

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

**Rheinland-Pfälzische Technische Universität  
Kaiserslautern-Landau**

**GreenToGreen – kommunaler Grünschnitt als Basis für  
eine grüne Chemie**

**Marianne Volkmar, Roland Ulber**

**Förderkennzeichen 031B0903B**

**„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0903B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“**

## Kurzbericht (Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil I)

Das Projekt GreenToGreen beschäftigte sich mit dem Rohstoffwandel von fossilen zu biogenen Ressourcen. Globale Herausforderungen wie der Klimawandel sowie ein steigender Rohstoff- und Energiebedarf durch eine wachsende Weltbevölkerung machen eine Umstrukturierung der aktuellen Industrie unumgänglich. Im Fokus steht hierbei die Verwendung bisher ungenutzter Stoffströme und das Schließen biogener Stoffkreisläufe zur Erreichung einer höheren Wertschöpfung. Ausgangspunkt dieses Forschungsvorhabens ist die Verwendung von kommunalem Grünschnitt als Ressource. Grünschnitt fällt im städtischen Raum in großen Mengen beispielsweise durch die Pflege von Gartenanlagen und Parks an. Bisher wird dieser Rohstoff hauptsächlich kompostiert oder einer energetischen Nutzung zugeführt. Hierzu fallen für die Entsorgung mehr Kosten an als durch die aktuelle Wertschöpfung generiert werden. Im Rahmen dieses Projekts wird eine stoffliche Nutzung des Grünschnitts angestrebt, bei welcher er als Rohstoffquelle für Fermentationen verwendet wird. Hierbei sollen im Sinne einer grünen Chemie Plattformchemikalien produziert werden.

### Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Vorhabens wurden verschiedene Fraktionen exemplarisch für den facettenreichen Rohstoff Grünschnitt verwendet. Zum Einsatz kamen verschiedene Baum- und Heckenschnitte, hauptsächlich von Buche und Kiefer, sowie von unterschiedlichen Standorten und zu unterschiedlichen Jahreszeiten geerntete Wiesenschnitte. Die Rohstoffe wurden auf ihre Zusammensetzung hin untersucht und die Lignin- und Kohlenhydratkonzentrationen anhand des Standard-Protokolls der NREL (National Renewable Energy Laboratory) bestimmt.

Zu Beginn des Vorhabens wurde eine mechanische Vorbehandlung der Rohstoffe durchgeführt. Stärker verholzte Biomasse wurde gehäckselt, Grünschnitt mit einem niedrigeren Ligningehalt wurde entweder mit einer Tinkturen- oder einer Schneckenpresse in einen Presssaft und einen Presskuchen fraktioniert. Die festen Fraktionen wurden einem hydrothermalen Aufschluss unterzogen. Nach der Bestimmung geeigneter Aufschlussparameter wurde ein Scale-up des Versuchsaufbaus durchgeführt. Hierbei wurde eine hohe Ausbeute hydrolysierbarer Zucker und gleichzeitig eine möglichst geringe Menge an inhibierenden hydrothermalen Abbauprodukten angestrebt. Der im Aufschluss gebildete Rückstand wurde enzymatisch verzuckert. Das erhaltene Hydrolysat wurde teilweise detoxifiziert. Im Anschluss kam es entweder als Fermentationsmedium oder als Zusatz zu regulärem Medium zum Einsatz. Der durch das Abpressen des Grünschnitts mit geringerem Ligningehalt erhaltene Presssaft wurde mit verschiedenen Methoden sterilisiert und anschließend ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen als Zusatz zu Fermentationsmedien oder reines Medium verwendet. Sowohl Presssaft als auch Hydrolysat wurde für Kultivierungen unterschiedlicher Organismen getestet. Die Eignung des Hydrolysats als Medienzusatz wurde für *U. maydis* und *C. acetobutylicum* gezeigt. Der Presssaft wurde zusätzlich zu den beiden genannten Organismen noch erfolgreich für die Kultivierung von *S. cerevisiae* und *L. delbrueckii* subsp. *lactis* eingesetzt. Unter Verwendung von Medienzusätzen aus Grünschnitt wurden erfolgreich die Plattformchemikalien Ethanol, Milchsäure, Itaconsäure, Buttersäure, Aceton und Butanol produziert.

Zu Erhöhung der Kohlenstoffausbeute wurde eine Elektro-unterstützte Kultivierung von *C. acetobutylicum* angestrebt. Dafür wurde der Einfluss einer angelegten Spannung auf Presssaft und die verwendeten Elektroden untersucht, um in einem nächsten Schritt Elektrofermentation und die Verwendung von Medien aus Grünschnitt kombinieren zu können.

Des Weiteren wurde der Wiesenschnitt-Presssaft in Hinblick auf eine Gewinnung von Aminosäuren hin untersucht. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde eine enzymatische Proteinhydrolyse durchgeführt. Trotzdem war die Konzentration an Aminosäuren für eine wirtschaftliche Nutzung zu gering.

## Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Die RPTU stand in regem wissenschaftlichem Austausch mit den andern beteiligten Forschungseinrichtungen. In Zusammenarbeit mit der Technischen Hochschule Mittelhessen entstanden während der Projektlaufzeit die folgenden sechs wissenschaftliche Veröffentlichungen:

- Langsdorf, M. Volkmar, D. Holtmann, R. Ulber; Material utilization of green waste – A review on potential valorisation methods; *Bioresour. Bioprocess.* 8, 19 (2021); DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00367-5>
- L. Varriale, M. Volkmar, J. Weiermüller, R. Ulber; Effects of Pretreatment on the Biocatalysis of Renewable Resources. *Chemie Ingenieur Technik* (2022) <https://doi.org/10.1002/cite.202200137>
- Langsdorf, A-L. Drommershausen, M. Volkmar, R. Ulber, D. Holtmann; Fermentative alpha-Humulene Production from Homogenized Grass Clippings as a Growth Medium; *Molecules* 2022, 27, 868; <https://doi.org/10.3390/molecules27248684>
- Langsdorf, M. Volkmar, R. Ulber, F. Hollmann, D. Holtmann; Peroxidases from grass clippings for the removal of phenolic compounds from wastewater; *Bioresources Technology Reports* 2023, 22, 101471; [doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101471](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101471)
- M. Volkmar, A.-L. Maus, M. Weisbrodt, J. Bohlender, A. Langsdorf, D. Holtmann, R. Ulber; Municipal green waste as substrate for the microbial production of platform chemicals; (2023) *Bioresour. Bioprocess.* 10 (1). DOI: 10.1186/s40643-023-00663-2
- K. Oehlenschläger, M. Volkmar, J. Stiefelmaier, A. Langsdorf, D. Holtmann, N. Tippkötter, R. Ulber; New insights into the influence of pre-culture on robust solvent production of *C. acetobutylicum*; *Appl. Microbiol Biotechnol* 108, 143 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12981-8>

Zusätzlich wurden dem ifn FTZ von der RPTU Presskuchen-Proben zur Verfügung gestellt, die bei unterschiedlichen Drücken in einer Tinkturenpresse erzeugt wurden. Diese wurden für Pyrolyse-Versuche eingesetzt.

## Eingehende Darstellung (Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil II)

Die im Rahmen des Vorhabens „GreenToGreen – Kommunalen Grünschnitt als Basis für eine grüne Chemie“ – Teilprojekt B durchgeführten Arbeiten werden im Folgenden anhand der in der Vorhabenbeschreibung geplanten Arbeitspakete ausführlich dargestellt.

### Arbeitspaket 1: Vorbehandlung des Grünschnitts

Im Arbeitspaket 1 wurde die mechanische und physikochemische Vorbehandlung von kommunalem Grünschnitt untersucht.

#### AP 1.1 Untersuchung und Optimierung der mechanischen Vorbehandlung des Grünschnitts (inkl. Herstellung eines Presssaftes)

Zur mechanischen Vorbehandlung gehörte sowohl eine mechanische als auch eine physikochemische Vorbehandlung. Die Biomasse wurde in einem ersten Schritt zerkleinert. Härteres und größeres Material wie Baumschnitt wurde in einem Gartenhäcksler vorzerkleinert. Anschließend wurde das Material für hydrothermale Aufschlüsse weiterhin in einem Mixer bearbeitet. Für eine Analyse der Zusammensetzung wurde die Biomasse in einer Kaffeemühle zu einem Pulver vermahlen. Biomasse mit einem höheren Feuchtegehalt wurde zur Gewinnung eines Presssaftes abgepresst. Hierzu wurde eine Hochdruck-Tinkturenpresse (HP2H, Fischer Maschinenfabrik GmbH, Neuss, Deutschland) und eine Schneckenpresse (Angel Juicer 8500S, LUBA GmbH; Bad Homburg v.d.H., Deutschland) verwendet. Durch den höheren möglichen Druck wird mithilfe der Tinkturenpresse eine höhere Presssaft-Ausbeute erzielt. Die mechanische Beanspruchung der Biomasse durch die rotierenden Walzen der Schneckenpresse hingegen wirkt sich positiv auf die anschließende Verarbeitung aus. In Abbildung 1 sind die Presskuchen nach der Behandlung mit Tinkturen- (A) und Schneckenpresse (B) zu sehen. Die Struktur der Grashalme ist im Presskuchen der Tinkturenpresse noch deutlich zu erkennen, wohingegen im Presskuchen der Schneckenpresse keine einzelnen Halme mehr zu sehen sind.

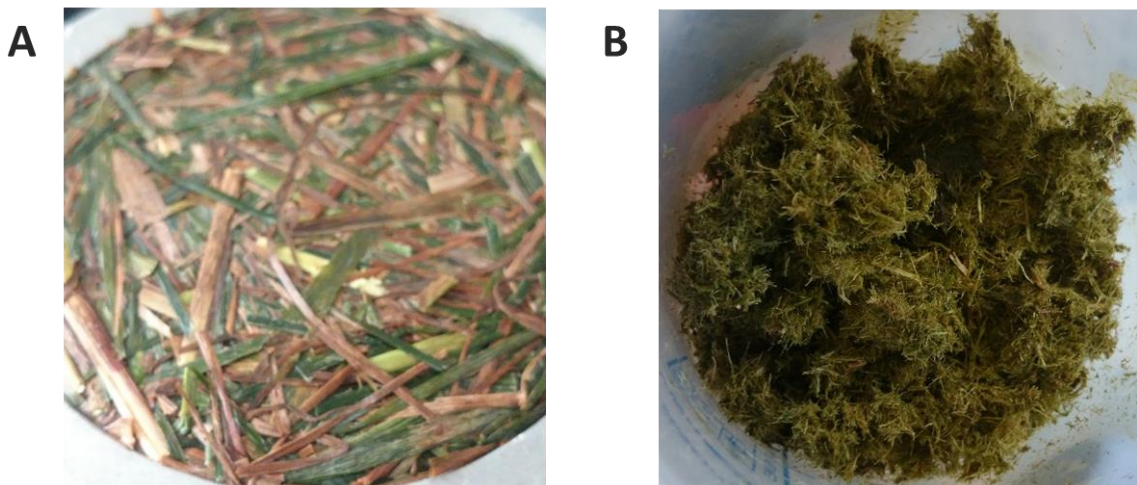


Abbildung 1: Presskuchen von Grünschnitt nach dem Abpressvorgang in einer (A) Tinkturenpresse (440 bar, 20 Minuten) oder (B) Schneckenpresse

Mit der Hochdruck-Tinkturenpresse wurde Wiesenschnitt bei unterschiedlich hohen Drücken abgepresst und die resultierenden Presskuchen dem ifn FTZ für weitere Versuche zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde Presssaft von zwei unterschiedlichen Grünschnitt-Fractionen für die THM für Fermentationsversuche produziert.

#### AP 1.2 Untersuchung der Effizienz (inkl. Bildung von Inhibitoren) von LHW und Organosolv mit unsortiertem Grünschnitt/Biomasse

Für die physikochemische Vorbehandlung von Grünschnitt wurde ein hydrothormaler Aufschluss in einem Hochdruckreaktor (BR-500, Berghof Products + Instruments, Eningen, Deutschland) angewendet. Dabei kamen entweder Wasser oder eine wässrige Ethanol-Lösung mit variierender Konzentration als Lösemittel zum Einsatz. Es wurden insgesamt vier verschiedene Aufschlüsse mit zwei unterschiedlichen Substraten durchgeführt, wobei sowohl Wiesenschnitt als auch Gartenschnitt, der hauptsächlich aus Buchen- und Kiefernholzschnitzeln bestand, verwendet wurden. Der Einfluss von Wasser bzw. Ethanol als Lösemittel sowie unterschiedlichen Temperaturen und Behandlungszeiten auf die Zusammensetzung des Aufschlussrückstands und die gebildeten inhibitorischen Nebenprodukte wurde eingehend untersucht. In Abbildung 2 werden die Zusammensetzungen des Rückstands im Vergleich zum Ausgangsstoff für Wiesenschnitt (A) und Gartenschnitt (B) dargestellt. Es zeigt sich, dass alle Aufschlussmethoden den Glucoseanteil im Rückstand erhöhen, wobei eine höhere Temperatur mit einer stärkeren Erhöhung des Glucosegehalts einhergeht. Die Verwendung von Ethanol als Lösemittel führt bei beiden Ausgangsstoffen zu einer intensiveren Delignifizierung des Substrats. Gleichzeitig werden jedoch auch mehr potentielle Inhibitoren für spätere Fermentationsprozesse gebildet, wie in Abbildung 2 exemplarisch für Wiesenschnitt (C) und Gartenschnitt (D) bei drei Aufschlüssen mit unterschiedlichen Parametern gezeigt wird. Die Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen Vorbehandlungen auf eine anschließende enzymatische Hydrolyse stellt den nächsten Arbeitsschritt dar. Hierbei wird geprüft, wie effektiv die behandelten Grünschnittfraktionen in Glucose umgewandelt werden können, was entscheidend für die nachfolgende Fermentation zur Produktion von Plattformchemikalien ist. Diese detaillierte Analyse der Vorbehandlungsmethoden liefert wertvolle Einblicke in ihre Effektivität und ermöglicht eine gezielte Optimierung des Prozesses zur Nutzung von Grünschnitt als nachhaltige Ressource für die Biotechnologie.

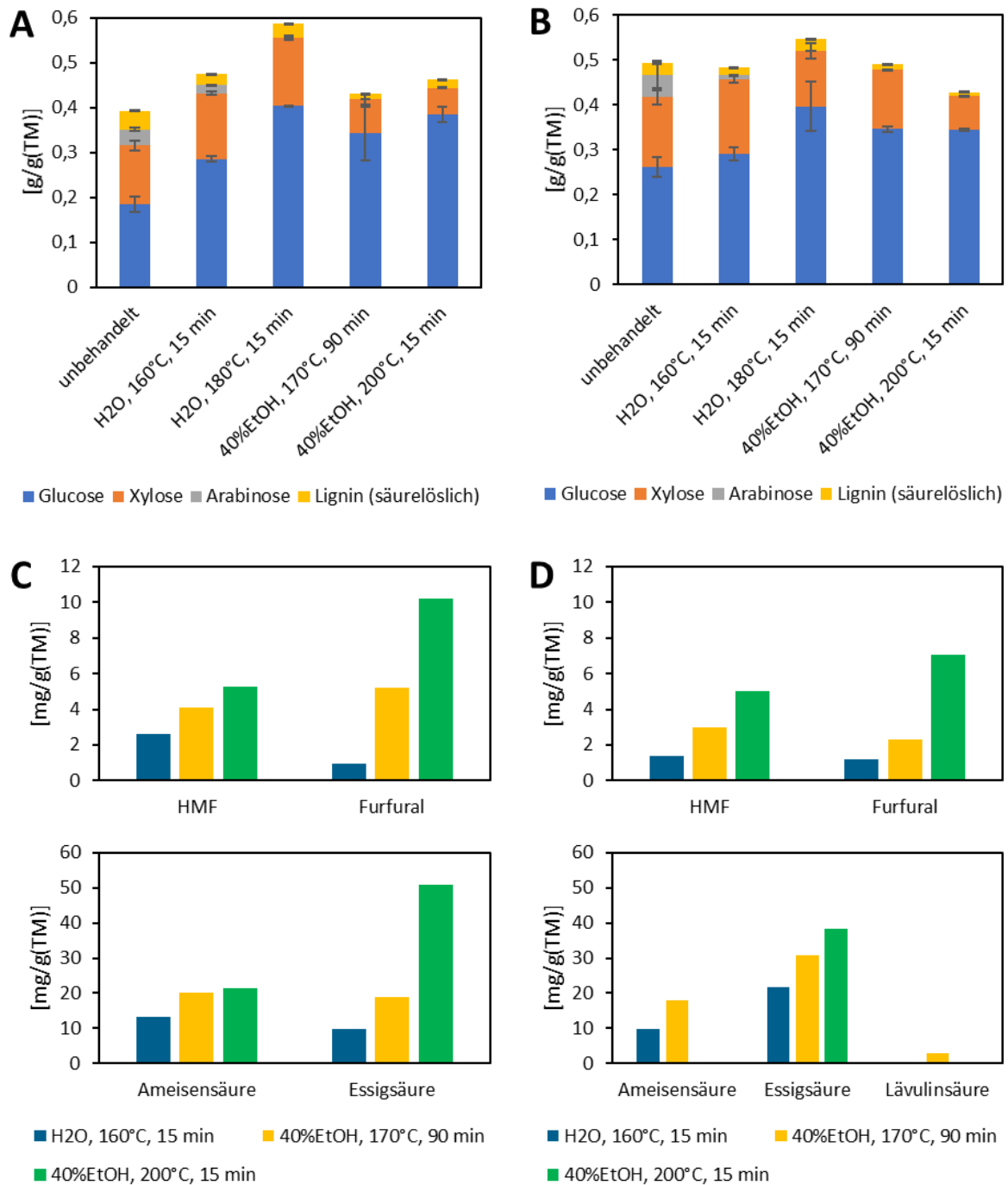


Abbildung 2: Einfluss unterschiedlicher Parameter hydrothormaler Aufschlüsse auf die Zusammensetzung des Aufschlussrückstands sowie die Bildung von Inhibitoren. Zusammensetzung von A) Wiesenschnitt und B) Gartenschnitt unbehandelt bzw. nach hydrothermalen Aufschlüssen mit unterschiedlichen Parametern (H<sub>2</sub>O oder EtOH, Temperatur, Dauer; Flottenverhältnis jeweils 1:10; n=2). Inhibitorbildung bei C) Wiesenschnitt und D) Gartenschnitt bei hydrothermalen Aufschlüssen mit unterschiedlichen Parametern. HMF=Hydroxymethylfurfural.

Der aus dem hydrothermalen Aufschluss resultierende Rückstand wurde enzymatisch verzuckert. Hierbei kam eine Mischung aus Cellulasen und Hemicellulasen (Xylanase 2x, ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland) sowie einem Zusatz von Pektinasen (Pectinase L-40, ASA Spezialenzyme) zum Einsatz. Die Enzymbeladung betrug 1,6 % bezogen auf die verwendete Biotrockenmasse. Das Verhältnis der verwendeten Enzyme betrug 60 % Cellulase/Hemicellulase

und 40 % Pektinase. Hiermit wurde eine Umwandlung von 87,5 % der in der Biomasse enthaltenen Cellulose in Glucose erreicht. Es stand somit abschließend eine Vorbehandlungsmethode zur Verfügung, die unter minimaler Inhibitorbildung den Großteil der strukturellen Kohlenhydrate als fermentierbare Zucker zur Verfügung stellt. Das im Rahmen des Projektes entwickelte Prozessschema zur Vorbehandlung von kommunalem Grünschnitt in Abhängigkeit des Lignin- und Feuchtegehalts der Biomasse ist in Abbildung 3 gezeigt.

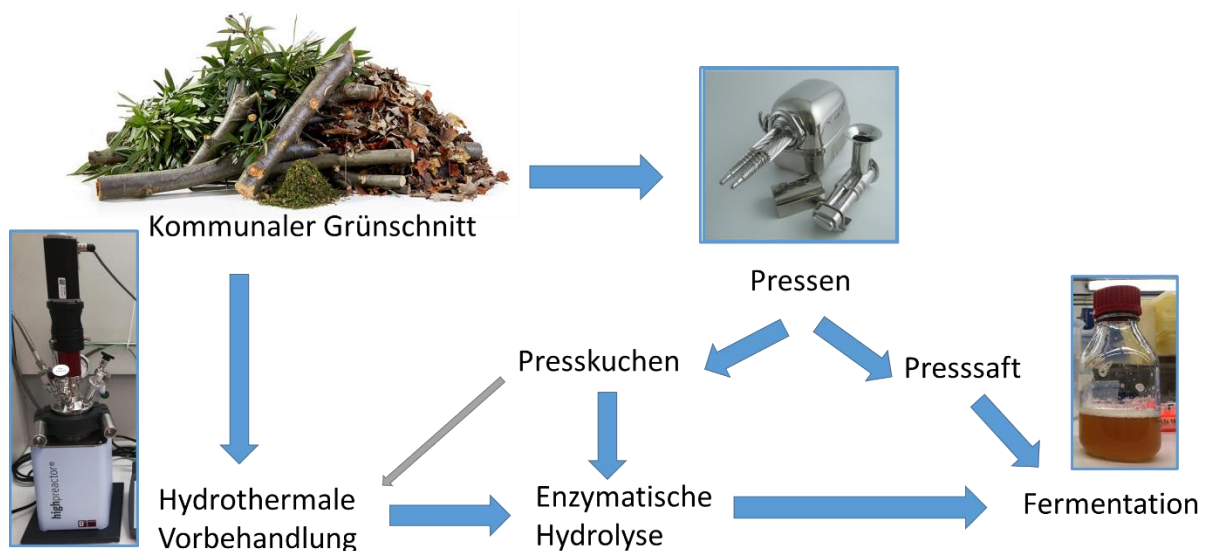


Abbildung 3: Prozessschema für die Vorbehandlung von kommunalem Grünschnitt

Abschließend wurde ein Scale-up der entwickelten Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde ein Hochdruck-Reaktor (BR-1000, Berghof Products + Instruments) mit einem Volumen von einem Liter angeschafft, mit dem der Aufschluss des Grünschnitts in einem größeren Maßstab durchgeführt werden kann. Hierdurch konnten größere Mengen Grünschnitt-Hydrolysat für die in AP3 beschriebenen Fermentationen produziert werden.

## Arbeitspaket 2: Gewinnung von Proteinen/Aminosäuren

Das zweite Arbeitspaket beinhaltet die Gewinnung von Proteinen und Aminosäuren aus dem Presssaft von kommunalem Grünschnitt. Diese sollen für die Ernährung von Nutztieren eingesetzt werden.

### AP 2.1. Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung verschiedener Presssaft-Fractionen

Es wurde eine Extraktion von Proteinen aus verschiedenen Wiesenschnitt-Fractionen durchgeführt und die darin enthaltenen Proteine zur Analyse der Zusammensetzung von Grasschnitt-Presssaft in Aminosäuren hydrolysiert. Außerdem wurde der Einfluss eines Autoklaviervorgangs des Presssafts auf die Menge sowie die Verteilung der Aminosäuren analysiert. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, nahm die Konzentration aller Aminosäuren durch das Autoklavieren geringfügig ab. Die Gesamtkonzentration der freien Aminosäuren in Graspresssaft betrug 1,5 bis 2,5 g/L.

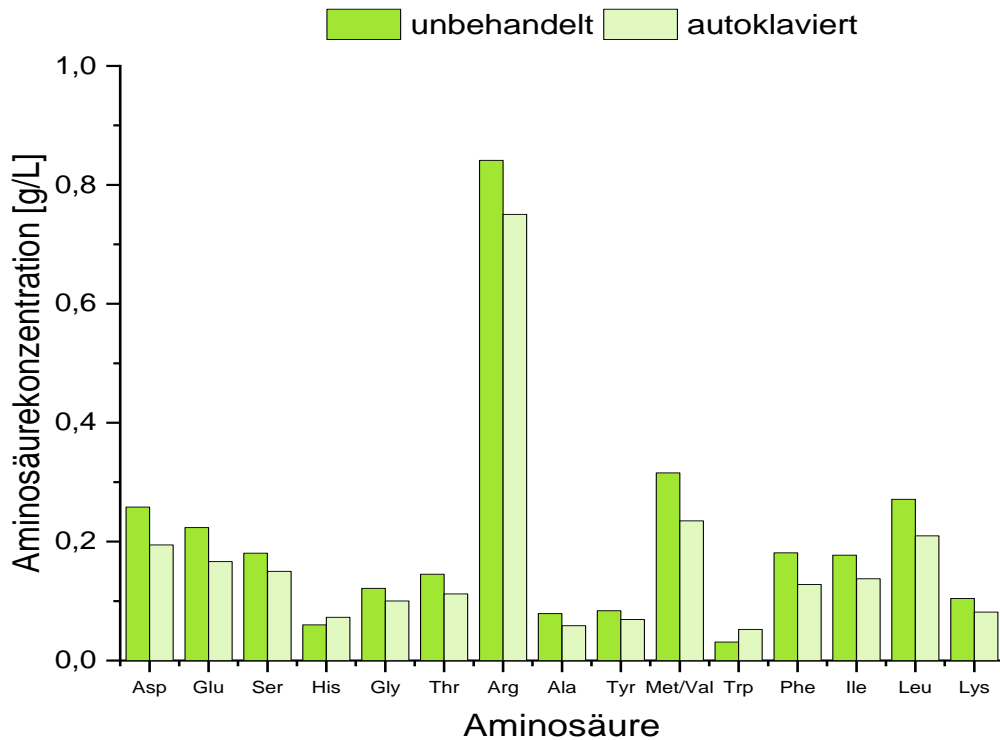


Abbildung 4: Verteilung der freien Aminosäuren in Presssaft aus Weidelgras vor und nach Autoklaviervorgang

### AP 2.2. Hydrolyse von löslichen Proteinen zu Aminosäuren

Nachdem die unter AP2.1 ermittelten Aminosäure-Konzentrationen als sehr gering identifiziert wurden, wurde eine Erhöhung der Aminosäurekonzentration durch eine enzymatische Hydrolyse angestrebt. Dabei wurde eine andere Charge Wiesenschnitt verwendet, wodurch direkte Vergleiche mit den Ergebnissen aus Abbildung 4 nicht möglich sind. Dennoch ist der Effekt der enzymatischen Hydrolyse übertragbar. Durch die Zugabe einer Protease von *Bacillus sp.* konnte die Konzentration freier Aminosäuren im Graspesssaft um 69,5 % gesteigert werden. Die Hydrolyse von unbehandeltem Gras führte sogar zu einer noch größeren Konzentrationssteigerung von 165 %. Trotz dieser erheblichen Steigerungen bleibt die finale Aminosäurekonzentration sowohl im Graspesssaft als auch im nativen Gras so gering, dass eine Fraktionierung der Aminosäuren mittels chromatographischer Methoden aus wirtschaftlicher Sicht keinen Sinn ergibt. Es wird deutlich, dass selbst nach der enzymatischen Behandlung die Aminosäurekonzentration nicht ausreichend hoch ist, um eine rentable Trennung zu rechtfertigen. Die Kultivierungen, die im Rahmen von AP3 durchgeführt wurden, unterstreichen jedoch eindeutig den Wert der Aminosäuren im Presssaft als Wachstumsförderer für verschiedene Mikroorganismen. Daher ergibt sich hier ein klarer wirtschaftlicher Vorteil durch die Substitution von Aminosäuren in Fermentationsmedien durch den Presssaft. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass der Presssaft trotz seiner niedrigen Aminosäurekonzentration eine wichtige Rolle in biotechnologischen Prozessen spielen kann und eine vielversprechende Alternative zur traditionellen Aminosäurezufuhr darstellt.

### AP 2.3. Fraktionierung der Aminosäuren mittels chromatographischer Methoden

Aufgrund der geringen Konzentration wurde auf eine Fraktionierung der enthaltenen Aminosäuren aus Gründen der Wirtschaftlichkeit verzichtet.

## Arbeitspaket 3: Fermentation

Im Arbeitspaket 3 wird die Fermentation unterschiedlicher Mikroorganismen auf Basis verschiedener Fraktionen des kommunalen Grünschnitts untersucht. Sowohl *Saccharomyces cerevisiae* als auch *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, *Ustilago maydis* und *Clostridium acetobutylicum* wurden entweder auf reinem Graspresssaft oder in Standardmedium mit unterschiedlich hohen Zusätzen von Presssaft kultiviert. *U. maydis* und *C. acetobutylicum* wurden zusätzlich auf Standardmedium mit Zusätzen von enzymatisch hydrolysiertem Aufschlussrückstand von Grünschnitt kultiviert.

### AP 3.1 Fermentation von *S. cerevisiae* zur Produktion von Ethanol

Um die Eignung von *S. cerevisiae* für die Produktion von Ethanol auf Basis von Grünschnittfraktionen zu untersuchen, wurden umfangreiche Versuchsreihen durchgeführt. Der Organismus wurde in Wiesenschnitt-Presssaft mit verschiedenen Zusätzen kultiviert, wobei die Kultivierung in reinem Graspresssaft besonders interessant war. Die Ergebnisse dieser Kultivierung, wie in Abbildung 5 A dargestellt, waren vielversprechend: Es wurden 14 g/L Ethanol gebildet, was einer Ausbeute von 87 % im Vergleich zu einer Referenzkultivierung in General Yeast-Komplexmedium entspricht. Dies legt nahe, dass reiner Graspresssaft ein vielversprechendes Kultivierungsmedium für *S. cerevisiae* darstellt.

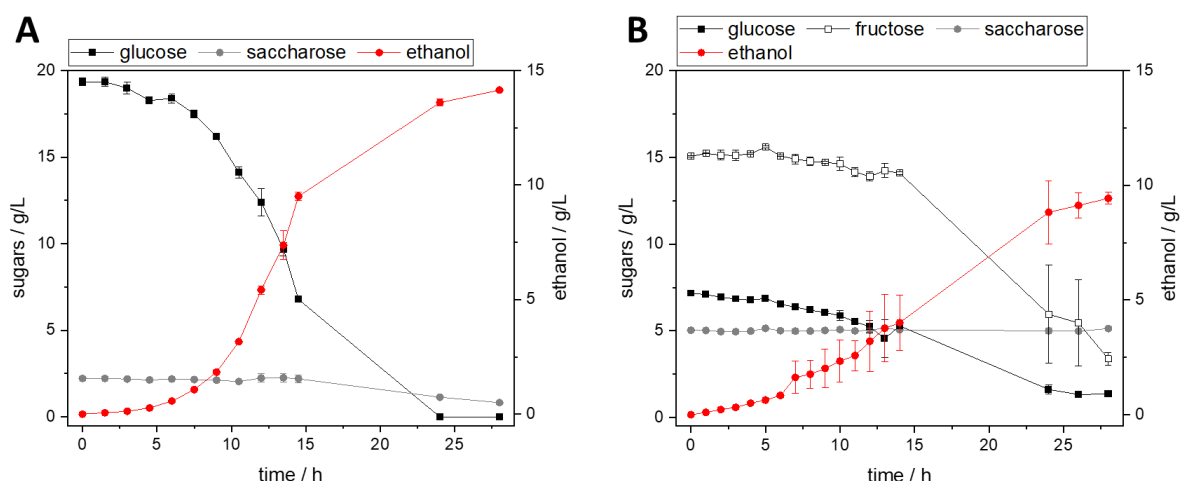


Abbildung 5: Kultivierung von *S. cerevisiae* in A) Standard-Komplexmedium in Schottflaschen und B) 100 % autoklaviertem Graspresssaft ohne Zusätze in einem Bioreaktorsystem.  $n=2$ , die Verbindungslinien dienen als Orientierungshilfe. Abbildung entnommen aus (Volkmar et al. 2023).

Um die Ausbeute weiter zu steigern, wurden Komponenten des Standardmediums sowie 0,1 % Invertase zugegeben. Die Invertase sollte die im Graspresssaft vorhandene Saccharose hydrolysieren und der Hefe als zusätzliche Kohlenstoffquelle dienen. Dies führte zu einer bemerkenswerten Ausbeute von  $0,71 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Zucker}}$ . Interessanterweise übertraf diese Ausbeute sogar die theoretisch mögliche Ausbeute von  $0,51 \text{ g}_{\text{Ethanol}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ , was darauf hinweist, dass weitere im Presssaft enthaltene Zucker zur Ethanolproduktion beitragen, jedoch nicht in die Berechnung einbezogen wurden. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse rechtfertigte die geringe Steigerung der Ausbeute nicht den wirtschaftlich aufwändigen Einsatz von Medienkomponenten und Enzymen. Daher wurde für einen Scale-Up des Versuchs auf die Zusätze verzichtet, wie in Abbildung 5 B dargestellt. Bei der Kultivierung in reinem Graspresssaft ohne

weitere Medienbestandteile in einem begasten und pH-kontrollierten Rührkesselreaktor mit einem Volumen von 0,4 L war die Endkonzentration mit 9,4 g/L Ethanol etwas geringer als in der Referenzkultivierung im Standardmedium. Die Ausbeute lag jedoch mit  $0,61 \pm 0,03$  g<sub>Ethanol</sub>/g<sub>Zucker</sub> immer noch in vergleichbarer Höhe. Die Ergebnisse der durchgeführten Fermentationen sind in Tabelle 1 vergleichend gegenübergestellt, wodurch die Effizienz der verschiedenen Versuchsbedingungen deutlich wird. Dieser umfassende Versuchsansatz ermöglichte einen detaillierten Einblick in die Potenziale und Grenzen der Ethanolproduktion aus Grünschnittfraktionen durch *S. cerevisiae*.

Tabelle 1: Ethanolausbeute der Kultivierungen von *S. cerevisiae* in Standardmedium und Graspresssaft mit und ohne Zusätze. Bei Angabe von Standardabweichungen  $n=2$ , Kultivierung in Schüttelkolben falls nicht anders angegeben.

Kultivierungsbedingungen	g <sub>Ethanol</sub> /g <sub>Zucker</sub>
General Yeast-Medium	$0,68 \pm 0,01$
100 % Graspresssaft ohne Zusätze	0,59
100 % Graspresssaft mit Zusatz aller General Yeast-Medienkomponenten + Invertase	0,71
100 % Graspresssaft ohne Zusätze, Kultivierung in 0,4 L Rührkesselreaktor	$0,61 \pm 0,03$

### AP 3.2. Fermentation von homofermentativen Lactobacillen zur Gewinnung von Milchsäure

Wie in AP 3.1 beschrieben, wurde auch der Organismus *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* in Grünschnitt-Presssaft mit unterschiedlichen Zusätzen kultiviert. Hierfür wurden verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt. Die Bildung des Produkts Milchsäure hat ein Absinken des pH-Werts zur Folge. Hierdurch ergab sich die Notwendigkeit eines Puffersystems in pH-unkontrollierten Systemen. Daher wurde CaCO<sub>3</sub> zur Pufferung des Mediums bei einer Kultivierung in Schottflaschen eingesetzt. Abbildung 6 A zeigt die Kultivierung in Graspresssaft ohne Pufferung, in Abbildung B ist die Kultivierung mit Zusatz von CaCO<sub>3</sub> gezeigt. Ohne die Zugabe eines Puffersystems wurden 8,8 g/L Milchsäure gebildet, was einer Ausbeute von  $0,87$  g<sub>Milchsäure</sub>/g<sub>Zucker</sub> entspricht. Durch die Supplementierung von CaCO<sub>3</sub> konnte die Milchsäurekonzentration auf 12,1 g/L und die Ausbeute auf  $1,27$  g<sub>Milchsäure</sub>/g<sub>Zucker</sub> gesteigert werden. Die Notwendigkeit eines Puffersystems besteht nicht nur bei der Verwendung von Graspresssaft als Kultivierungsmedium. Auch das zum Vergleich herangezogene Standard-Komplexmedium enthielt ursprünglich keine puffernden Substanzen. Durch das Hinzufügen von CaCO<sub>3</sub> konnten auch in den Referenzkultivierungen die Milchsäurekonzentration von 17,5 auf 25,6 g/L gesteigert werden, was die Notwendigkeit einer pH-Pufferung unterstreicht.

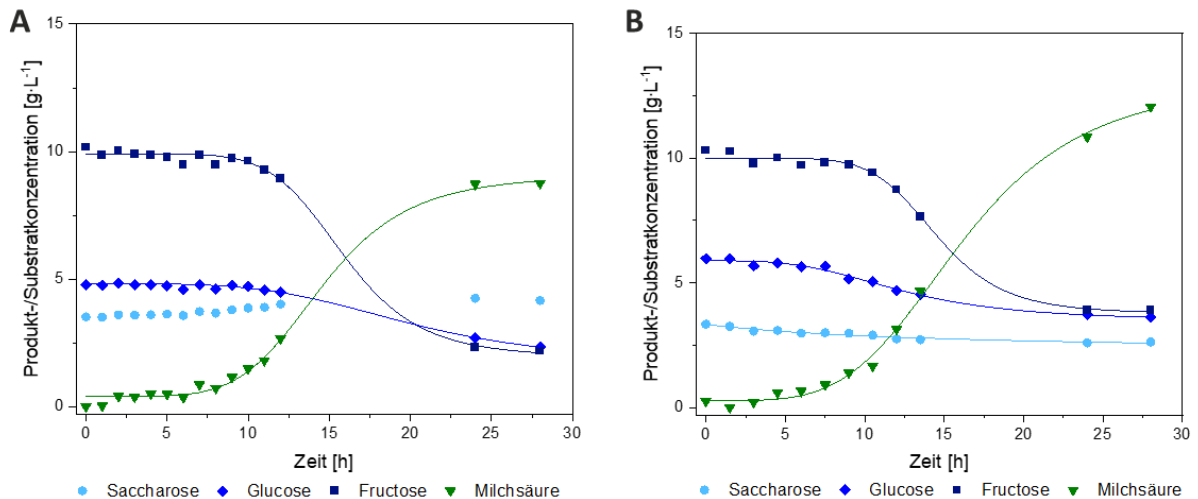


Abbildung 6: Kultivierung von *L. delbrueckii subsp. lactis* in A) Graspresssaft ohne weitere Zusätze und B) autoklaviertem Graspresssaft mit Zusatz von CaCO<sub>3</sub> in Schottflaschen. n=2, die Linien dienen als Orientierungshilfe.

Abbildung 7 A zeigt die Fermentation in Standard-Komplexmedium mit dem Zusatz von CaCO<sub>3</sub>. Im Vergleich zu einer Kultivierung in Standardmedium war die lag-Phase um ca. drei Stunden verlängert. Die Zugabe von Bestandteilen des Referenzmediums und 0,1 % Invertase bewirkte ein Angleichen lag-Phase. Auch hier war eine Steigerung der Ausbeute auf 1,85 im Vergleich zu 1,35 gMilchsäure/gGlucose zu beobachten. Die höher als theoretisch mögliche Ausbeute von 1 gMilchsäure/gGlucose. Ist erneut auf die zusätzlichen Kohlenhydrate im Presssaft zurückzuführen. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurden für einen Scale-Up der Kultivierung in Graspresssaft auf den Einsatz von Zusätzen verzichtet. Aufgrund der integrierten pH-Regulierung des Bioreaktorsystem wurde kein CaCO<sub>3</sub> verwendet. Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 7 B gezeigt.

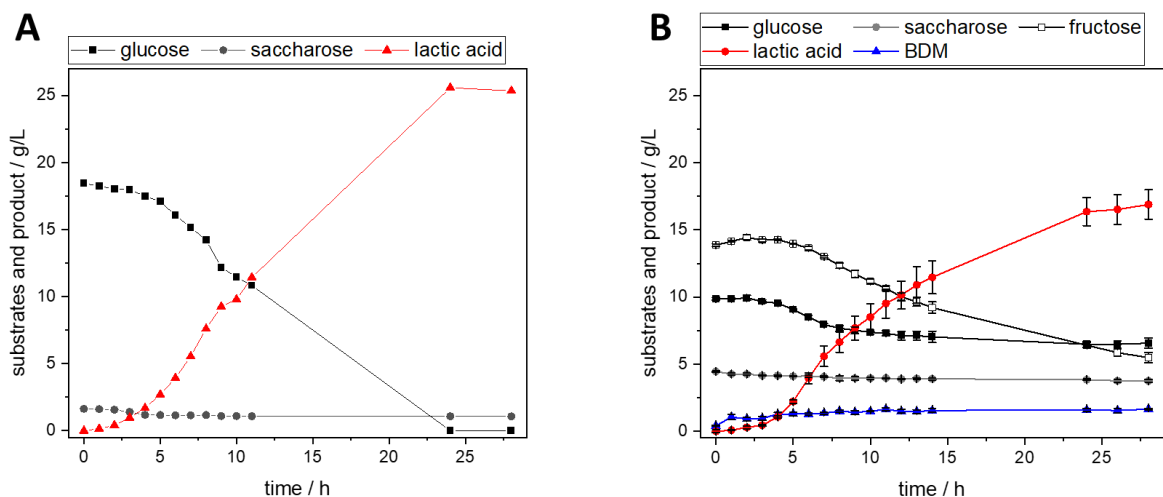


Abbildung 7: Kultivierung von *L. delbrueckii subsp. lactis* in A) Standard-Komplexmedium mit CaCO<sub>3</sub> in Schottflaschen und B) 100 % autoklaviertem Graspresssaft ohne Zusätze in einem Bioreaktorsystem. Bei Angabe von Standardabweichungen n=3, die Verbindungslinien dienen als Orientierungshilfe. Abbildung entnommen aus (Volkmar et al. 2023).

Sowohl die Milchsäurekonzentration als auch die Ausbeute konnte durch den Scale-Up im Bioreaktorsystem um 40 bzw. 7 % im Vergleich zur Kultivierung in Schottflaschen erhöht werden. Mit 16,9 g/L liegt die Milchsäurekonzentration noch unter den in Standardmedium erreichten 25 g/L, die Ausbeute ist jedoch auch hier mit der Referenzkultivierung vergleichbar. Es konnte also gezeigt werden, dass Graspresssaft ein geeignetes Fermentationsmedium für die Produktion von Milchsäure durch *L. delbrueckii* darstellt. In Tabelle 2 sind die Ausbeuten aller durchgeführten Kultivierungen aufgeführt.

Tabelle 2: Milchsäureausbeute der Kultivierungen von *L. delbrueckii* subsp. *lactis* in Standardmedium und Graspresssaft mit und ohne Zusätze. Bei Angabe von Standardabweichungen  $n=3$ , Kultivierung in Schüttelkolben falls nicht anders angegeben.

Kultivierungsbedingungen	gMilchsäure/gZucker
Komplexmedium + CaCO <sub>3</sub>	1,35
100 % Graspresssaft + CaCO <sub>3</sub>	1,27
100 % Graspresssaft mit Zusatz aller Komplexmedienbestandteile + Invertase	1,85
100 % Graspresssaft ohne Zusätze, Kultivierung in 0,4 L Rührkesselreaktor	1,36 ± 0,04

### AP 3.3 Fermentation von gentechnisch optimiertem *Ustilago maydis* zur Herstellung von Itaconsäure

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Produktion von Itaconsäure gewinnt der Organismus *Ustilago maydis* zunehmend an Bedeutung in der Biotechnologie. Seine Fähigkeit, Itaconsäure effizient zu produzieren, kombiniert mit seinem einzelligen Wachstum und seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Verunreinigungen im Medium, macht ihn zu einem überlegenen Organismus im Vergleich zum aktuell verwendeten Produktionsorganismus *Aspergillus terreus*. In diesem Kontext wurde *U. maydis* auf verschiedenen aus kommunalem Grünschnitt hergestellten Medien kultiviert. Abbildung 8 A zeigt den Kultivierungsverlauf in modifiziertem Tabuchi-Medium, dem etablierten Standard-Medium. Hierbei wurde eine Itaconsäurekonzentration von 12,18 g/L erreicht, was einer Ausbeute von  $0,28 \pm 0,02$  gItaconsäure/gGlucose entspricht. Interessanterweise führte die Supplementierung mit 70 % (v/v) Presssaft, wie in Abbildung 8 B dargestellt, zu einer noch höheren Itaconsäureproduktion von 19,18 g/L. Die Ausbeute stieg auf  $0,51$  gItaconsäure/gGlucose. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass Grünschnitt-Presssaft als Fermentationsmedium äußerst gut geeignet ist und sogar zu einer signifikanten Steigerung der Itaconsäureproduktion führen kann. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Potenziale von *Ustilago maydis* als leistungsfähigen Organismus für die industrielle Produktion von Itaconsäure und zeigen gleichzeitig die Vorteile der Verwendung von Grünschnitt-Presssaft als nachhaltiges und effektives Fermentationsmedium auf.

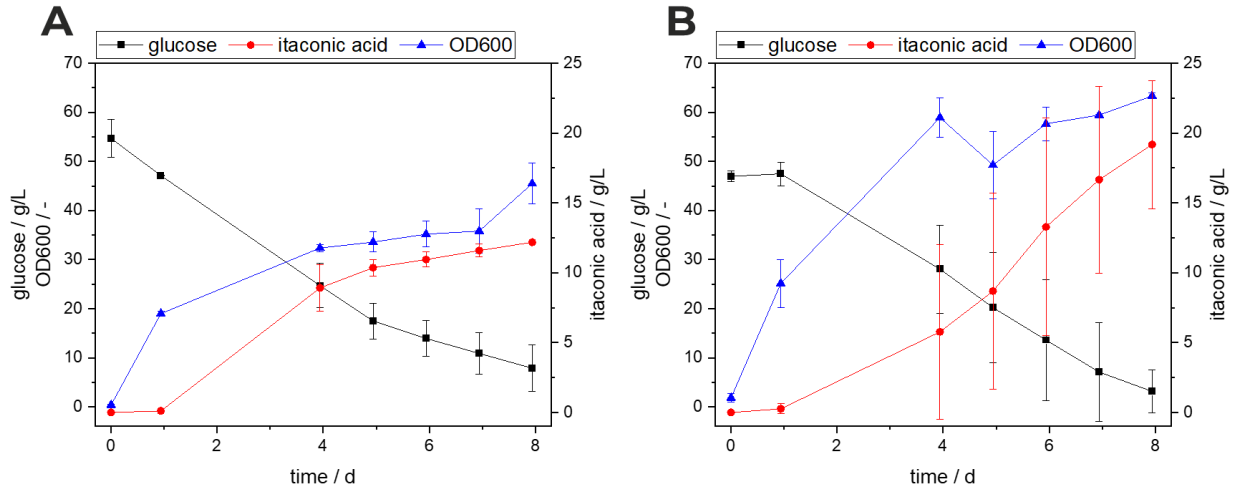


Abbildung 8: Kultivierung von *U. maydis* in A) modifiziertem Tabuchi-Standardmedium und B) modifiziertem Tabuchi-Medium mit 70 % (v/v) autoklaviertem Graspresssaft. Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen in 200 mL, n=2, die Verbindungslinien dienen als Orientierungshilfe. Abbildung modifiziert nach (Volkmar et al. 2023).

Im nächsten Schritt wurde die Verwendung von enzymatischem Hydrolysat von gemischten Holzschneitzeln nach einer Organosolv-Vorbehandlung als Medien-Zusatz untersucht. Dies ist in Abbildung 9 gezeigt. Bei einer Supplementierung des Mediums mit 20 % (v/v) Hydrolysat konnte sowohl die Itaconsäureproduktion als auch die Ausbeute auf 15,7 g/L bzw. 0,35 gItaconsäure/gZucker gesteigert werden (siehe Abbildung 9 A). Eine Erhöhung der Hydrolysatkonzentration im Medium auf 40 % (v/v) hatte eine Steigerung auf 17,2 g/L bzw. 0,40 gItaconsäure/gZucker zur Folge (siehe Abbildung 9 B)

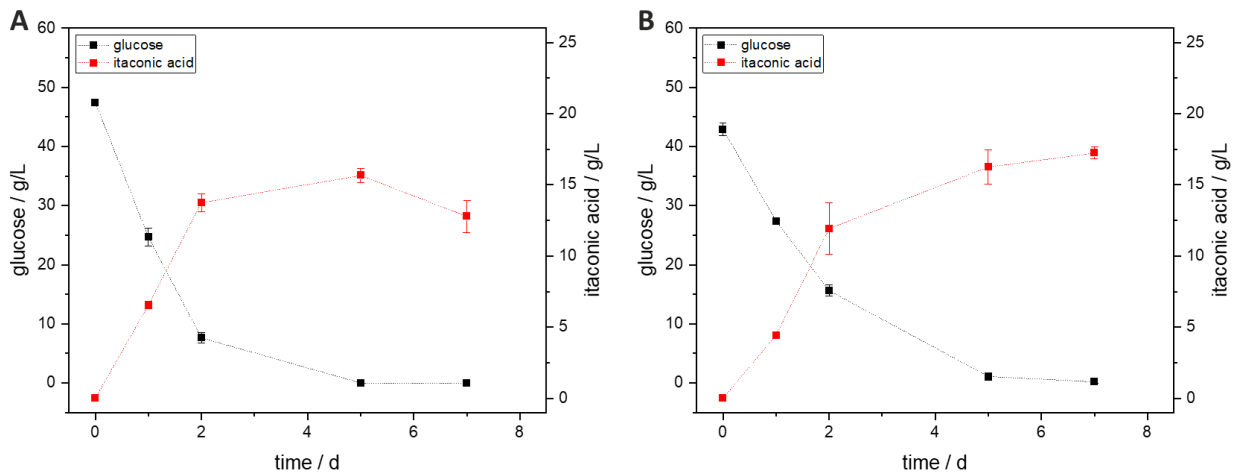


Abbildung 9: Kultivierung von *U. maydis* in modifiziertem Tabuchi-Medium mit A) 20 % (v/v) und B) 40 % (v/v) sterilfiltriertem enzymatischem Hydrolysat von gemischten Holzschneitzeln nach Organosolv-Vorbehandlung. Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen in 200 mL, n=2, die Verbindungslinien dienen als Orientierungshilfe.

Es wurden noch weitere Hydrolysat-Konzentrationen getestet, hierbei konnte jedoch kein eindeutiger Einfluss der Konzentration auf die Itaconsäureausbeute festgestellt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Itaconsäureausbeute der Kultivierungen von *U. maydis* in Standardmedium und mit verschiedenen, aus kommunalem Grünschnitt hergestellten Medienzusätzen. n=2, Kultivierung in Schüttelkolben mit Schikanen.

Kultivierungsbedingungen	$\text{gItaconsäure/gGlucose}$
Mineralsalzmedium	$0,28 \pm 0,02$
Mineralsalzmedium + 70 % (v/v) Graspresssaft	$0,51 \pm 0,00$
Mineralsalzmedium + 20 % (v/v) Hydrolysat	$0,35 \pm 0,00$
Mineralsalzmedium + 30 % (v/v) Hydrolysat	$0,42 \pm 0,06$
Mineralsalzmedium + 40% (v/v) Hydrolysat	$0,40 \pm 0,04$

Es konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* ebenfalls in der Lage ist, in Mischungen aus Wiesenschnitt-Presssaft und enzymatischem Grünschnitt-Hydrolysat ohne Zusatz von weiteren Medienkomponenten außer Glukose zu wachsen. In Vorversuchen hat sich eine Mischung zu gleichen Teilen der beiden Bestandteile als besonders geeignet erwiesen. Daher wurde ein Scale-up dieser Kombination in einem Bioreaktor mit 400 mL Medium und unterschiedlichem Rührereintrag durchgeführt. Die Ergebnisse, wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigen deutlich, dass eine steigende Rührerdrehzahl mit einer höheren Verstoffwechslung von Glucose und einer erhöhten Itaconsäurekonzentration einhergeht. Bei einer Rührerdrehzahl von 0 rpm wurde nur etwa 60 % der Glucose verbraucht und es wurden 6,8 g/L Itaconsäure produziert. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Rührerdrehzahl von 500 rpm die vorhandene Glucose nahezu vollständig verstoffwechselt. Dies führte zu einer Itaconsäurekonzentration von 16,2 g/L, was einer Ausbeute von  $0,68 \text{ gItaconsäure/gGlucose}$  entspricht. Die skalierten Versuche in einem Bioreaktor verdeutlichen somit nicht nur die Fähigkeit von *Ustilago maydis*, in dieser speziellen Medienzusammensetzung zu wachsen, sondern zeigen auch, wie verschiedene Prozessparameter die Produktionsausbeute beeinflussen können.

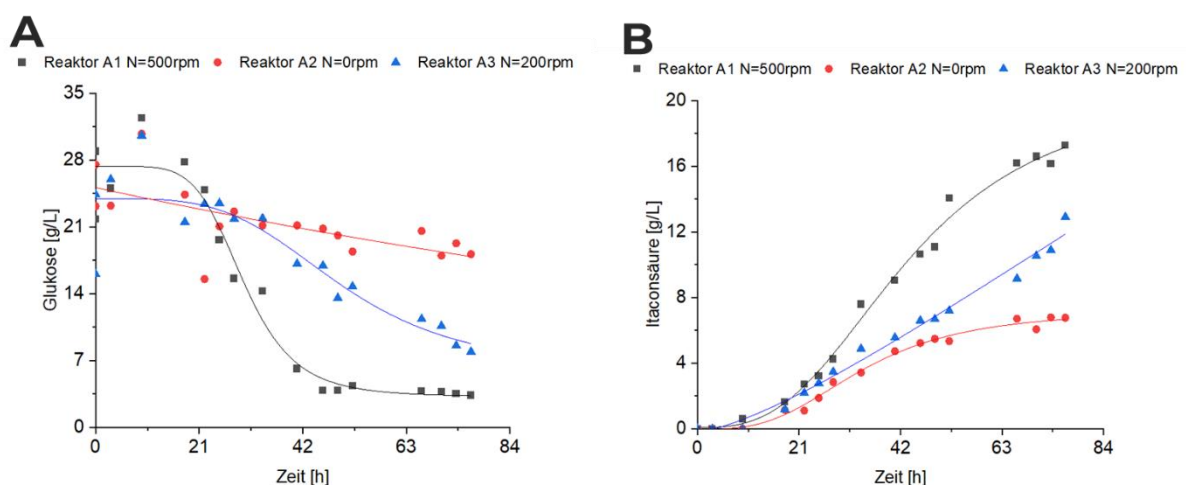


Abbildung 10: Kultivierung von *Ustilago maydis* in 50 % Wiesenschnitt-Presssaft und 50 % enzymatischem Hydrolysat von hydrothermal vorbehandeltem Grünschnitt; Kultivierung im Bioreaktor (400 mL) mit unterschiedlichem Rührereintrag, Verlauf von (A) Glukosekonzentration und (B) Itaconsäurekonzentration.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass *Ustilago maydis* die Fähigkeit besitzt, auf Basis von verschiedenen aus lignocellulosehaltiger Biomasse hergestellten Medien zu wachsen und dabei Itaconsäure zu produzieren. Die Ergebnisse des Arbeitspakets 3.2 eröffnen somit vielversprechende Perspektiven für die Nutzung von kommunalem Grünschnitt als Rohstoff für die Produktion von Plattformchemikalien. Insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung von Itaconsäure in verschiedenen Industriezweigen gewinnen diese Erkenntnisse an Bedeutung.

#### AP 3.4 Elektrodenunterstützte Fermentation von Clostridien

Für die Analytik der während der Fermentation von *C. acetobutylicum* gebildeten Produkte Aceton, Butanol, Ethanol (ABE) und Acetoin sowie des Substrates wurden zunächst geeignete Methoden mittels HPLC und GC untersucht. Aufgrund des diversen Produktspektrums wurden zahlreiche Messprotokolle getestet, um eine zuverlässige Analytik zu gewährleisten. Als am besten hat sich die gleichzeitige Analyse aller relevanter Metabolite per HPLC über eine H<sup>+</sup>-Säule Aminex HPX-87H (300x7,8 mm, Hercules, BioRad, Kalifornien, USA) mit einer Säulentemperatur von 80°C sowie 2,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer Flussrate von 0,6 mL als mobiler Phase erwiesen.

Für eine spätere Fermentation von Clostridien mit auf kommunalem Grünschnitt basierenden Medien wurde zunächst eine herkömmliche Kultivierung von *C. acetobutylicum* in Standardmedium etabliert. Eine reproduzierbare Kultivierung von Clostridien erwies sich von Beginn des Projektes an als schwierig. Daher wurde ein Fokus darauf gelegt, ein Protokoll für eine zuverlässige Kultivierung der Organismen zu etablieren. Hierbei konnten drei Kriterien festgestellt werden. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die Kryokonservierung mit Zellen durchzuführen, welche sich metabolisch an einem späten Zeitpunkt der Solventogenese befanden. Im Gegensatz zur klassischen Kryokonservierung, bei der üblicherweise Zellen in der exponentiellen Phase entnommen werden, wurden die besten Ergebnisse mit für mehr als 100 Stunden kultivierten Zellen erzielt. Eine weitere wichtige Einflussgröße ist der initiale pH-Wert der Vorkultur. Hierbei konnte gezeigt werden, dass dieser zwischen 5,0 und 6,2 liegen muss, da andernfalls kein Wachstum der Zellen möglich ist. In Abbildung 11 A ist der pH-Verlauf von unterschiedlichen Kultivierungen mit verschiedenen Start-pH-Werten gezeigt. Ein Absinken des pH-Wertes deutet auf die Produktion von Säuren während der sogenannten Acidogenese und somit einen regulären Stoffwechsel der Organismen hin. Ist keine Veränderung des pH-Wertes zu erkennen findet kein Wachstum statt. In Abbildung 11 B und C ist der Einfluss der Kultivierungsdauer der Vorkultur auf die Höhe der Butanolkonzentration in der damit inokulierten Hauptkultur dargestellt.

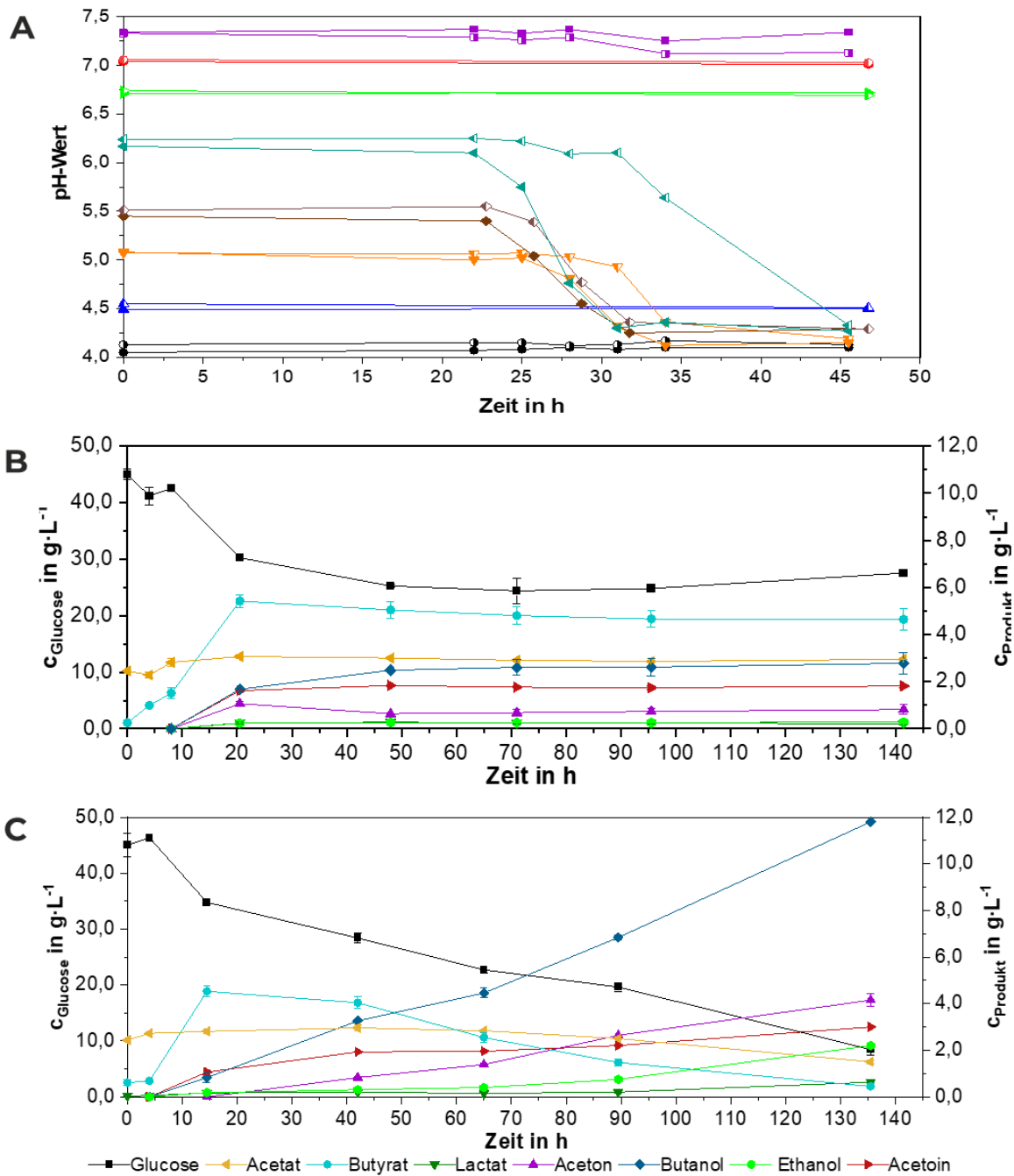


Abbildung 11: Kultivierung von *C. acetobutylicum*. A) Einfluss verschiedener initialer pH-Werte auf das Wachstumsverhalten von Vorkulturen, B) Konzentrationsverlauf von Substrat und Produkten einer Hauptkultur mit einer 26 h lang gewachsenen Vorkultur, C) Konzentrationsverlauf von Substrat und Produkten einer Hauptkultur mit einer 32 h lang gewachsenen Vorkultur

Es konnte gezeigt werden, dass eine länger gewachsene Vorkultur eine höhere Butanolkonzentration in der Hauptkultur zur Folge hat. Hierfür wurden aus einer Vorkultur nach 26, 28 und 32 Stunden ein Inokulum entnommen und damit Hauptkulturen angeimpft. Einer unter vergleichbaren Bedingungen gewachsene Vorkultur wurde nach 48 Stunden ein Inokulum entnommen. Dies ist in Abbildung 12 A gezeigt. Die in den Hauptkulturen erreichten Produktkonzentrationen sind in Abbildung 12 B dargestellt. Es ist ein Trend zu höheren Produktkonzentrationen bei längerer Kultivierungszeit der Vorkultur zu erkennen. Bei einer

Kultivierungsdauer der Vorkultur von 48 Stunden wurde eine maximale ABE-Konzentration von  $10,22 \pm 1,36$  g/L und eine Butanolkonzentration von  $7,67 \pm 0,88$  g/L in der Hauptkultur erreicht.

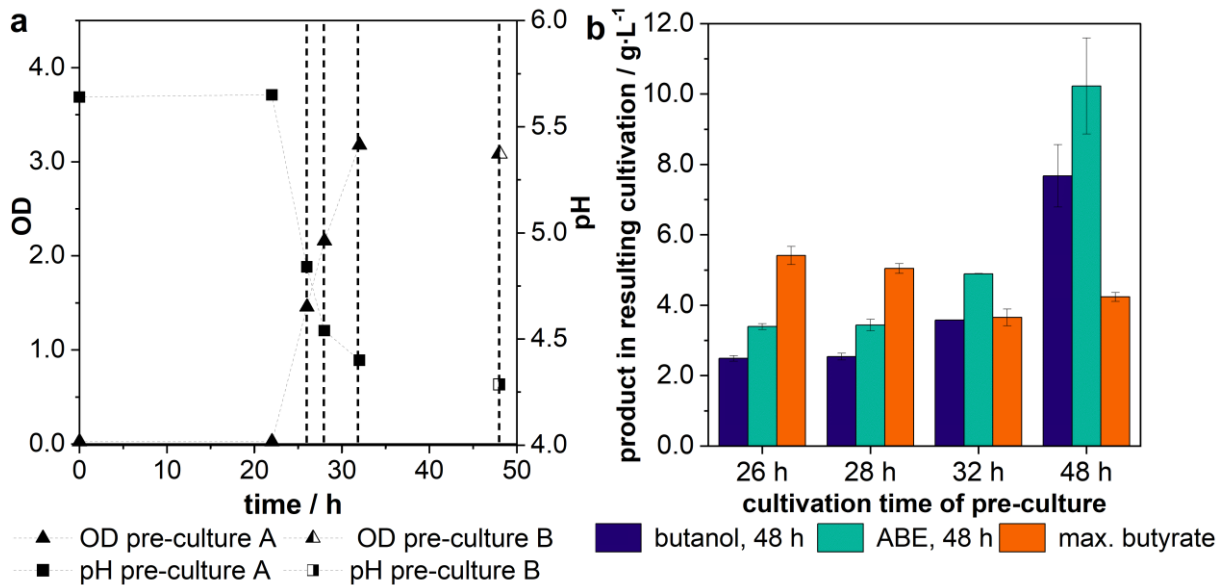


Abbildung 12: Einfluss der Kultivierungszeit der Vorkultur auf die resultierende Produktbildung in der Hauptkultur von *C. acetobutylicum* nach einer Kultivierung von 48 h. A) OD und pH der Vorkulturen die als Inokulum genutzt wurden, gestrichelte Linien kennzeichnen den Zeitpunkt der Entnahme des Inokulums; B) Butanol-, ABE- und Butyrat-Konzentration in der Hauptkultur nach 48 h, inokuliert mit Vorkulturen nach unterschiedlich langen Kultivierungszeiten. Bedingungen der Vorkultur: PY+X Medium, 50 rpm, V=100 mL, Inokulum: 1 vol%, pH<sub>0</sub>=5,5; Bedingungen der Hauptkultur: MP2opt-Medium, 50 rpm, V=150 mL, Inokulum: 10 vol%, n=2. Abbildung entnommen aus (Oehlschläger et al. 2024). Dieses optimierte Kultivierungsprotokoll wurde anschließend für die Fermentation von Grünschnittfraktionen verwendet. Zunächst wurden Kultivierungen von *C. acetobutylicum* mit einem Zusatz von 10 % autoklaviertem Presssaft aus Wiesenschnitt zum Fermentationsmedium durchgeführt. Bei einer Vergleichskultur wurde die gesamte Glucose verstoffwechselt und eine Butanolkonzentration von  $4,85 \pm 0,65$  g/L erreicht. Die supplementierte Kultur zeigt im Gegensatz dazu kein Wachstum und keine Produktbildung. Daraufhin wurde alternativ die Kultivierung mit Zusätzen von sterilfiltriertem Presssaft getestet. Dies ist in Abbildung 13 B gezeigt. Bei einer Supplementation des Standardmediums mit 30 % sterilfiltriertem Graspesssaft wurde nahezu kein Butanol gebildet. Allerdings wurden knapp 8 g/L Buttersäure produziert. Dies weist auf einen sogenannten Säuresturz hin, bei dem der Wechsel des Metabolismus von der Acidogenese zur Solventogenese nicht oder nur in geringem Maße erfolgt. Graspesssaft kann folglich als Medium zur Kultivierung von *C. acetobutylicum* sowie zur Produktion von Buttersäure verwendet werden. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass mit einer externen pH-Regulierung auch ein Säuresturz verhindert werden kann und der Presssaft in dem Fall auch zur Produktion von Butanol eingesetzt werden kann. Die Supplementation des Standardmediums mit enzymatischem Hydrolysat von hydrothermal vorbehandelten Holzschnitzeln (siehe Abbildung 13 C) resultierte in nahezu der gleichen Butanolkonzentration wie die Kultivierung in Standardmedium (Abbildung 13 A).

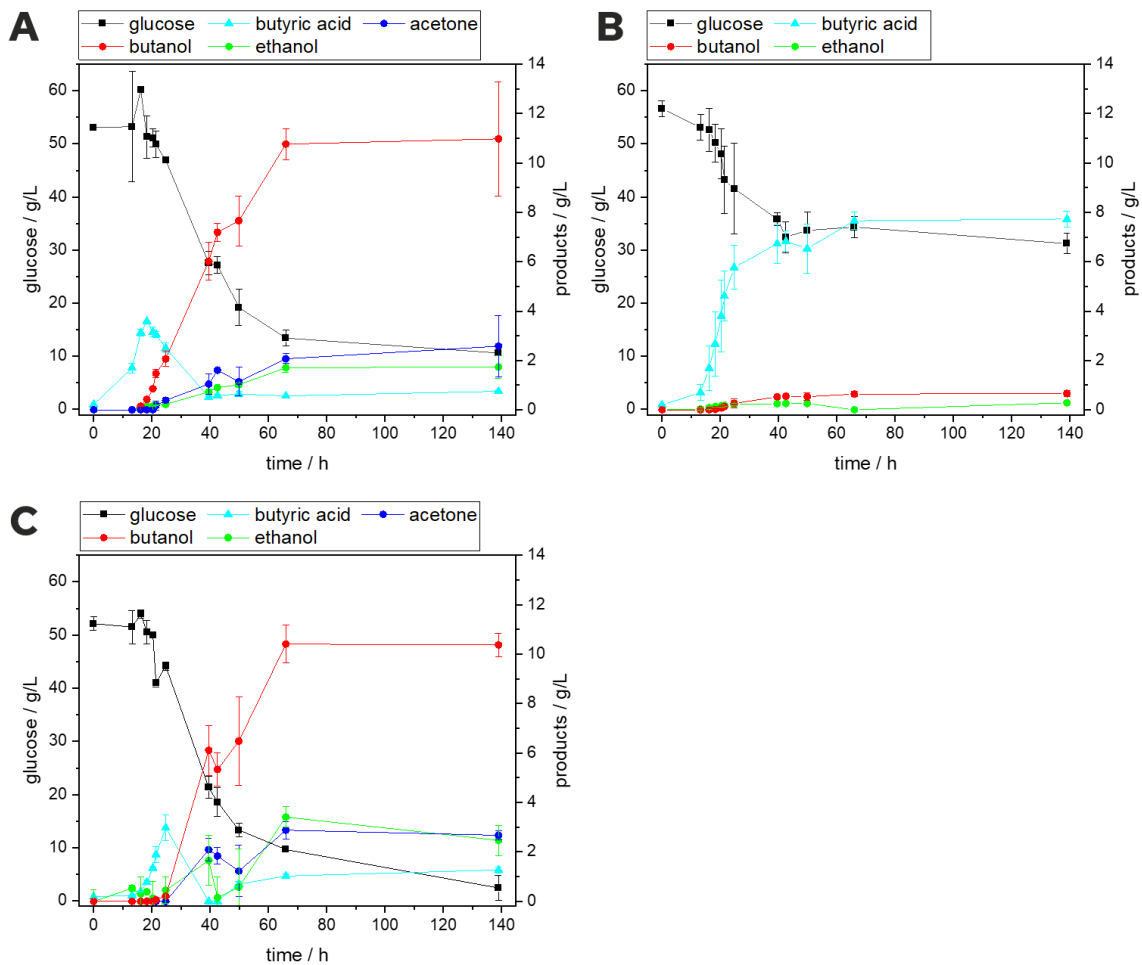


Abbildung 13: Kultivierung von *C. acetobutylicum* in (A) Standardmedium, (B) Standardmedium supplementiert mit 30 % (v/v) Graspresssaft und (C) Standardmedium supplementiert mit 30 % (v/v) enzymatischem Hydrolysat von hydrothermal vorbehandelten Holzschneitzeln; Kultivierung in 150 mL in Serumflaschen, n=2

In Tabelle 4 sind die erzielten Ausbeuten an ABE-Produkten bzw. Buttersäure für die verschiedenen getesteten Medienzusätze zusammenfassend gezeigt.

Tabelle 4: Ausbeute der ABE-Produkte für Kultivierungen von *C. acetobutylicum* in Medien mit verschiedenen aus kommunalem Grünschnitt hergestellten Zusätzen. n=2

Kultivierungsbedingungen	Ausbeute
Standardmedium	$0,34 \pm 0,11 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$
Reduziertes Standardmedium+ 5 % (v/v) Graspresssaft	$0,18 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ $0,09 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{Buttersäure}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$
Standardmedium + 30 % (v/v) Graspresssaft	$0,02 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ $0,19 \pm 0,07 \text{ g}_{\text{Buttersäure}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$
Reduziertes Standardmedium+ 30 % (v/v) Graspresssaft	$0,04 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ $0,30 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{Buttersäure}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$
Standardmedium + 30 % (v/v) Hydrolysat	$0,31 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ABE}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$

Im Hinblick für eine mögliche Elektrofermentation von *C. acetobutylicum* in Medium mit Zusätzen aus kommunalem Grünschnitt wurde der Einfluss einer angelegten Spannung auf Graspresssaft sowie das verwendete Elektrodenmaterial untersucht. Als Elektrode kam ein Kohlenstoffasergewebe ACC-5092 (Kynol, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. In einem für Elektrofermentationen etablierten H-Zell-System wurde die Elektroden für ca. 150 Stunden bei einer angelegten Spannung von -600 mV vs. Ag/AgCl in Graspresssaft und als Referenz in Mp2opt-Standardmedium inkubiert. Hierbei wurde eine deutliche Belagbildung auf der in Graspresssaft inkubierten Elektrode festgestellt. Dies ist in Abbildung 14 gezeigt. In A ist die nach dem Versuch getrocknete Elektrode zu sehen. Der rote Kreis markiert dabei die Stelle, an welcher die Kontaktierung des Platindrahtes erfolgt war. In diesem Bereich ist die Belagbildung besonders ausgeprägt. Die Abbildungen B bis E zeigen mikroskopische Aufnahmen der Kohlenstoffaserelektroden, auf B ist das Gewebe vor dem Einsatz im Versuch zu sehen. Eine Inkubation bei angelegter Spannung in Standardmedium hatte nahezu keine Belagbildung zur Folge (siehe C). Im Gegensatz dazu ist ein ausgeprägter Belag in der Nähe der Kontaktierungsstelle (siehe D) und ein ebenfalls gut erkennbarer Belag auf der restlichen Elektrode (siehe E) zu sehen.

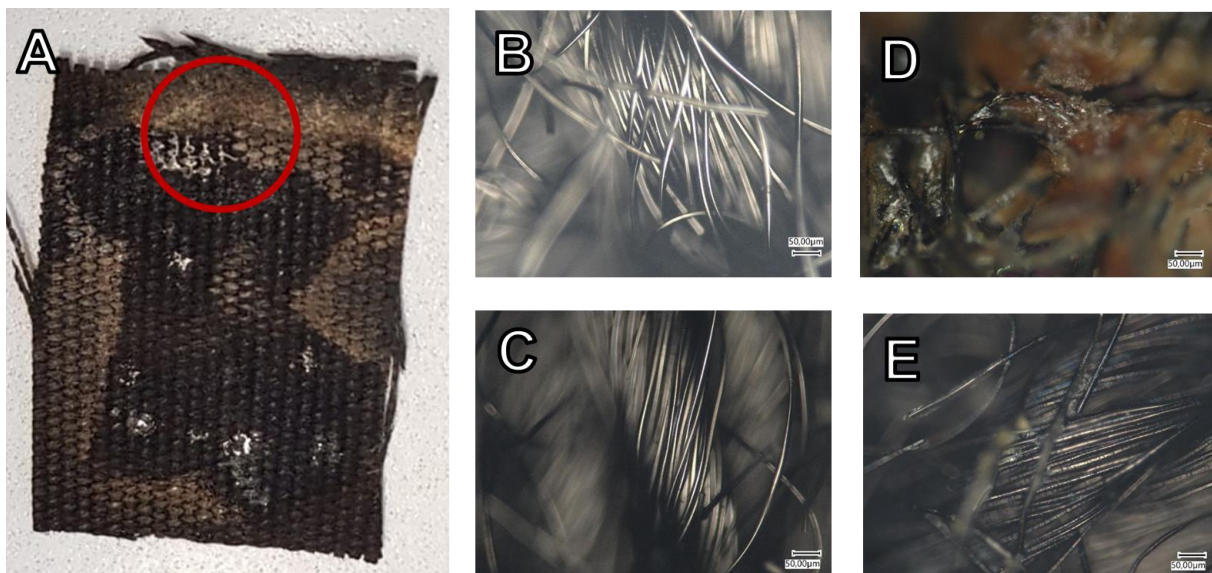


Abbildung 14: Belagbildung auf einer Kohlenstoffelektrode bei dem Anlegen einer Spannung in Graspresssaft. A) getrocknete Kohlenstoffelektrode nach 168 h in einem H-Zell-Reaktor mit 100 % Graspresssaft mit einer angelegten Spannung von -600 mV vs. Ag/AgCl, die Befestigungsstelle des Platindrahtes ist rot umkreist, die silbernen Flecken sind Überreste der Aluminiumfolie auf welcher die Elektrode getrocknet wurde; B) Kohlenstoffelektrode vor dem Versuch; C) Kohlenstoffelektrode nach Verwendung in Mp2opt-Medium (-600 mV, ca. 150 h); D) Kohlenstoffelektrode nach Inkubation in Graspresssaft mit angelegter Spannung in der Nähe der Befestigungsstelle des Platindrahtes; E) Kohlenstoffelektrode nach Inkubation in Graspresssaft mit angelegter Spannung entfernt von der Befestigungsstelle des Platindrahtes.

Die Belagbildung wirkt sich auf die Leitfähigkeit der Elektroden aus. In Abbildung 15 ist die Stromantwort im H-Zell-System für die Kontrolle in Standardmedium und den Versuch in Graspresssaft zu sehen. Die niedrige Stromantwort beim Einsatz von Presssaft ist auf eine Erhöhung des Widerstands durch den Belag auf den Elektroden zurückzuführen. Gemäß einer EDX-Analyse des Belags besteht dieser hauptsächlich aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Kalzium, Kalium und Phosphor. Die Zusammensetzung des Presssaftes ändert sich durch die angelegte Spannung jedoch nicht nachweislich.

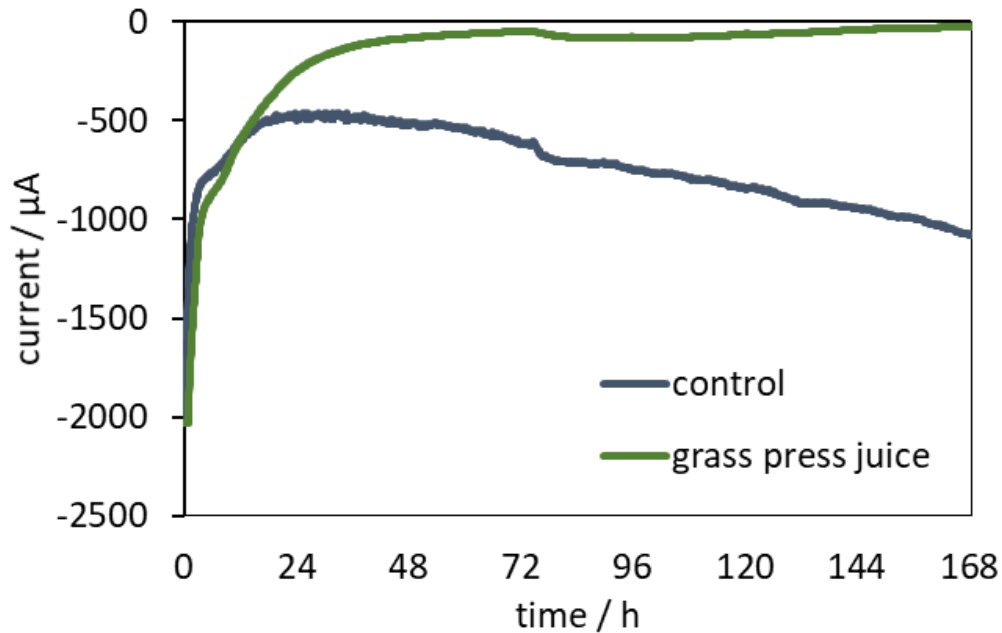


Abbildung 15: Stromantwort über den Verlauf der Zeit in einem H-Zell-Reaktor mit 100 % Graspresssaft (grüne Kurve) und Standardmedium (blaue Kurve) bei einer angelegten Spannung von -600 mV vs. Ag/AgCl unter Verwendung von Kohlenstofffaser-Elektroden

Der erhöhte Widerstand im elektrochemischen System aufgrund der Belagbildung durch Ablagerungen des Presssaftes auf den Kohlenstofffasergeweben der Elektroden wirkt sich negativ auf eine Elektrofermentation aus. Für eine erfolgreiche Elektrofermentation ist dieses Problem priorisiert zu lösen. Mögliche Ansatzpunkte hierfür wäre eine Vorbehandlung des Presssaftes oder die Verwendung eines anderen Elektrodenmaterials.

### Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Neben den wissenschaftlichen Mitarbeitenden wurden im Rahmen des Projekts studentische Hilfskräfte beschäftigt. Deren Unterstützung war insbesondere für die Produktion von Graspresssaft und die weiteren, aus kommunalem Grünschnitt abgeleiteten Fermentationsmedien und die Durchführung der Fermentationen erforderlich. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Medien war die Anschaffung einer Vorsäule für die HPLC erforderlich, um die Trennsäule vor einem vorzeitigen Verschleiß durch Verunreinigungen zu schützen. Das anaerobe Arbeiten mit Clostridien erforderte den Einsatz von Serumflaschen, welche mit Butyl-Septen und Alu-Bördelkappen verschlossen werden sowie die Probenahme mit Spritzen und Kanülen. Zur Sterilisation der Fermentationsmedien war der Einsatz von Vakuumfiltrationseinheiten notwendig. Für die Prozessüberwachung der Kultivierungen ist die Messung des Sauerstoffgehalts und des pH-Wertes essentiell, wofür eine Gelöstsauerstoffelektrode und eine pH-Elektrode beschafft wurde. Die Forschungsergebnisse wurden im Rahmen von Projekttreffen sowie nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert und diskutiert. Dieser wissenschaftliche Austausch ist essentiell für den Fortschritt innerhalb der Forschung.

## **Notwendigkeit der geleisteten Projektarbeiten**

Der Grundstein für die Verwertung von kommunalem Grünschnitt ist die Vorbehandlung des Ausgangsmaterials. Daher lag der Fokus zu Beginn der Arbeiten auf dem Finden einer geeigneten Vorbehandlungsmethode, um die Durchführung der weiteren Arbeitspakete zu ermöglichen. Die im Projektplan in Arbeitspaket 2 vorgesehene Fraktionierung der aus Grünschnitt gewonnenen Aminosäuren wurde nicht durchgeführt, da sich während der Analyse des Ausgangsmaterials herausgestellt hatte, dass dies aufgrund der geringen Aminosäurekonzentration im Rohstoff nicht wirtschaftlich gewesen wäre. Die hierfür eingeplanten Projektmonate wurden unter anderem für die Durchführung einer enzymatischen Hydrolyse der enthaltenen Proteine zur Steigerung des Aminosäuregehalts eingesetzt. Nachdem auch hierdurch die Konzentration nicht ausreichend erhöht werden könnte, wurde auf eine Fraktionierung verzichtet. Die restlichen für Arbeitspaket 2 eingeplanten Projektmonate wurden für die Durchführung der Fermentationsversuche eingesetzt. Insbesondere die notwendige Etablierung eines Kultivierungsprotokolls für Clostridien nahm mehr Zeit ein als ursprünglich eingeplant.

## **Verwertbarkeit des Ergebnisses**

Im Sinne des fortgeschriebenen Verwendungsplanes wurde auf Basis der in diesem Projekt erlangten Ergebnisse ein Nachfolgeantrag gestellt. In dem geplanten Projekt soll ein Scale-Up der Presssaftproduktion sowie der Fermentationen mit den Organismen *Cupriavidus necator*, *Ustilago maydis* und Clostridien in den technischen Maßstab durchgeführt werden. Der Nachfolgeantrag wurde bereits bewilligt, der Projektstart war am 01.04.2024.

## **Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Generell gibt es nur wenige Veröffentlichungen über die Verwendung von klassischem Grünschnitt als Grundlage für Fermentationsmedien. Häufiger wird von der Nutzung von Grassilage berichtet. Hierzu veröffentlichten beispielsweise Steinbrenner et al. eine Studie über die Änderung der Silierungsbedingungen für die gleichzeitige Produktion von Buttersäure und Methan aus Gras (Steinbrenner et al. 2022). Marketta Rinne fasste die Nutzung von siliierter Biomasse als Rohstoff für grüne Bioraffinerien in einem umfassenden Review zusammen (Rinne 2024).

Sakarika et al. veröffentlichten ein Paper in welchem die erfolgreiche Nutzung von Graspresssaft für die mikrobielle Produktion von Capronsäure beschrieben ist (Sakarika et al. 2023). Der Presssaft wurde dabei ebenfalls durch eine Schneckenpresse gewonnen. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Arbeiten wurde eine nicht-axenische Kultur durchgeführt und der Presssaft nicht sterilisiert. De Souza et al. verwendeten geschnittenes Straßenbegleitgrün mit Erfolg als Rohstoff für die anaerobe Gärung (Schoeters et al. 2023). Santamaría-Fernández et al. setzten Alfalfa-Presssaft als Nährstoffquelle für Fermentationen von verschiedenen Lactobazillen ein (Santamaría-Fernández et al. 2020).

## **Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF**

Der Schlussbericht für das Teilprojekt B wird in elektronischer Form an die TIB übermittelt und der Projektträger über den Versand informiert. Der Bericht ist nicht als vertraulich einzuordnen.

## Im Rahmen des Forschungsprojekts entstandene Veröffentlichungen

- Langsdorf, M. Volkmar, D. Holtmann, R. Ulber; Material utilization of green waste – A review on potential valorisation methods; *Bioresour. Bioprocess.* 8, 19 (2021); DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00367-5>
- L. Varriale, M. Volkmar, J. Weiermüller, R. Ulber; Effects of Pretreatment on the Biocatalysis of Renewable Resources. *Chemie Ingenieur Technik* (2022); DOI: <https://doi.org/10.1002/cite.202200137>
- A. Langsdorf, A-L. Drommershausen, M. Volkmar, R. Ulber, D. Holtmann; Fermentative alpha-Humulene Production from Homogenized Grass Clippings as a Growth Medium; *Molecules* 2022, 27, 868; <https://doi.org/10.3390/molecules27248684>
- Langsdorf, M. Volkmar, R. Ulber, F. Hollmann, D. Holtmann; Peroxidases from grass clippings for the removal of phenolic compounds from wastewater. *Bioresource Technology Reports* (2023), <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101471>
- M. Volkmar, A.-L. Maus, M. Weisbrodt, J. Bohlender, A. Langsdorf, D. Holtmann, R. Ulber; Municipal green waste as substrate for the microbial production of platform chemicals. *Bioresour. Bioprocess.* (2023), DOI: 10.1186/s40643-023-00663-2
- K. Oehlenschläger, M. Volkmar, J. Stiefelmaier, A. Langsdorf, D. Holtmann, N. Tippkötter, R. Ulber; New insights into the influence of pre-culture on robust solvent production of *C. acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*(2024). <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12981-8>

## Literaturverzeichnis

Oehlenschläger, Katharina; Volkmar, Marianne; Stiefelmaier, Judith; Langsdorf, Alexander; Holtmann, Dirk; Tippkötter, Nils; Ulber, Roland (2024): New insights into the influence of pre-culture on robust solvent production of *C. acetobutylicum*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 108 (1), S. 143. DOI: 10.1007/s00253-023-12981-8.

Rinne, Marketta (2024): Novel uses of ensiled biomasses as feedstocks for green biorefineries. In: *Journal of animal science and biotechnology* 15 (1), S. 36. DOI: 10.1186/s40104-024-00992-y.

Sakarika, Myrsini; Regueira, Alberte; Rabaey, Korneel; Ganigué, Ramon (2023): Thermophilic caproic acid production from grass juice by sugar-based chain elongation. In: *The Science of the total environment* 860, S. 160501. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.160501.

Santamaría-Fernández, M.; Schneider, R.; Lübeck, M.; Venus, J. (2020): Combining the production of L-lactic acid with the production of feed protein concentrates from alfalfa. In: *Journal of biotechnology* 323, S. 180–188. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.08.010.

Schoeters, Floris; Thoré, Eli S.J.; Cuyper, Audrey de; Noyens, Isabelle; Goossens, Sarah; Lybaert, Sander et al. (2023): Microalgal cultivation on grass juice as a novel process for a green biorefinery. In: *Algal Research* 69, S. 102941. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102941.

Steinbrenner, Jörg; Mueller, Joachim; Oechsner, Hans (2022): Combined Butyric Acid and Methane Production from Grass Silage in a Novel Green Biorefinery Concept. In: *Waste Biomass Valor* 13 (4), S. 1873–1884. DOI: 10.1007/s12649-021-01626-4.

Volkmar, Marianne; Maus, Anna-Lena; Weisbrodt, Martin; Bohlender, Jonathan; Langsdorf, Alexander; Holtmann, Dirk; Ulber, Roland (2023): Municipal green waste as substrate for the microbial production of platform chemicals. In: *Bioresources and bioprocessing* 10 (1), S. 43. DOI: 10.1186/s40643-023-00663-2.