Stämmen optimal funktionieren.

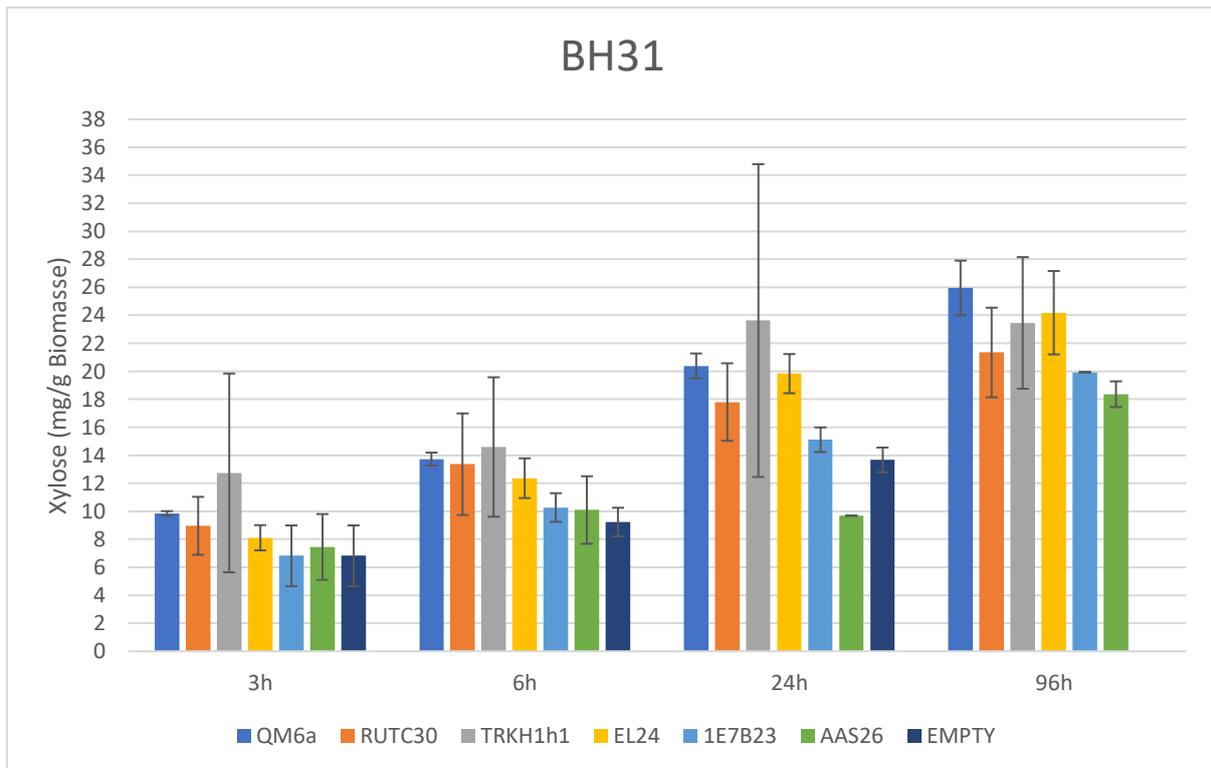


Abbildung 19: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh

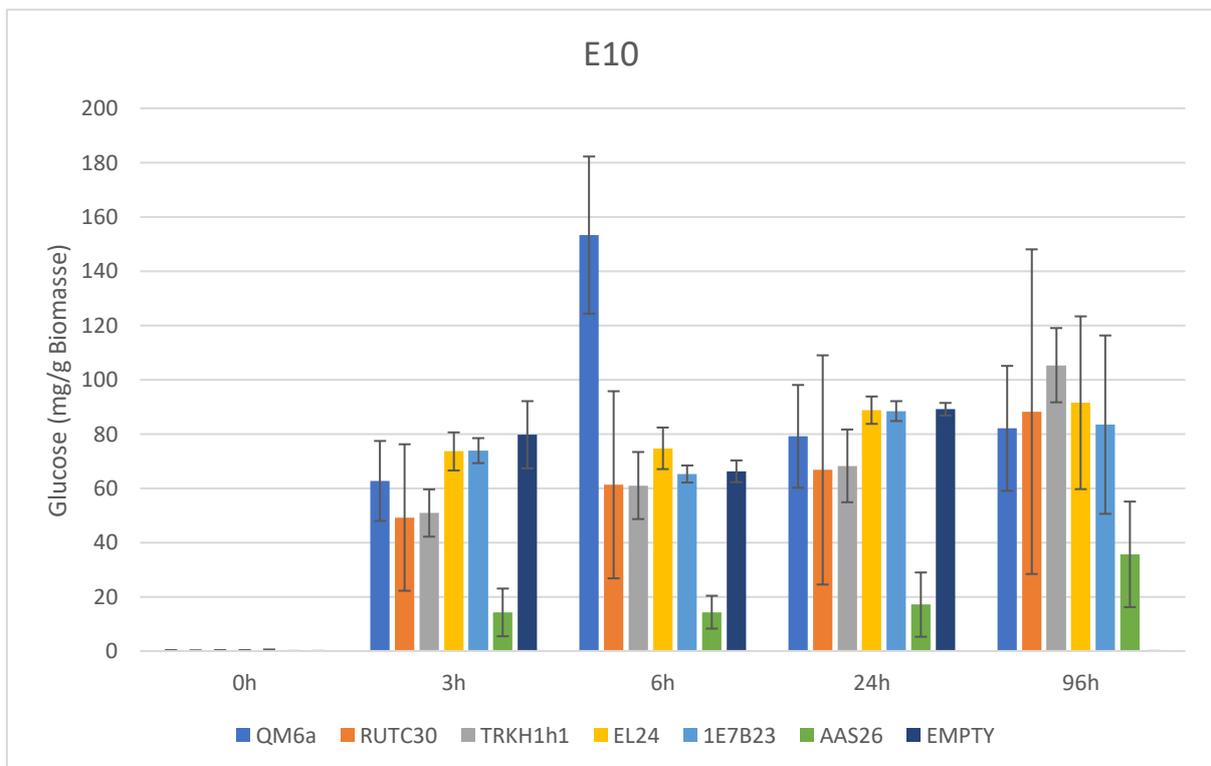


Abbildung 20: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

---

Bei dem Ausgangspunkt (Zeitpunkt Null) wurden die Proben noch nicht hydrolysiert. Daher ist die vorhandene freigesetzte Glucose zu diesem Zeitpunkt nichts oder fast null. Aus diesem Grund konnte die freigesetzte Glucose nach der Kombination von BH31-Trichoderma nicht bestimmt werden. Bei dem Zeitpunkt Null hat die Kombination E10-1E7B23 den höchsten Wert von 0.3 mg freigesetzter Glucose pro 1g Maisstroh unter allen Kombinationen. Mit dem Wert von 0.2 mg/g folgt die Kombination E10-QM6a. Mit dem Wert von 0.2 mg/g folgt E10-EL24. Dann folgen E10-TRKH1h1 und E10-RUTC10. Die Werte von diesen Kombinationen sind in der Reihenfolge 0.1 mg/g und 0.1 mg/g. Bei diesem Zeitpunkt wurde die Ausbeute an Glucose durch die Kombination E10-AAS26 nicht bestimmt (Abbildung 20). Nach drei Stunden hat die Kombination E10-1E7B23 mit 73 mg/g wieder den höchsten Wert. Nach sechs Stunden hat die Kombination E10-QM6a mit 153 mg/g den höchsten Wert in der Co-Kultivierung II unter allen anderen Kombinationen und allen Zeitintervallen. Die Ausbeute an Glucose durch diese Kombination weist nach drei, 24 und 96 Stunden Werte mit der Reihenfolge 62 mg/g, 79 mg/g und 82 mg/g auf. Da gibt es große Unterschiede zwischen Zeitpunkt Zwei (sechsstündige enzymatische Hydrolyse) und den anderen Zeitpunkten (drei-, 24- und 96-stündige enzymatische Hydrolyse). Es gibt signifikante Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt Sechs und anderen Zeitpunkten (6h - 3h = p-Wert 0.00692 \*\*, 6h - 24h = p-Wert 0.02417 \*, 96h - 6h = p-Wert 0.03049 \*). Aus diesem Grund und wegen der großen Standardabweichungen (3=14.75, 6=28.98, 24=18.95, 96=23.02) sollte man den Versuch wiederholen. Durch die lange Dauer des Versuchs dieser Kombination für die sechsstündige enzymatische Hydrolyse konnte der Versuch nicht wiederholt werden. Nach der sechsstündigen enzymatischen Hydrolyse gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der Ausbeute an Glucose der Kombination E10-QM6a und den Kombinationen E10+AAS26, E10+EL24, E10+RUTC30, E10+TRKH1h1 (QM6a - 1E7B23 = p-Wert 0.00348 \*\*, QM6a - AAS26 = p-Wert < 0.001 \*\*\*, QM6a - EL24 = p-Wert 0.00937 \*\*, QM6a - RUTC30 = p-Wert 0.00241 \*\*, QM6a - TRKH1h1 = p-Wert 0.00236 \*\*).

Nach 96-stündiger Hydrolyse erreicht die Kombination E10-TRKH1h1 mit ihrem Wert 105 mg/g den zweithöchsten Wert. Hier weist die Kombination E10-AAS26 die schlechteste Leistung auf. Nach drei, sechs, 24 und 96 Stunden hat diese Kombination mit der Reihenfolge 14 mg/g, 14 mg/g, 17 mg/g und 35 mg/g. Nach 96-stündiger Hydrolyse besteht aber statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Glucoseertrag dieser Kombination und anderen Kombinationen (AAS26 - 1E7B23 = p-Wert 0.813, EL24 - AAS26 = p-Wert 0.705, QM6a - AAS26 = p-Wert 0.830, RUTC30 - AAS26 = p-Wert 0.751, TRKH1h1 - AAS26 = p-Wert 0.505). Allgemein steigt die Menge an freigesetzter Glucose mit zunehmender Zeit mit der Ausnahme von E10-QM6a.

Nach drei, sechs und 24 Stunden sind die Werte der unbehandelten Proben mit der Reihenfolge 79 mg/g, 66 mg/g und 89 mg/g 1g Biomasse zu nennen.

Die Ausbeute von Glucose der Kombinationen in Abbildung 18 und 20 werden verglichen. Hier wurden die gleichen Trichoderma reesei Stämme, aber unterschiedliche Weißfäulepilze verwendet. Die Kombinationen, die mit Isolat BH31 durchgeführt wurden, funktionieren synergistischer als die Kombination, die mit E10 durchgeführt wurde.

---

Die effektivsten Kombinationen sind BH31-EL24 (178 mg/g nach 24 Stunden), BH31-TRKH1h1 (143 mg/g nach 24 Stunden), BH31-1E7B23 (123 mg/g nach 24 Stunden) und E10-QM6a (153 nach sechs Stunden), E10-TRKH1h1 (105 nach 96 Stunden), (Abbildungen 18 und 20).

EL24- 1E7B23 = p-Wert 0.304, QM6a- 1E7B23 = p-Wert 0.748, TRKH1h1- 1E7B23 = p-Wert 1.000, QM6a- EL24 = p-Wert 0.835, TRKH1h1- EL24 = p-Wert 0.217, TRKH1h1- QM6a = p-Wert 0.686

Abbildung 21 stellt die Ausbeute an Xylose sowohl nach der enzymatischen Hydrolyse als auch vor der enzymatischen Hydrolyse dar. Bei dem Zeitpunkt Null setzte die Xylose sich durch alle Kombinationen frei. Da startete die Hydrolyse noch nicht, deswegen ist die Menge an freigesetzter Xylose sehr gering und schwer messbar. An diesem Zeitpunkt sind die Kombinationen E10-TRKH1h1 (0,1mg/g) und E10-1E7B23 (0.1 mg/g) effizienter gegenüber anderen. An letzter Stelle kommt die Kombination E10-AAS26 (0.03 mg/g). Nach drei Stunden ist die Menge an freigesetzter Xylose für alle Kombinationen über die 5mg pro 1g Biomasse mit der Ausnahme von E10-AAS26. An erster Stelle kommt die Kombination von E10-RUTC30 (6 mg/g). Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der drei- und sechsstündigen enzymatischen Hydrolyse (6h - 3h =p-Wert 0.408). Es gibt aber einen hoch signifikanten Unterschied zwischen anderen Zeitabständen (24h - 0h =p-Wert<0.0001, 3h - 0h =p-Wert <0.0001, 6h - 0h =p-Wert <0.0001, 96h - 0h =p-Wert <0.0001, 3h - 24h =p-Wert <0.0001, 6h - 24h =p-Wert <0.0001, 96h - 3h =p-Wert<0.0001, 96h - 6h =p-Wert<0.0001).

Mit zunehmender Zeit steigt die freigesetzte Xylose. Nach 24 Stunden ist die Kombination E10-QM6a am effizientesten mit ihrem Wert von 15 mg/g. Dann kommen die Kombinationen E10-TRKH1h1 (13 mg/g) und E10-EL24 (12 mg/g). Nach 96 Stunden erreichen die Kombinationen ihre höchsten Werte. Bei diesem Zeitpunkt ist die Kombination E10-EL24 (21 mg/g) am effizientesten gegenüber anderen. Dann folgen die Kombinationen E10-TRKH1h1 (20 mg/g) und E10-QM6a (20 mg/g). Die Kombination E10-AAS26 hat eine

schlechte Leistung in allen Zeitintervallen. Wenn die Zeitintervalle verglichen werden, sind 96 Stunden die optimale Zeit für enzymatische Hydrolyse. Die freigesetzte Xylose durch EMPTY liegt nach 24 Stunden bei 16 mg/g. Dieser Wert ist höher als alle anderen Kombinationen, außer die Kombination von E10-QM6a. Auch hier verwenden die Pilze die freigesetzte Xylose als Energiequelle. Einen ähnlichen Trend zeigen auch die vorherigen Inokulierungen

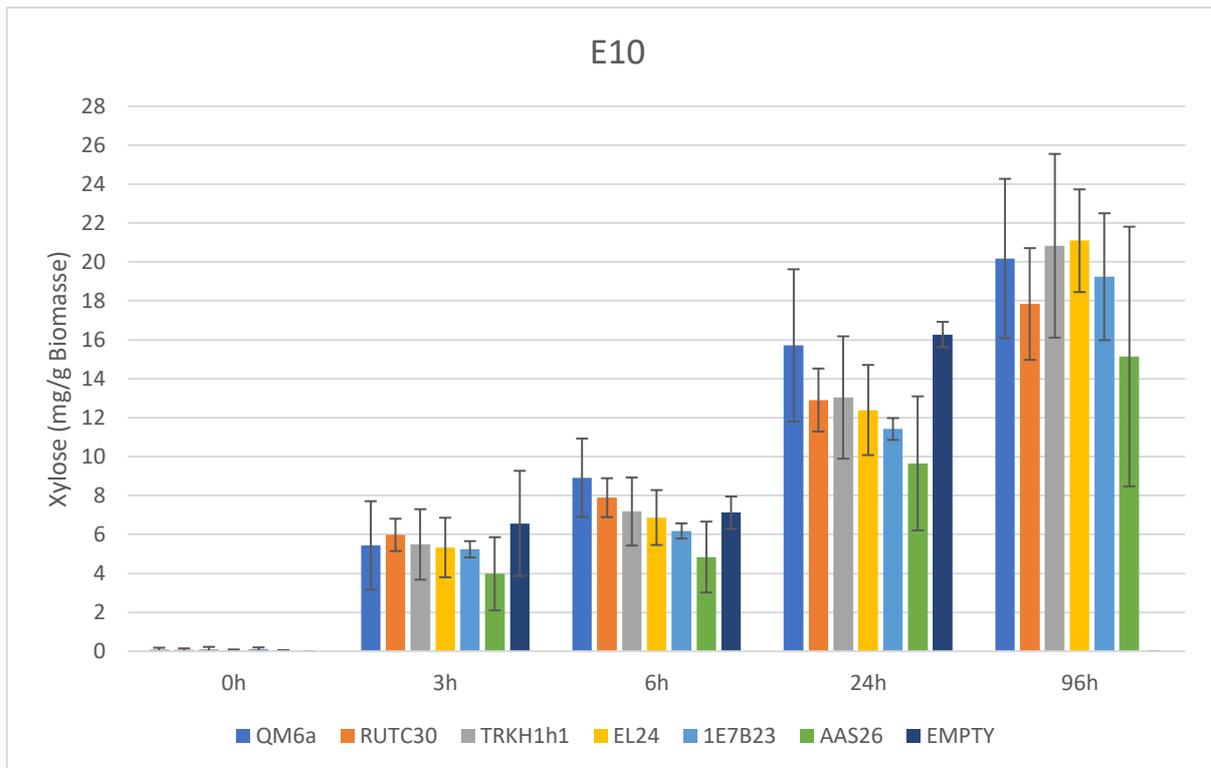


Abbildung 21: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

---

### 4.5.3 Co-kultivierung III

In diesem Abschnitt werden die Ausbeute an Glucose und Xylose nach der Vorbehandlung durch die Kombination von Weißfäulepilze (HLK140716b und MB52) und *Trichoderma reesei* Stämme (TRKH1c1, DL11, 1A2D29, AAS8, zusätzlich der Kontrollstämme QM6a und RUT30) betrachtet. Nach Ablauf der achtwöchigen Inkubationszeit wurde die enzymatische Hydrolyse für drei, sechs, 24 und 96 Stunden durchgeführt, um die freigesetzten Glucosen und Xylose analysieren zu können.

Abbildung 22 stellt die Ausbeute an Glucose nach drei, sechs, 24 und 96 Stunden dar, sowie vor der Hydrolyse beziehungsweise bei dem Ausgangspunkt (T0). Das Isolat HLK14016b (Weißfäulepilz) wurde mit den Stämmen von *Trichoderma reesei* kombiniert und die Co-Kultivierung wurde für acht Wochen durchgeführt. Im Vergleich zu früheren Kombinationen ergeben sich die effektivsten Ergebnisse bei dem Zeitpunkt T0. Der Glucoseertrag durch die Kombination von HLK140716b-RUTC30 (4 mg/g) unterscheidet sich signifikant gegenüber den vorherigen Kombinationen HLK140716b+RUTC30 - BH31+RUTC30 =p-Wert 0.01973, HLK140716b+RUTC30 - E10+RUTC30 =p-Wert 4. 0.00568). Die Kombination HLK140716b-1A2D29 (8 mg/g) ist die effektivste Kombination unter allen Kombinationen beim Zeitpunkt T0. Die Ausbeute an Glucose durch die anderen Kombinationen lief bei dem Zeitpunkt T0 wie folglich ab: HLK140716b-QM6a=0.3 mg/g, HLK140716b-TRKH1c1=0.2 mg/g, HLK140716b-dl11=0.8 mg/g und HLK140716b- AAS8 wurden nicht bestimmt. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen der drei- und sechsstündigen enzymatischen Hydrolyse (6h - 3h =p-Wert 0.711). Im Gegensatz zur dreistündigen Hydrolyse wird ein leichter Anstieg der Menge an freigesetzter Glucose nach der sechsstündigen Hydrolyse beobachtet. Jedoch hat die Ausbeute an Glucose durch die Kombination HLK140716b-QM6a abgenommen. Nach 24 Stunden nehmen die Glucoseausbeuten die höchsten Werte außer HLK140716b-AAS8 an. HLK140716b-QM6a hat den höchsten Wert (95 mg/g) nach 24 Stunden. Die Ausbeute an Glucose für alle Kombinationen sinkt nach 96 Stunden. Allgemein zeigt die Kombination, welche mit HLK140716b erzeugt wird, eine schwache Leistung, verglichen mit den Isolaten BH31 und E10. Es gibt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen HLK140716b und BH31 (HLK140716b - BH31 =p-Wert <0.0001) und einen ebenfalls signifikanten Unterschied zwischen HLK1400716b und E10 (HLK140716b - E10 =p-Wert 0.0476). Wenn die vorbehandelten und nicht vorbehandelten Proben miteinander verglichen werden, sind im Allgemeinen die Werte der nicht vorbehandelten Proben höher als die Werte der vorbehandelten Proben, außer nach 24 Stunden. Das zeigt, dass die Rate der Verwendung von Zucker als Energiequelle der Isolate und Stämmen in diesen Kombinationen höher als in den vorherigen Kombinationen ist. Die Werte von unbehandelten Proben weisen Folgendes auf: Nach dreistündiger Hydrolyse 73 mg, nach sechs Stunden 82 mg und nach 24 Stunden 61 mg pro 1g Biomasse.

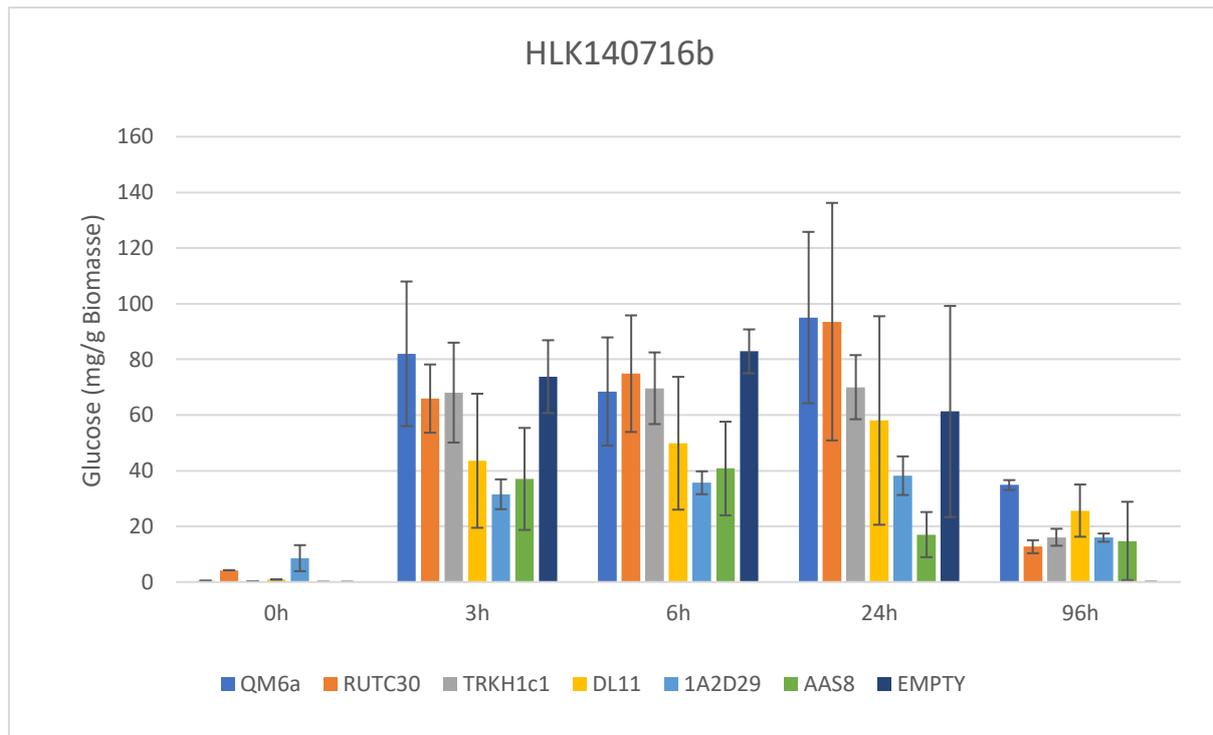


Abbildung 22: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach null-, drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilze) Maisstroh.

Abbildung 23 stellt die Ausbeute an Xylose nach der enzymatischen Hydrolyse dar. Bei dem Zeitpunkt Null setzte sich Xylose durch alle Kombinationen frei. Die Werte der Kombinationen HLK140716b-1A2D29 (14 mg/g) sind bei diesem Zeitpunkt ziemlich hoch. Nach drei Stunden sinkt die Ausbeute an Xylose von diesen Kombinationen auf 10 mg/g. Nach sechs Stunden wurde bei der Kombination HLK140716b-1A2D29 mit ihrem Wert von 18 mg/g wieder der höchste Wert gemessen. Dann folgt die Kombination HLK140716b-RUTC30 mit dem Wert von 15 mg/g. Diese Kombination erreicht ihren höchsten Wert von 19 mg/g nach 24 Stunden. Gleichzeitig ist dieser Wert der höchste Wert unter anderen Kombinationen und Zeitintervallen.

Die Ausbeute an Xylose beginnt nach einer 96-stündigen Hydrolyse abzunehmen. Zu diesem Zeitpunkt befinden die Mengen an freigesetzter Xylose zwischen 7.6 – 3 mg/g. Unbehandelte Proben (EMPTY) wurden für drei Zeitintervalle gemessen. Nach drei Stunden ist der Wert von EMPTY größer als die Werte der Kombinationen von HLK140716b-, RUTC30, TRKH1c1, DL11 und 1A2D29 und kleiner als die Kombinationen von HLK140716b-, QM6a und AAS8. Nach sechs Stunden ist der Wert der unbehandelten Probe kleiner als die Kombinationen HLK140716b-, RUTC30 und 1A2D29. Schließlich ist dieser Wert nach 24 Stunden größer als die Kombinationen von HLK140716b-, AAS8, DL11 und TRKH1c1.

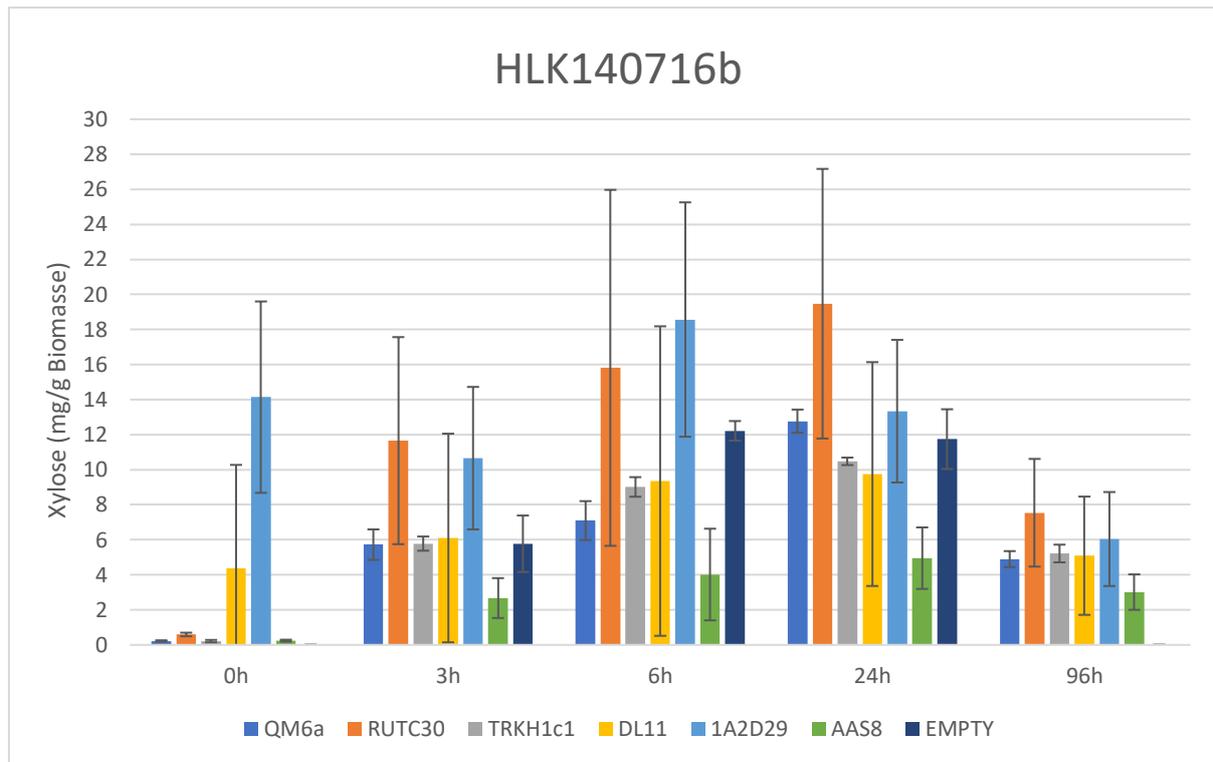


Abbildung 23: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Das Isolat MB52 wurde mit den Stämmen von *Trichoderma reesei* kombiniert und die Co-Kultivierung wurde für acht Wochen durchgeführt. Abbildung 24 und 25 stellen die Ergebnisse nach drei-, sechs-, 24- und 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse dar.

Abbildung 24 zeigt die Menge an freigesetzter Glucose vor und nach enzymatischer Hydrolyse an. Vor der enzymatischen Hydrolyse ist die Ausbeute an Glucose für die Kombinationen von MB52-RUTC30, -TRKH1c1, -DL11 nicht bestimmt. Die Kombination MB52-AAS8 hat eine große Leistung mit ihrem Wert von 10 mg/g bei dem Zeitpunkt Null. MB52-QM6a und -1A2D29 sind zwei Kombinationen, die vor der Hydrolyse die Glucose freisetzen. Jedoch weisen diese zwei Kombinationen eine schwache Leistung im Vergleich zu der Kombination MB52-AAS8 auf.

Es wird beobachtet, dass es Schwankungen bei den Glucosemessungen gibt, die nach verschiedenen Zeitintervallen durchgeführt wurden. Allgemein haben diese Kombinationen eine schwächere Leistung im Vergleich zu den Vorherigen. Die Mengen an freigesetzter Glucose sind unter 100 mg pro 1g Maisstroh. Nach 24-stündiger Hydrolyse hat die Kombination MB52- QM6a den höchsten Wert (98 mg/g), darauf folgt die MB52-DL11 mit ihrem Wert von 97 für eine 96-stündige Hydrolyse. Den dritthöchsten Wert (85 mg/g) erreicht die Kombination MB52-QM6a nach 96 Stunden. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der drei- und sechsstündigen enzymatischen Hydrolyse. Nach drei Stunden ist die Kombination MB52-DL mit ihrem Wert von 81 mg/g am effizientesten gegenüber anderen. Die Kombination MB52-1A2D29 mit ihrem Wert von 81 mg/g ist optimal nach einer

sechsstündigen Hydrolyse. Im Allgemeinen liegen die Werte nach drei und sechs Stunden Hydrolyse nahe beieinander, mit der Ausnahme von MB52-AAS8. Die Leistung dieser Kombination ist im Vergleich zu anderen ineffizient. Die Werte dieser Kombination beträgt für alle Zeitintervalle zwischen 45 mg – 60 mg freigesetzter Glucose pro 1g Maisstroh.

Die Werte von EMPTY betragen 82 mg/g nach drei Stunden, 94 mg/g nach sechs Stunden und 95 mg/g nach 24 Stunden. Die Werte der unbehandelten Proben sind größer als die Werte der vorbehandelten Proben bei einer drei-, sechs- und 24-stündigen enzymatischen Hydrolyse. Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass die Rate der Nutzung von Pilzen mit der Glucose hoch ist.

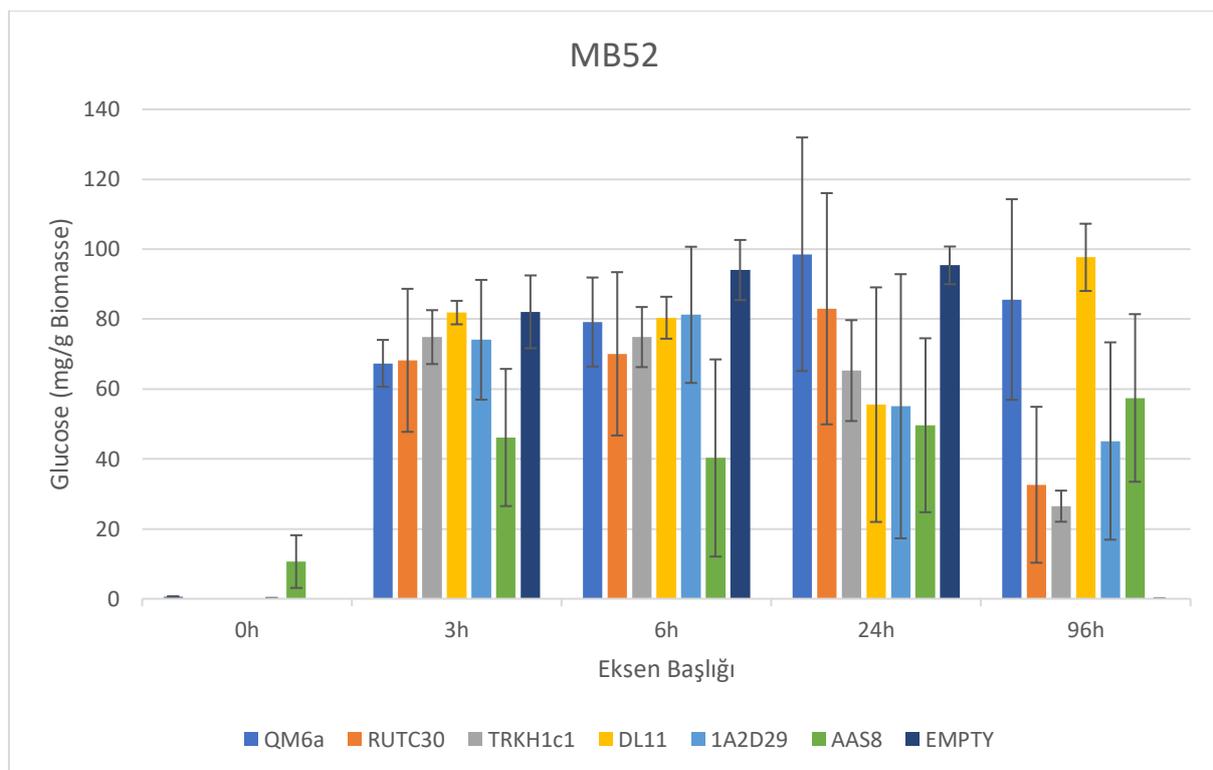


Abbildung 24: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Die Ausbeute an Xylose durch die Co-Kultivierung von MB52-*Trichoderma reesei* Stämmen wird in Abbildung 25 dargestellt. Die Werte der Kombinationen MB52-QM6a (15 mg/g) und -AAS8(11 mg/g) sind bei dem Zeitpunkt Null ziemlich hoch. Die anderen Werte am Nullpunkt liegen zwischen 0.2mg/g und 2. mg/g. Der Wert von MB52-RUTC30 wurde nicht bestimmt. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen der Ausbeute an Xylose nach einer drei- und sechsstündigen enzymatischen Hydrolyse. Mit dem Wert von 11 mg/g ist die Kombination MB52-AAS8 nach drei Stunden effizient im Vergleich zu anderen. Nach sechsstündiger enzymatischer Hydrolyse ist die Kombination MB52-QM6a mit ihrem Wert von 11 mg/g am höchsten. Dann folgt die Kombination MB52-AAS8 mit ihrem Wert 10 mg/g. Nach 24 Stunden weist die Kombination MB52-QM6a den höchsten Wert von 17 mg/g auf und diese Kombination hat ebenfalls den höchsten Wert von 17 mg/g. Bei einer 24- und 96-stündigen

Hydrolyse sind die Werte nahe beieinander. Obwohl die Kombination MB52-AAS8 nach 24 Stunden eine gute Leistung zeigt, nimmt die Ausbeute an Xylose nach einer 96-stündigen Hydrolyse ab. Nicht vorbehandelte Proben haben folgende Werte: Nach drei Stunden 5 mg/g, nach sechs Stunden 8 mg/g und nach 24 Stunden 19 mg/g. Die Ergebnisse von EMPTY zeigen, dass nach 24 Stunden die Verwendung von Xylose als Futtermittel zugenommen hat.

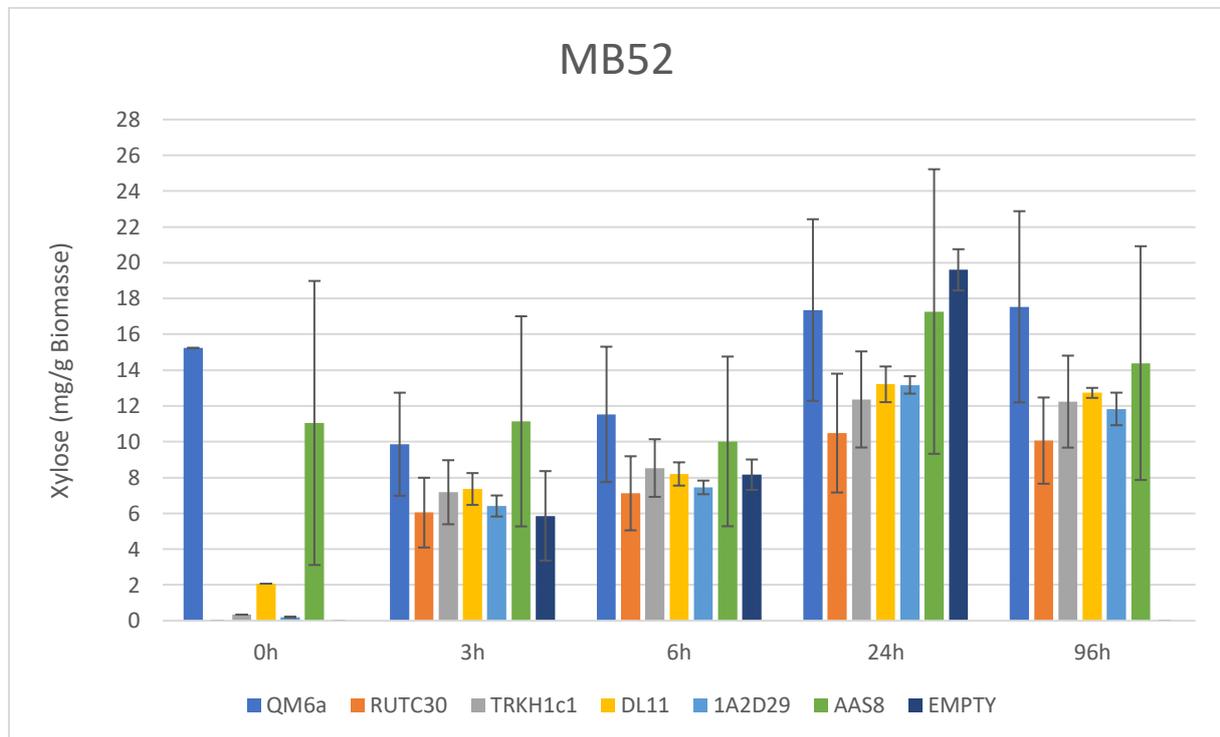


Abbildung 25: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1 g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

---

## 4.6 Analyse der synergistischen Co-Kultivierung für drei Monate

### 4.6.1 Co-Kultivierung IV

Die Basidiomyceten- und Trichoderma Stämme wurden für drei Monate inokuliert, um die Auswirkung einer langen Inokulationszeit auf der Ausbeute an Zucker zu messen. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 26, 27, 28 und 29 dargestellt. Nach dreimonatiger Co-Inokulierung wurden die Proben für drei, sechs, 24 und 96 Stunden hydrolysiert, um freigesetzte Zucker analysieren zu können.

In der Abbildung 26 wird die freigesetzte Glucose durch die Kombination von Isolate-BH31 und Trichoderma reesei-Stämmen (TRKH1c1, DL11, 1A2D29, AAS8) angegeben. Bei dem Zeitpunkt Null wird keine freigesetzte Glucose durch die Kombinationen BH31-RUTC30 und BH31-AAS8 bestimmt. Bei diesem Zeitpunkt ist die Kombination BH31-1A2D29 mit ihrem Wert von 0.3 mg/ g am effizientesten. Dann folgt die Kombination BH31-TRKH1c1 mit ihrem Wert von 0.2 mg pro 1g Biomasse. Nach dreistündiger enzymatischer Hydrolyse folgt die Kombination BH31-QM6a mit ihrem Wert von 176 mg freigesetzter Glucose pro 1g Maisstroh. Danach kommt die Kombination BH31-TRKH1c1 mit ihrem Wert von 117 mg/g. Die Werte von allen anderen Kombinationen bleiben unter 100mg. Die Leistung nach sechsständiger enzymatischer Hydrolyse ist schlechter als nach dreistündiger. Bei diesem Zeitpunkt liegen alle Werte der Kombinationen unter 100 mg. Die Kombination BH31-TRKH1c1 ist mit ihrem Wert von 96 mg pro 1g Biomasse am effizientesten. Dann folgt die Kombination BH31-DL11 mit ihrem Wert von 77 mg/g. Obwohl die Kombination BH31-QM6a nach drei Stunden die effizienteste ist, lag mit 67 mg/g deutlich unter dem Zuckererträgen der anderen Varianten. Im Vergleich sinken nach drei Stunden alle Werte der Kombinationen nach 24-stündiger enzymatischer Hydrolyse mit der Ausnahme von BH31-TRKH1c1. Diese Kombination ist mit ihrem Wert von 183 mg/g am effizientesten unter anderen Kombinationen und Zeitintervallen. Bisher ist dieser Wert der Zweithöchste nach BH31-1A2D15 (für acht Wochen Co-Kultivierung). Mit ihrem Wert von 127 mg/mg folgt BH31-QM6a am zweithöchsten. Die Werte der anderen Kombinationen liegen unter 100 mg/g für eine 24-stündige enzymatische Hydrolyse. Nach 96 Stunden ist die Kombination BH31-TRKH1c1 mit ihrem Wert von 103 mg/g die Effizienteste. Die Werte aller anderen Kombinationen liegen bei 100 mg/g für die 96-stündige enzymatische Hydrolyse. Die Werte von nicht vorbehandelten Proben erreichen nach drei Stunden 84 mg/g, nach sechs Stunden 59 mg/g und nach 24 Stunden 114 mg/g. Jede Kombination hat unterschiedliche optimale Zeitabstände.

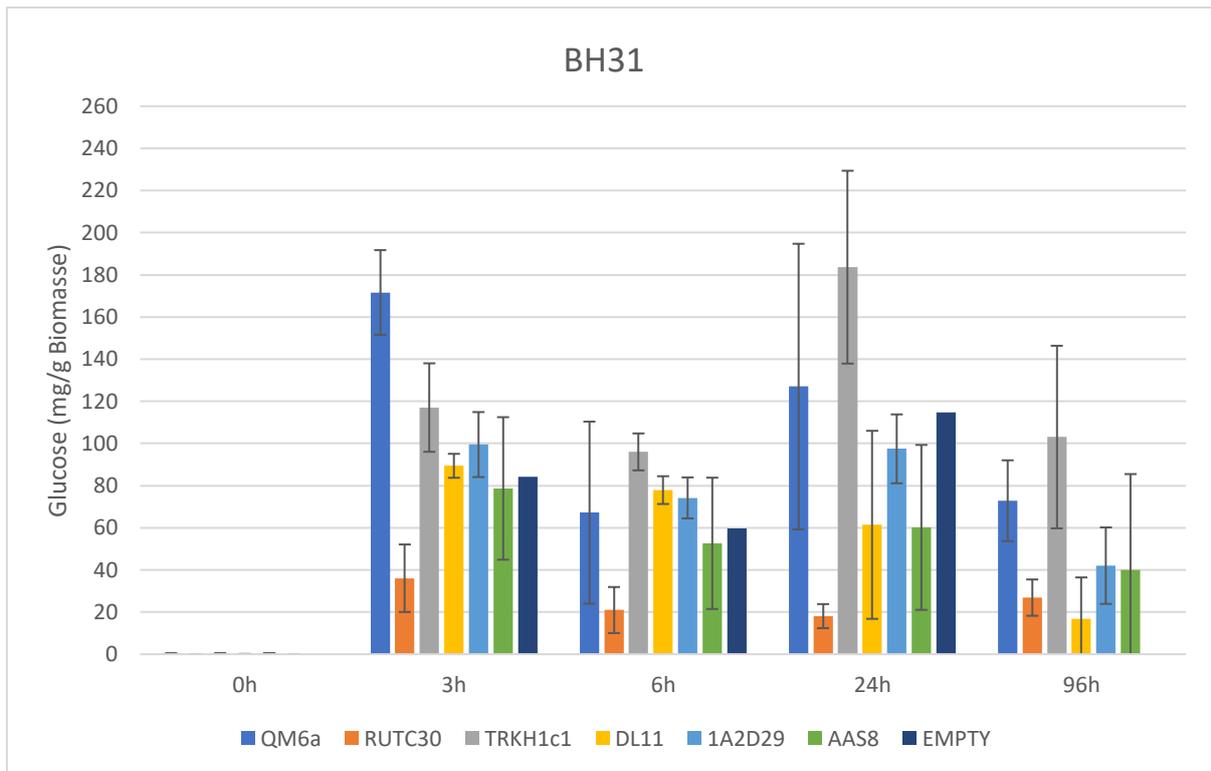


Abbildung 26: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1 g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Um die freigesetzte Xylose zu messen, wurden die Proben nach der dreimonatigen Co-Inokulierung für drei, sechs, 24 und 96 Stunden hydrolysiert. In der Abbildung 27 ist die Ausbeute an Xylose für verschiedene Kombinationen angegeben. Die Ausbeute an Xylose durch die Kombinationen BH31-QM6a und -TRKH1c1 ist zum Zeitpunkt Null unbestimmt. BH31-RUTC30 ist die effizienteste Kombination zum Zeitpunkt Null. Die Kombination BH31- QM6a erreichte nach 96 Stunden diese Kombination ihren höchsten Wert von 17 mg/g, der zweithöchste Wert wurden mit 15 mg/g nach 24 Stunden gemessen. Nach 96 stündige enzymatische Hydrolyse hat die Kombination BH31-1A2D29 den dritthöchsten Wert von 14 mg/g. Dann folgt die Kombination BH31-TRKH1c1 mit ihrem Wert 14 mg/g nach 96 Stunden. Mit zunehmendem Zeitintervall steigt die Ausbeute an Xylose. Die 96-stündige enzymatische Hydrolyse weist ein optimales Zeitintervall für die dreimonatige Co-Kultivierung bezüglich der Ausbeute an Xylose auf.

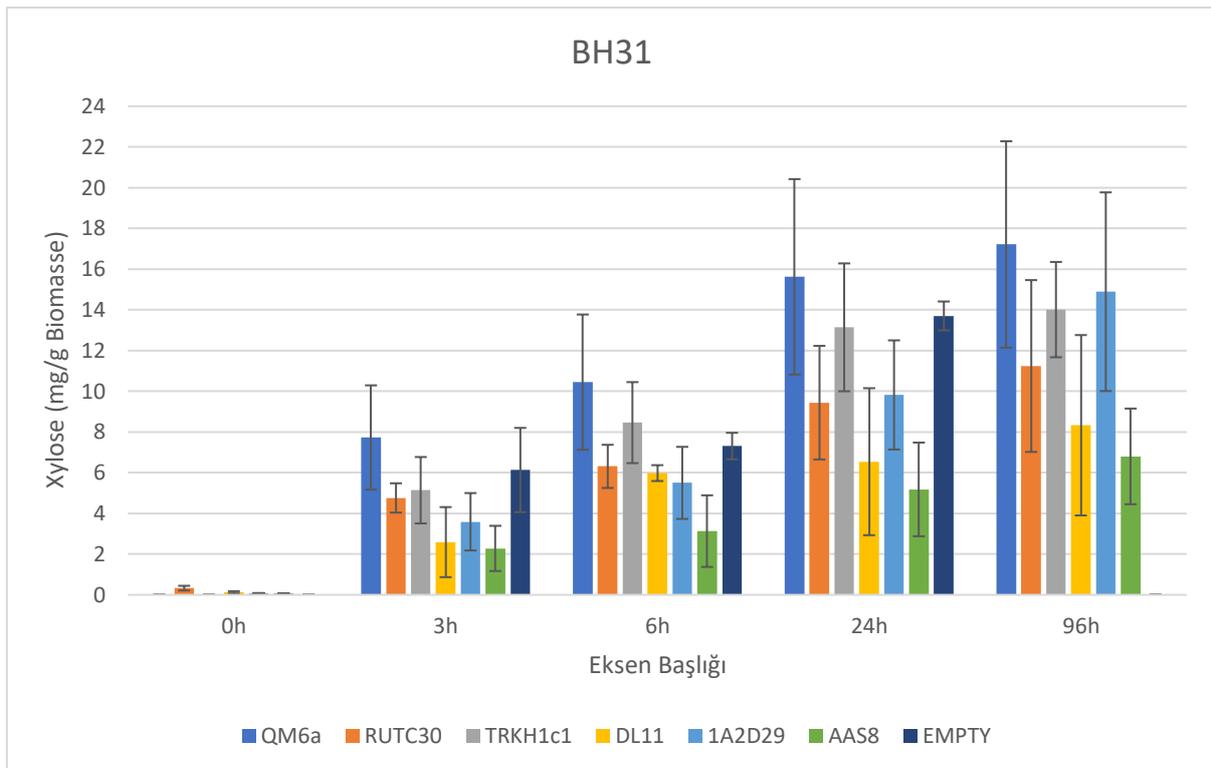


Abbildung 27: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Die Menge an freigesetzter Glucose durch die Kombination von E10 und *Trichoderma* wird in Abbildung 28 dargestellt. Vor der enzymatischen Hydrolyse wurde die Ausbeute an Glucose nicht bestimmt. Die freigesetzte Glucose, die durch die enzymatische Hydrolyse von unbehandeltem Maisstroh erhalten wurde, ist größer als die vorbehandelte. Im Allgemeinen haben diese Kombinationen eine hohe Fähigkeit, Zucker als Energiequelle zu verwenden. Die Ausbeute an Glucose, die von unbehandelten Proben erhalten wurde, steigt mit zunehmendem Zeitintervall. Nach einer 24-stündigen enzymatischen Hydrolyse ist die unbehandelte Probe mit ihrem Wert von 159 mg/g am höchsten. Dann folgt die Kombination E10-QM6a mit dem Wert von 148 mg/g nach 96 Stunden.

Für die dreimonatige Inkubationszeit wurden dieselben Stämme von *Trichoderma* mit den Isolaten E10 und BH31 getrennt kombiniert. BH31-TRKH1c1 (183 mg/g nach 24 Stunden) und E10-QM6a (148 mg/g) sind zwei effiziente Kombinationen. In Allgemein ist BH31 effektiver als E10 für eine dreimonatige Inkubationszeit.

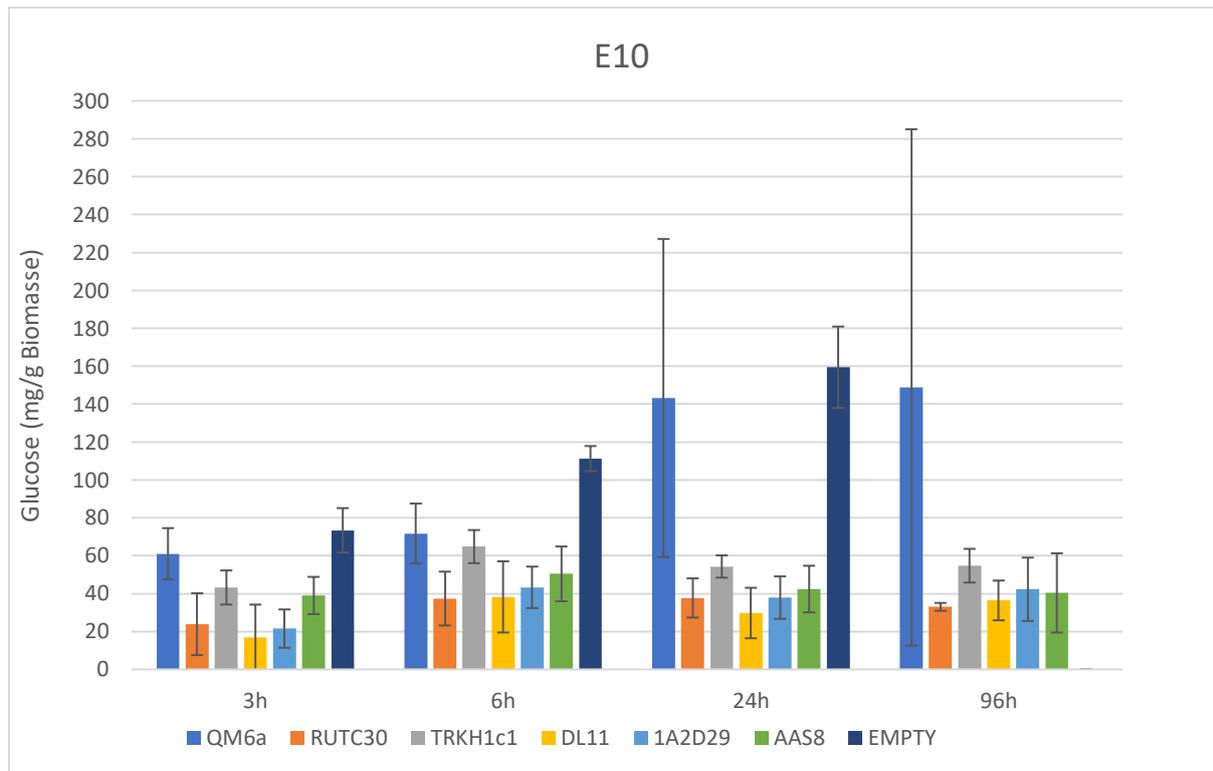


Abbildung 28: Die Ausbeute an Glucose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

Die Ausbeute an Xylose der dreimonatigen Co-Kultivierung des Isolats E10 und Trichoderma ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Kombination E10-RUTC30 mit ihrem Wert von 0.4 mg/g ist die effizienteste Kombination unter den nicht hydrolysierten Proben. Dann folgen die Kombination E10-DL11 mit ihrem Wert von 0.3 mg pro 1g Maisstroh und mit dem Wert von 0.3 mg/g E10-TRKH1c1. Mit zunehmender Zeit steigt die Ausbeute an Xylose. 96 Stunden sind ein optimales Zeitintervall für die enzymatische Hydrolyse. Nach 96 Stunden ist die Kombination E10-QM6a mit dem Wert von 15 mg/g am effizientesten. Obwohl diese Kombination die Effizienteste unter anderen behandelten Proben ist, macht eine hohe Standardabweichung diese Proben nicht zuverlässig. Bei der Kombination E10-1A2D29 wurde ein Wert von 12 mg/g nach einer 96-stündigen enzymatischen Hydrolyse gemessen. Eine unbehandelte Probe wurde für drei, sechs und 24 Stunden hydrolysiert. Die Werte der unbehandelten Probe sind höher als die behandelten Proben für alle drei Zeitintervalle. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Pilze hier auch die Xylose als Energiequelle verwenden. Wenn die zwei Isolate, die mit denselben Stämmen kombiniert wurden, verglichen werden, ist das Isolat BH31 effizienter als das Isolat E10 für eine dreimonatige Co-Kultivierung (Abbildung 27 und 29). Wenn die beiden Inkubationszeiten verglichen werden, ist die Inkubationszeit für acht Wochen optimal.

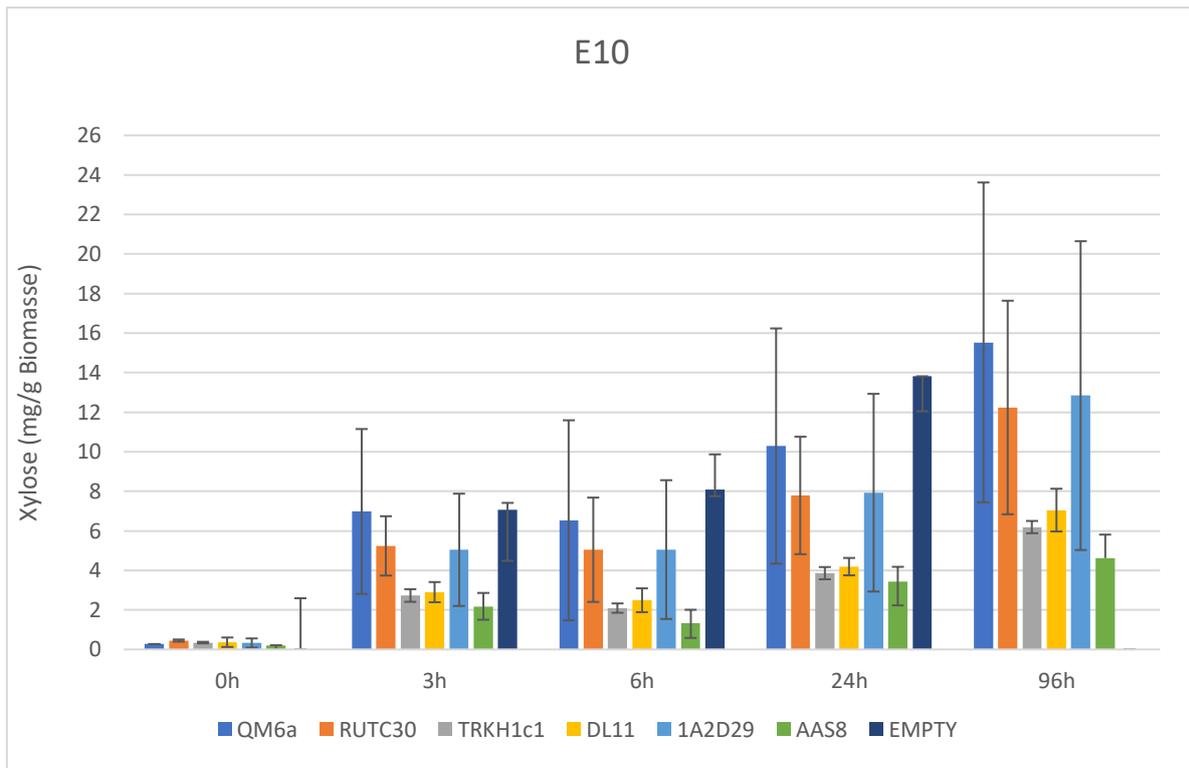


Abbildung 29: Die Ausbeute an Xylose (mg pro 1g Maisstroh) nach drei-, sechs-, 24- und 96- stündiger enzymatischer Hydrolyse von unbehandeltem (EMPTY) und vorbehandeltem (durch die Kombinationen von *T. reesei* Stämmen und Weißfäulepilzen) Maisstroh.

---

## 5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die besten Kombinationen mit der Literatur verglichen. Bezüglich der Ausbeute an Glucose sind die besten Kombinationen BH31-1A2D15 (187 mg/g, achtwöchige Inkubation + sechsstündige Hydrolyse), BH31-TRKH1c1 (183 mg/g, dreimonatige Inkubation + sechsstündige Hydrolyse), BH31-EL24 (178 mg/g, achtwöchige Inkubation + 24-stündige Hydrolyse), BH31-QM6a (171 mg/g, dreimonatige Inkubation + dreistündige Hydrolyse). Alle anderen Kombinationen sind unter 170 mg/g. Somit wurden sie nicht mit der Literatur verglichen. Die Ausbeute an Glucose der Kombination BH31-1A2D15 ist geringfügig höher als der Glucoseertrag der Kombinationen BH31-TRK1c1, BH31-EL24 und BH31-QM6a. Jedoch ist die Inkubationszeit der Kombination BH31-1A2D15 (acht Wochen) erheblich kürzer als die Inkubationszeit der Kombinationen BH31-TRK1c (drei Monate) und BH31-QM6a (drei Monate). Obwohl die Inkubationszeiten von BH31-1A2D15 und BH31-EL24 gleich sind, hat die Kombination BH31-1A2D15 nach der sechsstündigen Hydrolyse ihren maximalen Wert von 187 mg/g erreicht. Jedoch hatte die Kombination BH31-EL24 nach der 24-stündigen Hydrolyse ihren maximalen Wert von 178 mg/g erreicht. In Untersuchung von (Wan und Li 2010) wurde festgelegt, dass die Glucoseausbeute mit einer Kultivierungszeit über sieben Tage hinaus angestiegen wurden und es 66 % bei einer Kultivierungszeit von 35 Tagen erreicht ist. Es wurde jedoch bei Verlängerung der Kultivierungszeit auf 42 Tage kein weiterer Anstieg beobachtet. Dies ist ein guter Vergleich mit den Vorbehandlungen durch Co-Kultivierung, was darauf hinweist, dass eine längere Inkubationszeit nicht notwendigerweise eine Erhöhung der Ausbeute an Glucose während der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Proben beinhaltet.

Die Ausbeute an Glucose von der Kombination BH31-1A2D15 (Cellulosegehalt ca. 30%, Cellulose zu Glucose ca. 62.51%) war ähnlich oder höher als die Ausbeuten der meisten früheren biologischen Vorbehandlungen. Zum Beispiel wurde der Weißfäulepilz *Ganoderma lobatum* für zehn Tage in das Weizenstroh geimpft und dann wurde der Braunfäulepilz *Gloeophyllum trabeum* in die Kolben gegeben und die Vorbehandlung wurde weitere zehn Tage inkubiert. Nach einer 72-stündiger enzymatischer Hydrolyse ist die freigesetzte Glucose bei einem Wert von 191.9 mg pro 1g Weizenstroh (Cellulosegehalt 42.88%, Cellulose zu Glucose ca. 39.7% ) (Hermosilla et al. 2018). Auf der anderen Seite erreichte die Verzuckerungsrate 37% mit einem Weißfäulepilz *Coriolus versicolor* (Zhang et al. 2007). Die Ausbeute an Hydrolyse von BH31-1A2D15 war jedoch niedriger als die Ausbeuten der meisten früheren Studien (Wan und Li 2010; Xu et al.2010; Ding et al. 2019). Zum Beispiel, die 35-tägige Vorbehandlung mit dem Weißfäulepilz *Ceriporiopsis subvermispora* erreichte eine Glucoseausbeute von 66.9% (Wan und Li 2010), und die Ausbeute an Glucose erreichte 66.4% mit einem Maisstroh, der 25 Tage lange mit Weißfäulepilz *Irpex lacteus* vorbehandelt wurde. Für eine andere Studie wurde *Pleurotus sajor-caju* verwendet. Das Maisstroh wurde für 25 Tage mit *P. sajo-caju* vorbehandelt, und die Ausbeute an Hydrolyse erreicht ihren maximalen Wert von 71.2% (Ding et al. 2019). Obwohl diese Ergebnisse höher als die vorliegenden Ergebnisse sind, ähneln sie einander. Eine kombinierte Vorbehandlung, einschließlich der Vorbehandlung mit dem *Trichoderma* Stamm 1A2D15 und anderen Weißfäulepilze (*P. sajo-caju*, *Irpex lacteus*), sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, um die Hydrolyseausbeute zu erhöhen.

---

Obwohl die Vorbehandlung mit der Kombination BH31-1A2D15 eine Ausbeute an Glucose von 62,5% erreichte, ist sie immer noch nicht vergleichbar und wirksamer als die meisten physiochemischen Vorbehandlungen. Zum Beispiel, nach einer 48-stündigen Hydrolyse erreichte die Ausbeute an Hydrolyse einer mit NaOH-vorbehandelten Probe 81.2 % (Chen et al. 2009). Andere Studien berichten, dass eine geringere Enzymbeladung und eine kürzere Hydrolysezeit erforderlich waren, um eine Ausbeute von 90% bei einem mit ionischer Flüssigkeit vorbehandelten Maisstroh zu erreichen (Li et al. 2011). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Kombination von biologischen und physikochemischen Vorbehandlungen wirksamer ist als allein durchgeführte Vorbehandlungsmethoden (Martínez-Patiño et al. 2018; Zhang et al. 2016).

BH31-QM6a ist die effektivste Kombination mit ihrem Wert von 25 mg/g freigesetzter Xylose für eine achtwöchige Inkubationszeit. Diese Kombination erreichte 17 mg/g freigesetzte Xylose nach 12-wöchiger Inkubationszeit. Die nach der BH31-QM6a-Vorbehandlung erhaltene Umwandlungsausbeute war weniger als die in anderen Studien zur chemischen Vorbehandlung von Maisstroh mit ähnlicher oder längerer Pilzexpositionszeit angegebenen Ausbeuten. Zum Beispiel, Maisstroh wurde mit der verdünnten Schwefelsäure vorbehandelt und die Ergebnisse zeigen die Fähigkeit, eine hohe Ausbeute an Xylose (über 70%) zu erzielen (Chen et al. 2009).

---

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausbeute an Zucker von den Kombinationen, der Inkubationszeit und dem Zeitintervall der enzymatischen Hydrolyse abhängt. Die optimale Kombination der Pilze zur Vorbehandlung des Maisstrohs ist stark von der Art des Weißfäulepilze und den Nachkommen der Trichoderma abhängig.

Ein wichtiges Ergebnis ist die Synergie von Trichoderma reesei Stämmen und Weißfäuleisolate. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Ausbeuten an Glucose durch Vorbehandlung mit Koinokulierung und Einzelinokulierung. Die Vorbehandlung durch die Kombination von BH31 (Weißfäulepilze) und 1A2D15 (Trichoderma reesei Stamm, zweiter Nachkomme) weisen nach einer sechsständigen enzymatischen Hydrolyse eine hohe Ausbeute an Glucose (187 mg/g) auf.

Des Weiteren sind optimale Bedingungen wie beispielsweise Zeitintervalle und Inkubationszeiten für jede Kombination anders. Das optimale Zeitintervall für die Kombination BH31-1A2D15 sind drei Stunden und für BH31-TRKH1c1 24 Stunden bezüglich freigesetzter Glucose. Dabei steigt die Ausbeute an Xylose mit steigendem Zeitintervall. Nach 96-stündiger enzymatischer Hydrolyse ist BH31-QM6a die effektivste Kombination mit ihrem Wert von 25 mg/g freigesetzter Xylose für eine achtwöchige Inkubationszeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass die achtwöchige Inkubationszeit einen positiven Einfluss auf die Ausbeute von Glucose und Xylose hat. Es wurde versuche gemacht, dass mehr als 8 Wochen keine Steigerung mehr bringen. Das Isolat BH31 ist das Effektivste der vier ausgewählten Weißfäulepilze. Die erhaltenen Stämme von Trichoderma sind wichtige Ressourcen für die zukünftige Entwicklung eines Co-Kultivierungsansatzes und teilweise für die Anwendung in der Industrie.

Die Verbesserung der Vorbehandlung des Maisstrohs durch den Co-Kultivierungsansatz zeigte vielversprechende Ergebnisse für die Zukunft auf. Jedoch konnte eine optimale Kombination zwischen den Weißfäulepilze und der verbesserten Trichoderma Stämme reesei aufgrund der langen Versuchsdauer nicht vollständig abgeschlossen werden. Hier könnten zukünftige Arbeiten neue Kombinationen zwischen den vier ausgewählten Weißfäulepilze und bereits verbesserten Trichoderma Stämmen versuchen. Obwohl bereits verbesserte Trichoderma Stämme für zukünftige Studien eine wichtige Ressource sind, könnten aber hocheffiziente Weißfäuleisolate gefunden werden, um eine optimale Kombination zu erreichen. In früheren Studien konnte daher von den Weißfäulepilze profitiert werden, bei denen ein hoher Ligninabbau nachgewiesen wurde.

Des Weiteren könnten/sollten die weiterführenden Arbeiten neue Bedingungen der Co-Kultivierung versuchen. Dafür könnte neben neuen Zeitintervallen der enzymatischen Hydrolyse und Inkubationszeit der Vorbehandlung auch die sequentielle Co-Kultivierungsmethode versucht werden.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Ballesteros, I, MJ Negro, JM Oliva, A Cabanas, P Manzanares, and M Ballesteros. 2006. "Ethanol Production from Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130, no. 1-3 (MAR 2006): 496-508. <https://dx.doi.org/10.1385/ABAB:130:1:496>.
- Ballesteros, I., M. Negro, J. M. Oliva, A. Cabanas, P. Manzanares, and M. Ballesteros. 2006. "Ethanol Production from Steam Explosion Pretreated Wheat Straw." *Applied Biochemical Biotechnology* 130: 278-288.
- Bauer, Alexander, Javier Lizasoain, Franz Theuretzbacher, Jane W. Agger, María Rincón, Simona Menardo, Molly K. Saylor, Ramón Enguñanos, Paal J. Nielsen, Antje Potthast, Thomas Zweckmair, Andreas Gronauer, and Svein J. Horn. 2014. "Steam Explosion Pretreatment for Enhancing Biogas Production of Late Harvested Hay." *Bioresource Technology* 166: 403-410. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.025>.
- Benedix, Roland. 2015. *Bauchemie Einführung in Die Chemie Für Bauingenieure Und Architekten*. 6., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2015. ed. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Buzdar, A. U., Aman U. Buzdar, Steven E. Come, and S. E. Come. 2001. "Proceedings of the First International Conference on Recent Advances and Future Directions in Endocrine Therapy for Breast Cancer: Summary Consensus Statement." *Clinical cancer research*. 7, no. 12: 4335s-4337s.
- Casieri, Leonardo, Antonella Anastasi, Valeria Prigione, and Giovanna Cristina Varese. 2010. "Survey of Ectomycorrhizal, Litter-Degrading, and Wood-Degrading Basidiomycetes for Dye Decolorization and Ligninolytic Enzyme Activity." *Antonie van Leeuwenhoek* 98, no. 4 (2010/11/01): 483-504. <https://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9466-9>.
- Chen, Ming, Jing Zhao, and Liming Xia. 2009. "Comparison of Four Different Chemical Pretreatments of Corn Stover for Enhancing Enzymatic Digestibility." *Biomass and Bioenergy* 33, no. 10 (2009/10/01/): 1381-1385. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.05.025>.
- Chen, Wen-Hua, Ben-Li Pen, Ching-Tsung Yu, and Wen-Song Hwang. 2011. "Pretreatment Efficiency and Structural Characterization of Rice Straw by an Integrated Process of Dilute-Acid and Steam Explosion for Bioethanol Production." *Bioresource Technology* 102, no. 3 (2011/02/01/): 2916-2924. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.052>.

- 
2012. *Analysis of Options Beyond 20% Ghg Emission Reductions: Member State Results*. by COMMISSION, EUROPEAN.
- Dahadha, S., Z. Amin, A. A. B. Lakeh, and E. Elbeshbishy. 2017. "Evaluation of Different Pretreatment Processes of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Biomethane Production." *ENERGY & FUELS* 31, no. 10: 10335-10347.  
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02045>.
- Demirbas, Ayhan. 2005. "Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass." *Energy Sources* 27 (4): 327-337.  
<https://doi.org/10.1080/00908310390266643>.
- Ding, Changhe, Xiang Wang, and Mengxing Li. 2019. "Evaluation of Six White-Rot Fungal Pretreatments on Corn Stover for the Production of Cellulolytic and Ligninolytic Enzymes, Reducing Sugars, and Ethanol." *Appl Microbiol Biotechnol* 103, no. <b>ISSN: </b>0175-7598: 5652. <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09884-y>.
- Energieschweiz. 2017. "Energie Aus Biomasse."
- George, Johnsy, and S. N. Sabapathi. 2015. "Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Functional Properties, and Applications." *Nanotechnology, science and applications*. 8: 45.
- Gupta, Vijai K., Christian P. Kubicek, Jean-Guy Berrin, David W. Wilson, Marie Couturier, Alex Berlin, Edivaldo X. F. Filho, and Thaddeus Ezeji. 2016. "Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass." *Trends in Biochemical Sciences* 41, no. 7 (2016/07/01/): 633-645.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>.
- Gírio, F. M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review." *Bioresource Technology* 101, no. 13 (2010/07/01/): 4775-4800.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>.
- Havlík, Petr, Uwe A. Schneider, Erwin Schmid, Hannes Böttcher, Steffen Fritz, Rastislav Skalský, Kentaro Aoki, Stéphane De Cara, Georg Kindermann, Florian Kraxner, Sylvain Leduc, Ian McCallum, Aline Mosnier, Timm Sauer, and Michael Obersteiner. 2011. "Global Land-Use Implications of First and Second Generation Biofuel Targets." *Energy Policy* 39, no. 10 (2011/10/01/): 5690-5702.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030>.
- Heinze, Thomas, A. Ebringerova, S. E. Harding, and Thomas T. Heinze. 2005. "Polysaccharides I Structure, Characterization and Use."
- Hermosilla, Edward, Olga Rubilar, Heidi Schalchli, Ayla Sant'Ana da Silva, Viridiana Ferreira-Leitao, and María Cristina Diez. 2018. "Sequential White-Rot and Brown-Rot

- 
- Fungal Pretreatment of Wheat Straw as a Promising Alternative for Complementary Mild Treatments." *Waste Management* 79 (2018/09/01/): 240-250.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.044>.
- Jaeger, Karl-Erich, Andreas Liese, and Christoph Syldatk. 2018. *Einführung in Die Enzymtechnologie*. vol. Book, Whole. Heidelberg;Berlin;: Springer Berlin Heidelberg..
- Lavoine, Nathalie, Isabelle Desloges, Alain Dufresne, and Julien Bras. 2012. "Microfibrillated Cellulose – Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review." *Carbohydrate Polymers* 90, no. 2 (2012/10/01/): 735-764.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>.
- Lee, Duu-Hwa. 2017. "Econometric Assessment of Bioenergy Development." *International Journal of Hydrogen Energy* 42, no. 45 (2017/11/09/): 27701-27717.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.055>.
- Li, Chenlin, Gang Cheng, Venkatesh Balan, Michael S. Kent, Markus Ong, Shishir P. S. Chundawat, Leonardo daCosta Sousa, Yuri B. Melnichenko, Bruce E. Dale, Blake A. Simmons, and Seema Singh. 2011. "Influence of Physico-Chemical Changes on Enzymatic Digestibility of Ionic Liquid and Afex Pretreated Corn Stover." *Bioresource Technology* 102, no. 13 (2011/07/01/): 6928-6936.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.005>.
- Li, Ming-Fei, Yong-Ming Fan, Feng Xu, Run-Cang Sun, and Xun-Li Zhang. 2010. "Cold Sodium Hydroxide/Urea Based Pretreatment of Bamboo for Bioethanol Production: Characterization of the Cellulose Rich Fraction." *Industrial Crops and Products* 32, no. 3 (2010/11/01/): 551-559.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.004>.
- Li, Xuan, Tae Hyun Kim, and Nhuan P. Nghiem. 2010. "Bioethanol Production from Corn Stover Using Aqueous Ammonia Pretreatment and Two-Phase Simultaneous Saccharification and Fermentation (Tpssf)." *Bioresource Technology* 101, no. 15 (2010/08/01/): 5910-5916.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.015>.
- Martínez-Patiño, José Carlos, Thelmo A. Lu-Chau, Beatriz Gullón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, and Juan M. Lema. 2018. "Application of a Combined Fungal and Diluted Acid Pretreatment on Olive Tree Biomass." *Industrial Crops and Products* 121 (2018/10/01/): 10-17.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.078>.
- Monrroy, Mariel, Isidora Ortega, Mario Ramírez, Jaime Baeza, and Juanita Freer. 2011. "Structural Change in Wood by Brown Rot Fungi and Effect on Enzymatic
-

- 
- Hydrolysis." *Enzyme and Microbial Technology* 49, no. 5 (2011/10/10/): 472-477.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.004>.
- Mäkelä, Miia R., Nicole Donofrio, and Ronald P. de Vries. 2014. "Plant Biomass Degradation by Fungi." *Fungal Genetics and Biology* 72: 2-9.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>.
- Oberlerchner, Josua Timotheus, Stefan Böhmendorfer, Thomas Rosenau, and Antje Potthast. 2018. "A Matrix-Resistant Hptlc Method to Quantify Monosaccharides in Wood-Based Lignocellulose Biorefinery Streams." *Holzforschung* 72, no. 8: 645-652.  
<https://dx.doi.org/10.1515/hf-2017-0170>.
- Oetken, Jörn. 2019. "Vorbehandlung Und Hydrolyse Agrarischer Reststoffe Für Die Stoffliche Biomassennutzung " .
- Peterson, Robyn, and Helena Nevalainen. 2012. *Trichoderma Reesei Rut-C30 - Thirty Years of Strain Improvement*. Vol. 158.
- Poth, Sebastian. 2013. *Enzymatische Hydrolyse Und Fermentation Von Lignocellulose: Optimierung Und Prozessintegration Zur Umsetzung Von Vorbehandelten, Hölzernen Cellulose-Faserstoffen Für Die Produktion Von Ethanol*: Logos Verlag Berlin GmbH.
- Rytioja, Johanna, Kristiina Hildén, Jennifer Yuzon, Annele Hatakka, Ronald P. de Vries, Miia R. Mäkelä, and J. van den Brink. 2014. "Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 78, no. 4: 614-49. <https://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>.
- Seidl, V, C Seibel, CP Kubicek, and M Schmoll. 2009. "Sexual Development in the Industrial Workhorse *Trichoderma Reesei*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 33 (AUG 18 2009): 13909-13914.  
<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904936106>.
- Seidl, Verena, Christian Seibel, Christian P. Kubicek, Monika Schmoll, and Arnold L. Demain. 2009. "Sexual Development in the Industrial Workhorse *Trichoderma Reesei*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 33: 13909-13914. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904936106>.
- Shirkavand, Ehsan, Saeid Baroutian, Daniel J. Gapes, and Brent R. Young. 2016. "Combination of Fungal and Physicochemical Processes for Lignocellulosic Biomass Pretreatment – a Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54: 217-234.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.003>.
- Sista Kameshwar, Ayyappa Kumar, and Wensheng Qin. 2018. "Comparative Study of Genome-Wide Plant Biomass-Degrading Cazymes in White Rot, Brown Rot and Soft
-

- 
- Rot Fungi." *Mycology* 9, no. 2 (2018/04/03): 93-105.  
<https://dx.doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>.
- Sluiter, A. 2008. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass."
- Sunasee, Rajesh, and Usha Hemraz. 2018. "Synthetic Strategies for the Fabrication of Cationic Surface-Modified Cellulose Nanocrystals." *Fibers* 6, no. 1: 15.  
<https://dx.doi.org/10.3390/fib6010015>.
- Sánchez, Óscar J., and Carlos A. Cardona. 2008. "Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks." *Bioresource Technology* 99, no. 13 (2008/09/01/): 5270-5295.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>.
- Taherzadeh, Mohammad J., Keikhosro Karimi, Ingenjörshögskolan Institutionen, and Borås Högskolan i. 2008. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 9, no. 9: 1621-1651. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms9091621>.
- Uihlein, Andreas, and Liselotte Schebek. 2009. "Environmental Impacts of a Lignocellulose Feedstock Biorefinery System: An Assessment." *Biomass and Bioenergy* 33, no. 5 (2009/05/01/): 793-802.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.12.001>.
- Sustainable Bioenergy: A Framework for Decision Makers*. by UN. 2007
- Vaidya, Alankar, and Tripti Singh. 2012. "Pre-Treatment of Pinus Radiata Substrates by Basidiomycetes Fungi to Enhance Enzymatic Hydrolysis." *Biotechnology Letters* 34, no. 7: 1263-1267. <https://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0894-7>.
- Van Soest, P. J. 1965. "Use of Detergents in Analysis of Fibrous Feeds. 3. Study of Effects of Heating and Drying on Yield of Fiber and Lignin in Forages." *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 48: 785-790.
- Wan, Caixia, and Yebo Li. 2010. "Microbial Delignification of Corn Stover by Ceriporiopsis Subvermispora for Improving Cellulose Digestibility." *Enzyme and microbial technology* 47, no. <b>ISSN: </b>0141-0229: 36.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.04.001>.
- Wikimedia. August 2011. "Lignin,<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin.png>." Form of Item.
-

- 
- Zhang, Fei, Fengwu Bai, and Xinqing Zhao. 2016. "Enhanced Cellulase Production from *Trichoderma Reesei* Rut-C30 by Engineering with an Artificial Zinc Finger Protein Library." *Biotechnology Journal* 11, no. 10: 1282-1290.  
<https://dx.doi.org/10.1002/biot.201600227>.
- Zhang, Liming, Tingting You, Tian Zhou, Lu Zhang, and Feng Xu. 2016. "Synergistic Effect of White-Rot Fungi and Alkaline Pretreatments for Improving Enzymatic Hydrolysis of Poplar Wood." *Industrial Crops & Products* 86: 155-162.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.041>.
- Zhang, Xiaoyu, Chunyan Xu, and Hongxun Wang. 2007. "Pretreatment of Bamboo Residues with *Coriolus Versicolor* for Enzymatic Hydrolysis." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, no. 2 (2007/08/01/): 149-151.  
<https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.104.149>.
- Zhang, Yi-Heng Percival, and Lee R. Lynd. 2004. "Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems." *Biotechnology and Bioengineering* 88, no. 7 (2004/12/30): 797-824. Accessed 2019/03/15. <https://dx.doi.org/10.1002/bit.20282>.
- Zhao, Yuelong, Hui Sun, Biao Yang, and Yunxuan Weng. 2020. "Hemicellulose-Based Film: Potential Green Films for Food Packaging." *Polymers* 12, no. 8.  
<https://dx.doi.org/10.3390/polym12081775>.
- Zichy, Michael, Christian Dürnberger, Beate Formowitz, and Anne Uhl. 2014. *Energie Aus Biomasse – Ein Ethisches Diskussionsmodell*: Springer Vieweg, Wiesbaden.