

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur
autotrophen Herstellung von Alkoholen mit
*Clostridium carboxidivorans***

Kathrin Gertrude Doll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. habil. Andreas Kremling

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 16.05.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 17.09.2018
angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte!

Zunächst möchte ich Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit dieses spannende und hochaktuelle Thema bearbeiten zu dürfen danken. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die konstruktiven Anregungen und Diskussionen sowie die mir zur Verfügung stehenden Freiräume bei der Bearbeitung des Projektes.

Bei dem Coreferenten Prof. Dr. Wolfgang Liebl und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling möchte ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe bedanken.

Den Projektpartnern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm, Herrn Prof. Dr. Peter Dürre und Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns, sowie dem Projektpartner des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart, Herrn Prof. Dr. Ralf Takors, danke ich für die gute Zusammenarbeit im Verbundprojekt und angenehme und konstruktive Diskussionen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung des Forschungsvorhabens.

Ich bedanke mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Anna Groher, Christina Kantzow und Harald Krispin für die theoretische und praktische Einarbeitung in das Thema. Alexander Mayer und Peter Riegler möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Projekt danken. Danke an Timm Severin bei der Unterstützung mit MATLAB.

Alexander Mayer, Anton Rückel, und Peter Riegler möchte ich für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an die Festangestellten Ellen Truxius, Gabriele Herbrik, Georg Kojro, Markus Amann, Marlene Schocher und Norbert Werth.

Bei den Studenten und Studentinnen Andrei Hutanu, Anton Rückel, Dominik Kroiß, Ecem Samer, Franziska Kratzl, Giulia Heiß, Maximilian Wende, Peter Kämpf, Sebastian Jarosch und Stefan Mayrhuber bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung in vielfältiger Weise.

Meiner Familie danke ich für die vollste Unterstützung zu jeder Zeit. Meinem Partner Stephan danke ich für sein Verständnis, die Motivation und den Rückhalt über die gesamte Zeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Acetogene Mikroorganismen.....	7
3.1.1	Autotropher Metabolismus	7
3.1.2	Heterotropher Metabolismus	9
3.1.3	Energiegewinnung	10
3.1.4	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	11
3.1.5	Produktbildung und Produktinhibierung.....	13
3.1.6	Medienbestandteile	21
3.2	Stofftransport gas-flüssig.....	22
3.3	Reaktoren für die Gasfermentation	27
3.4	Bioprozesstechnische Grundlagen.....	34
3.4.1	Bilanzierung im idealen Rührkesselreaktor	34
3.4.2	Kinetik von Wachstum und Produktbildung	35
3.4.3	Satzbetrieb im Rührkesselreaktor	37
3.4.4	Kontinuierliche Prozessführung im Rührkesselreaktor	38
4	Material und Methoden	40
4.1	Anaerobes Arbeiten	40
4.2	Medienherstellung.....	41
4.3	Kultivierung von <i>Clostridium carboxidivorans</i>	42
4.3.1	Stammhaltung.....	42
4.3.2	Vorkulturherstellung	43
4.3.3	Satzkultivierung im Rührkesselreaktor	43
4.3.4	Kaskadenkultivierung im Rührkesselreaktor.....	45
4.3.5	Parallelkultivierungen in Anaerobflaschen.....	49
4.4	Analytische Methoden.....	50
4.4.1	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration....	50

4.4.2	Produktbestimmung mittels HPLC	51
4.4.3	Abgasanalytik zur Bestimmung von Gasaufnahme- raten	51
4.4.4	Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungs- raten und Ausbeuten	53
4.4.5	Bestimmung der CO-Inhibierungskinetik	56
5	Parameterstudien im Satzprozess	57
5.1	Referenzprozess	57
5.2	Untersuchungen zur Produktinhibierung	63
5.3	Verwertung verschiedener Gasmischungen	67
5.3.1	Verwertung der Gaskomponenten H ₂ , CO und CO ₂	68
5.3.2	CO-Partialdruck p _{CO}	73
5.4	Satzverfahren mit pH-Kontrolle	85
5.5	Variation von Medienbestandteilen	92
5.5.1	Hefeextrakt	92
5.5.2	Spurenelemente	101
5.6	Temperatur	112
6	Kontinuierliche Gasfermentation in Rührkesselreak- toren	122
6.1	Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren	122
6.2	Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren mit erhöhter hydraulischer Verweilzeit	134
7	Zusammenfassung und Ausblick	141
8	Literaturverzeichnis	147
9	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	159
10	Anhang	162
10.1	Untersuchungen zur erhöhten Fe ²⁺ -Konzentration in der Rührkesselkaskade	162
10.2	Untersuchungen zu Verdunstung	163
10.3	Medienzusätze und Puffer	164
10.4	Verwendete Chemikalien und Materialien	166
10.5	Verwendete Geräte	169

1 Einleitung

Erdöl und Erdgas werden aktuell zur Energie- und Treibstoffgewinnung sowie zur Herstellung von Plattformchemikalien in der chemischen Industrie verwendet. Durch die Verbrennung dieser fossilen Energieträger entstehen jedoch hohe Emissionen an CO₂ sowie anderen Treibhausgasen, welche für den globalen Klimawandel verantwortlich gemacht werden. Dies zwingt die Industrie zu einem Umdenken bei der Gewinnung von Kraftstoffen und Energie, zumal auch die fossilen Ressourcen endlich sind. Das bisher wichtigste Instrument der internationalen Klimapolitik stellt das "Kyoto-Protokoll" dar, bei dem sich die Industrieländer verpflichteten, im Zeitraum von 2008 bis 2012 die eigenen Treibhausgasemissionen um mindestens 5 % zu reduzieren und weiterhin zu senken (Bundesregierung 2018a). An Stelle des Kyoto-Protokolls soll ab 2020 ein neues Klimaschutzabkommen in Kraft treten, welches auf der UN-Klimakonferenz 2012 in Doha beschlossen wurde. Die EU sowie weitere Industrieländer unterzeichneten für diese zweite Verpflichtungsperiode, den eigenen CO₂-Ausstoß bis 2020 um 18 % im Vergleich zu 1990 zu senken (Bundesregierung 2018b). Intensive Bemühungen von Industrie und Wissenschaft haben es sich daher zur Aufgabe gemacht, Strategien zur Reduktion von Treibhausgasen zu finden und Alternativen zu fossilen Rohstoffquellen zu suchen.

Vielversprechende Lösungsansätze könnten hier die Nutzung nachwachsender Kohlenstoffquellen zur Herstellung von Treibstoffen in Form von Biokraftstoffen sein. Dabei werden vor allem Zuckerrohr, Mais oder auch Pflanzenöle als Rohstoffe verwendet, welche einen Beitrag zur CO₂-Reduktion in der Atmosphäre führen, da beim Wachstum dieser Pflanzen über Photosynthese zunächst hohe Mengen an CO₂ aus der Atmosphäre fixiert werden. Die aus diesen Rohstoffen hergestellten Biokraftstoffe (vor allem Bioethanol) werden als Biokraftstoffe der ersten Generation bezeichnet. Jedoch stehen diese Einsatzstoffe in direkter Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion und führten zur sogenannten "Teller-Tank" Diskussion (Ajanovic 2011; Rathmann et al. 2010; Naik et al. 2010). Daher ist man dazu übergegangen, überschüssige pflanzliche Abfallbiomasse aus Land- und Forstwirtschaft anstelle von Nutzpflanzen als Rohstoffe zur Biokraftstoffherstellung einzusetzen, um dieser Problematik zu entgehen. Die Treibstoffe aus lignozellulosehaltigen Kohlenstoffquellen werden dabei als Biokraftstoffe der zweiten Generation bezeichnet und werden durch enzymatischen Aufschluss dieser Abfallbiomasse in Zuckermonomere mit anschließender Gärung gewonnen (Naik et al. 2010).

Alternativ zum enzymatischen Aufschluss der Abfallbiomasse in Zucker kann eine Vergasung der Biomasse in sogenanntes Synthesegas erfolgen, welches sich größtenteils aus den Gasen Kohlenstoffmonoxid, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zusammensetzt (Tirado-Acevedo et al. 2010; Li et al. 2010). Synthesegas fällt auch in der Stahl- und Kohleindustrie in großen Mengen an (Redl et al. 2017). Neben der klassischen Verwertung des Synthesegases in der Fischer-Tropsch-Synthese zur Herstellung von Kohlenwasserstoffen (Davis 2009) könnte die mikrobielle Nutzung von Synthesegasen durch "Gasfermentation" zur Herstellung von Biokraftstoffen und auch Chemikalien herangezogen werden. Gegenüber der Verwertung lignozellulosehaltiger Rohstoffe in Zuckermomere leistet die Gasfermentation einen aktiven Beitrag zur Reduktion der CO₂-Emissionen. Zudem liegt eine hohe Rohstoffflexibilität zur Gewinnung des gasförmigen Substrates vor (Schiel-Bengelsdorf und Dürre 2012).

Acetogene Mikroorganismen (Acetogene) sind in der Lage über ihren zentralen Stoffwechselweg, den Acetyl-CoA-Weg, Synthesegas als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten und dabei stammabhängig unter anderem Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol oder 2,3-Butandiol zu bilden (Schiel-Bengelsdorf und Dürre 2012; Henstra et al. 2007). Die Produkte Ethanol und Butanol sind als Biokraftstoffe interessant. Genetische Modifikationen der Bakterienstämme könnten diese Mikroorganismen neben der Biokraftstoffherstellung auch als Plattformorganismen zur Produktion unterschiedlichster Chemikalien nutzbar machen. (Köpke et al. 2010).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Zur Kraftstoffproduktion und der Herstellung von Chemikalien werden fossile Rohstoffe verwendet. Bei der Nutzung fossiler Rohstoffe werden jedoch hohe Mengen an Treibhausgasen, vor allem CO₂, freigesetzt mit negativen Effekten für das globale Klima. Zudem sind diese fossilen Rohstoffe in nur begrenzter Menge verfügbar (Busch et al. 2006). Daher hat das Interesse an der Produktion von Chemikalien und Kraftstoffen aus alternativen Rohstoffquellen in den letzten Jahren stark zugenommen. Die Gasfermentation bietet hierbei ein großes Potenzial. Bei der Gasfermentation können kohlenstoffmonoxid- kohlenstoffdioxid- und wasserstoffhaltige Abfallgase der Industrie (Synthesegas) direkt als Substrate zur mikrobiellen Herstellung relevanter Produkte dienen (Acharya et al. 2015). Somit kann das Synthesegas einer höheren Wertschöpfung zugeführt werden und liefert aktiv einen Beitrag zur Reduktion des Ausstoßes von Treibhausgasen. Auch aus der Vergasung von pflanzlichen Abfallstoffen gewonnenes Synthesegas kann als Substrat für die Gasfermentation herangezogen werden. Bei den für die Gasfermentation nutzbaren Mikroorganismen handelt es sich um acetogene Mikroorganismen, die über ihren zentralen Stoffwechselweg die Gase H₂, CO, und CO₂ zum Aufbau von Biomasse und ihrer Produktbildung verwerten können (Redl et al. 2017). Natürlicherweise können diese Mikroorganismen zur Bildung von industriell interessanten Produkten befähigt sein wie zum Beispiel Acetat, 2,3-Butandiol und Ethanol, wobei erstere wichtige Grundchemikalen darstellen und Ethanol als Biokraftstoff verwendet werden kann (Schiel-Bengelsdorf und Dürre 2012; Daniell et al. 2012). Mittlerweile beschäftigen sich erste Firmen wie Coskata, INEOS Bio und insbesondere LanzaTech mit der Gasfermentation (Liew et al. 2016).

Clostridium carboxidivorans ist ein obligat anaerobes Acetogen. Sein breites Produktspektrum, insbesondere die Fähigkeit zur Bildung längererkettiger Produkte aus gasförmigen Substraten macht es zu einem interessanten Mikroorganismus für die Gasfermentation (Ramachandriya et al. 2013; Phillips et al. 2015). Besonders die gebildeten Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol sind dabei industriell relevant. Ethanol kann vor allem als Biokraftstoff eingesetzt werden (Abubackar et al. 2011). Auch Butanol wird neben seiner klassischen Verwendung als Lösemittel und Grundchemikalie für die Butylacrylat- und Methacrylatherstellung aufgrund seiner Eigenschaften (höherer Energieinhalt als Ethanol, geringe Flüchtigkeit, geringe Korrosivität) auch als potentieller Kraftstoff angesehen (Liu et al. 2013). Hexanol findet in der pharmazeutischen Industrie sowie Textil- und Kosmetikindustrie Verwendung und könnte auch als Additiv von Kraftstoffen dienen (Fernández-Naveira et al. 2017b). Der jährliche Bedarf an diesen

Alkoholen ist hoch. Für Ethanol liegt dieser mittlerweile bei 75 Millionen Tonnen pro Jahr mit steigender Tendenz; die jährliche Produktion von Butanol beträgt 4,5 Millionen Tonnen (Neugebauer 2017). Für Hexanol wird der Bedarf aktuell mit 200 000 Tonnen pro Jahr beziffert (SBIR STTR 2017). Die erzielten Produktkonzentrationen bei der mikrobiellen Verwertung von gasförmigen Substraten (Chemolithoautotrophie) sind jedoch bisher relativ gering und daher sind Gasfermentationsprozesse industriell noch nicht verbreitet, auch wenn sie gegenüber chemischen Prozessen den Vorteil von milden Reaktionsbedingungen, also moderate Temperaturen und Drücke haben (Munasinghe und Khanal 2010; Liew et al. 2016). Dies hat mehrere Ursachen. Zum einen sind die erzielten Biokatalysatorkonzentrationen (Biotrockenmassekonzentrationen) autotropher Prozesse gering (Liew et al. 2013; Acharya et al. 2015). Zum anderen werden die Alkohole als Zielprodukte zu einem großen Teil erst in der späteren Phase von Satzprozessen (solventogene Phase) aus den zuvor während des Wachstums produzierten Säuren (acidogene Phase) hergestellt (Ukpong et al. 2012). Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, die finalen Konzentrationen der Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol mit *C. carboxidivorans* zu erhöhen und die Säurekonzentrationen als unerwünschte Nebenprodukte gering zu halten. Dazu sollen im vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Satzverfahren Reaktionsbedingungen identifiziert werden, welche selektiv die Alkoholbildung mit diesem Mikroorganismus begünstigen.

Unter pH unkontrollierten Bedingungen führt das biphasische Verhalten in Satzprozessen zu einem pH-Abfall gefolgt von einem pH-Anstieg (Acharya et al. 2015). Die Einteilung eines Fermentationsprozesses in Acidogenese und Solventogenese ist dabei für *Clostridien* wie *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* und *C. autoethanogenum* bekannt (Liew et al. 2013; Kundiyana et al. 2011; Phillips et al. 1993). Dieses Verhalten beschränkt jedoch den zeitlichen Rahmen für die Alkoholbildung und die Kapazität der erreichbaren Alkoholkonzentrationen in Satzprozessen enorm und führt schlussendlich zu geringen Raum-Zeit-Ausbeuten. Hohe-Raum-Zeit-Ausbeuten sind jedoch für die Herstellung von Massenprodukten zwingend notwendig (Chmiel 2011). Ein Lösungsansatz zur Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeuten und damit der Produktivität ist der Wechsel vom Satzbetrieb in den kontinuierlichen Betrieb. In einigen Arbeiten mit anderen acetogenen Mikroorganismen wurde diese Betriebsweise angewandt (Mohammadi et al. 2012; Acharya et al. 2017; Lee et al. 2008b). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher die Gestaltung eines kontinuierlichen Prozesses zur effizienten Alkoholbildung mit *C. carboxidivorans* im vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor, wobei hierzu auch

die Erkenntnisse zur bevorzugten Alkoholbildung aus Satzprozessen genutzt werden sollen.

Eine kontinuierliche Begasung mit ausreichend gasförmigen Substraten im Synthesegas ist essentiell für die Gasfermentation, da hier aufgrund der geringen Wasserlöslichkeiten von Wasserstoff und Kohlenstoffmonoxid oftmals von Stofftransportlimitierungen von der Gas- in die Flüssigphase ausgegangen werden muss (Bredwell et al. 1999; Liew et al. 2016). Eine gängige Methode zur Erhöhung der Löslichkeit stellt die Erhöhung der Partialdrücke der einzelnen Gase dar (Najafpour und Younesi 2006; Hurst und Lewis 2010; Kantzow und Weuster-Botz 2016). Diese Partialdruckerhöhung kann jedoch wiederum Einfluss auf Produktbildung und die Verteilung des Produktspektrums zur Folge haben. Beispielsweise verringerten sich bei Erhöhung des Wasserstoffpartialdrucks von 0,4 bar auf 2,1 bar mit *Acetobacterium woodi* die erzielten Acetatkonzentrationen, während die Formiatkonzentration als unerwünschtes Nebenprodukt um ein Vielfaches anstieg (Kantzow und Weuster-Botz 2016). Unterschiedlich angelegte Wasserstoffpartialdrücke führten mit *Clostridium acetobutylicum* zu einer Erhöhung der Ausbeuten von Ethanol und Butanol, während die des Acetons geschmälert wurde. Auch können negative Effekte der Gaskomponenten auf das Wachstum (inhibierende Effekte) auftreten. Für *C. ljungdahlii* wird beispielsweise das Ausbleiben des Wachstums bei einem Kohlenstoffmonoxidpartialdruck von 0,743 bar angegeben (Mohammadi et al. 2014). Allerdings kann der Anteil des Kohlenstoffmonoxids je nach Synthesegas mit einem geringen Anteil von nur 5 % bis hin zu 60 % stark variieren (Liew et al. 2013; Mondal et al. 2011; Tirado-Acevedo et al. 2010), was im Falle höherer Konzentrationen das Auftreten inhibierender Effekte in Gasfermentationsprozessen unvermeidbar macht. Diese Effekte sind abhängig vom verwendeten Mikroorganismus und sind für *C. carboxidivorans* noch nicht genauer untersucht. Daher soll neben der Untersuchung der Gasverwertung durch *C. carboxidivorans* eine potentielle Kohlenstoffmonoxid-Substratüberschussinhibierungskinetik quantitativ identifiziert werden, um Basisdaten für zukünftige technische Anwendungen bereitstellen zu können.

Die geplante Vorgehensweise ist im Folgenden zusammengefasst:

Zunächst soll ein Referenzprozess zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* im Satzverfahren im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor gestaltet werden, um eine definierte Ausgangsbasis für Parameterstudien zur Alkoholbildung zu erhalten.

Im Anschluss daran sind Untersuchungen zur Gasaufnahme und zur Verwertung der einzelnen Gaskomponenten Wasserstoff, Kohlenstoffmonoxid und Kohlenstoffdioxid im Hinblick auf Alkoholbildung geplant. Ein besonderes Interesse gilt dabei den Gaskomponenten Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff, um eventuell auftretende limitierende und/oder inhibierende Effekte auf Wachstum und Produktbildung genauer zu erfassen. Für Kohlenstoffmonoxid soll insbesondere eine Substratüberschussinhibierungskinetik abgeschätzt werden.

Aufgrund des Vorliegens einer acidogenen Phase und einer solventogenen Phase mit unterschiedlichen pH-Verläufen, soll auch der Einfluss des pH auf Wachstum und der Verschiebung von Säurebildung hingehend zur Alkoholbildung berücksichtigt werden. Hierzu ist die Identifikation besonders geeigneter Einstellungen des pH für eine hohe finale Alkoholbildung bei geringen Restsäurekonzentrationen für *C. carboxidivorans* notwendig.

Auch Medienbestandteile wie Vitamine (Gaddy et al. 2007; Leclerc et al. 1998), Komplexbestandteile (Vega et al. 1989; Leclerc et al. 1998) oder Spurenelemente (Saxena und Tanner 2011) können Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung haben, wobei letztere als Cofaktoren in Metalloenzymen des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges vorkommen (Ragsdale und Pierce 2008). Daher sollen ausgewählte Medienbestandteile variiert werden, um deren Effekte auf eine erhöhte Alkoholbildung zu ermitteln.

Daneben soll auch die Reaktionstemperatur als Prozessvariable variiert werden, um mögliche Effekte auf die Alkoholbildung zu untersuchen. Verringerungen der Prozesstemperatur führen zu einer verringerten Membranfluidität und könnten ein erschwertes Eindringen von Säuren bewirken und damit negative Effekte auf die Zelle schmälern.

Zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten ist eine Übertragung vom Satzbetrieb in den kontinuierlichen Betrieb zwingend notwendig. Daher soll unter Anwendung der in Satzprozessen gewonnenen Erkenntnisse zur Alkoholbildung ein kontinuierlicher Prozess gestaltet werden. Dieser Prozess darf für eine effiziente Alkoholproduktion nur geringe Restsäurekonzentrationen bei hohen Alkoholkonzentrationen in der finalen Produktlösung aufweisen.

3 Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt sind die für diese Arbeit relevanten theoretischen Grundlagen zusammengestellt. Zunächst wird ein Überblick über acetogene Mikroorganismen gegeben. Im Anschluss daran wird auf den Stofftransport gas-flüssig bei der Gasfermentation und auf Reaktoren für die Gasfermentation eingegangen. Im letzten Teil werden bioprozesstechnische Grundlagen beschrieben.

3.1 Acetogene Mikroorganismen

3.1.1 Autotropher Metabolismus

Acetogene Mikroorganismen (Acetogene) sind obligat anaerobe Bakterien, die den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg nutzen. Nach ihren Entdeckern wird er auch als Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg bezeichnet (Drake 1994). Zentrales Stoffwechselintermediat dieses Stoffwechselweges ist das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) (Ljungdahl und Wood 1969; Ragsdale und Pierce 2008). Der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg ermöglicht die schrittweise Reduktion von CO_2 zum Acetyl-CoA unter der Bildung des Hauptendprodukts Acetat und dient dabei der Assimilierung von Kohlenstoff in Biomasse und Biomolekülen (Drake et al. 2006; Drake et al. 2008).

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, besteht der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg aus zwei linearen reduktiven Reaktionsketten, dem Methylzweig und dem Carbonylzweig. Im Methylzweig wird CO_2 zunächst zu Formiat reduziert, bevor es unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) an Tetrahydrofolat (THF) gebunden wird und dabei Formyl-Tetrahydrofolat (Formyl-THF) entsteht. Durch Abspaltung von Wasser bildet sich Methenyl-THF, welches über weitere reduktive Schritte über Methylen-THF zum Methyl-THF umgewandelt wird. Die entstandene Methylgruppe wird sodann an das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein der bifunktionalen CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase gebunden. Im Carbonylzweig wird ein weiteres Molekül CO_2 über dasselbe Enzym zu CO reduziert und mit dem gebundenen Methylrest und einem Coenzym A zum Acetyl-CoA umgesetzt. Durch die Phosphorylierung von Acetyl-CoA entsteht Acetyl-Phosphat (Acetyl-P). Unter der Freisetzung eines ATP wird schließlich Acetat gebildet. Da bereits zur Bindung von Formiat an THF ein ATP verbraucht wurde, liefert der Acetyl-CoA-Weg keinen Nettoenergiegewinn (Ljungdahl 1986; Drake et al. 2008; Ragsdale und Pierce 2008).

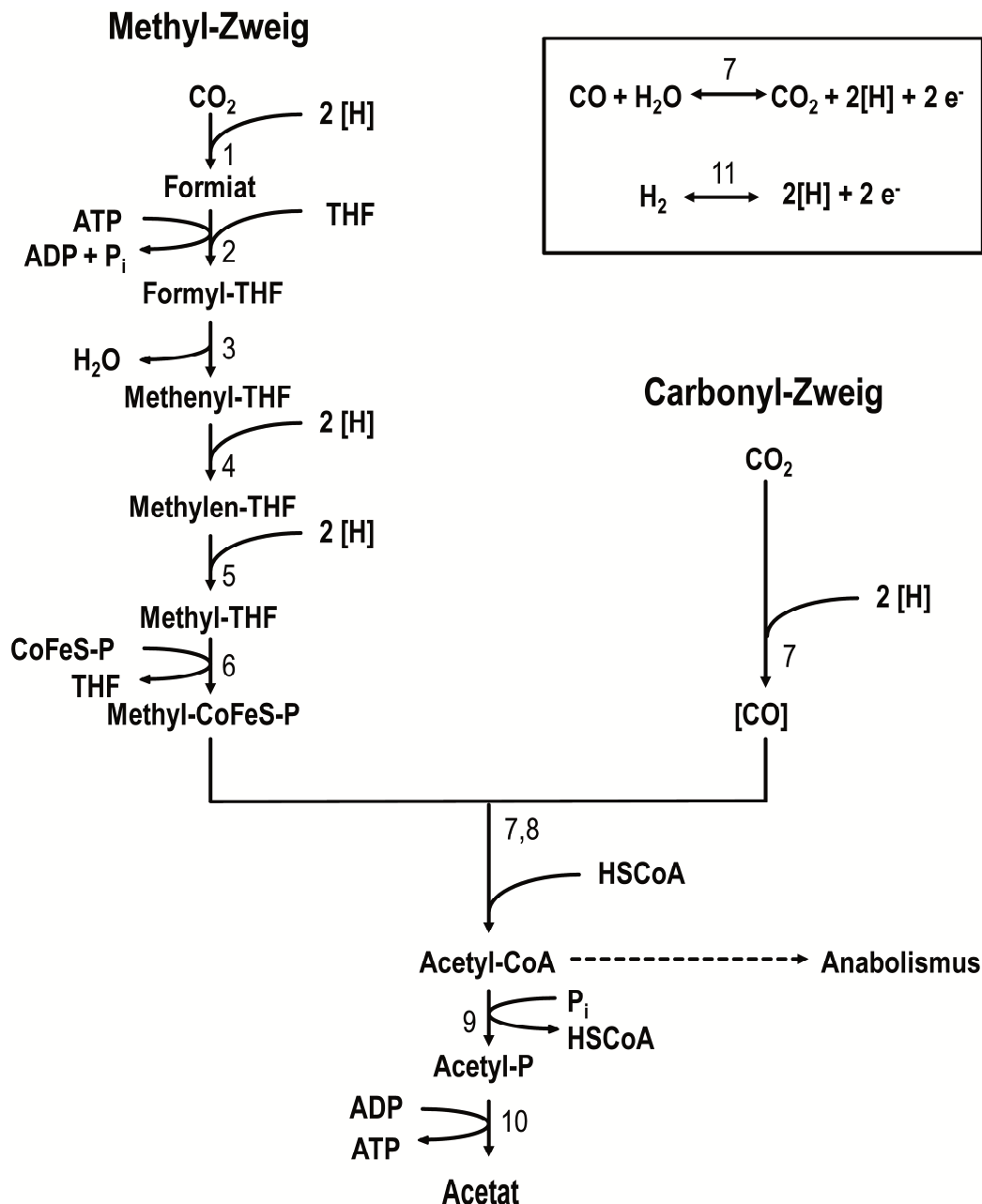
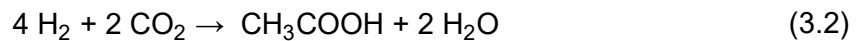
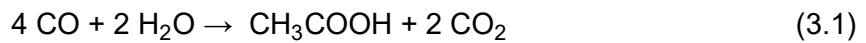


Abbildung 3.1: Darstellung des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs nach Drake et al. (2008) sowie Wilkins und Atiyeh (2011) mit den beteiligten Enzymen 1) CO_2 -Reduktase, 2) Formyl-THF-Synthetase, 3) Formyl-THF-Cyclohydrolase, 4) Methylen-THF-Dehydrogenase, 5) Methylen-THF-Reduktase, 6) Methyltransferase, 7) CO-Dehydrogenase, 8) Acetyl-CoA-Synthetase, 9) Phosphotransacetylase, 10) Acetatkinase, 11) Hydrogenase. HSCoA: HS-Coenzym A, CoFeS-P: Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein, Acetyl-P: Acetyl-Phosphat, [H]: Reduktionsäquivalent.

Die für die reduktiven Schritte benötigten Reduktionsäquivalente (Abbildung 3.1) können dabei mithilfe einer Hydrogenase aus Wasserstoff generiert werden oder mithilfe der CO-Dehydrogenase über die sogenannte Wassergas-Shift Reaktion aus CO gebildet werden (Hu et al. 2011). Dient CO als Kohlenstoffquelle, so kann CO direkt im

Carbonylzweig verwendet werden. Für den Methylzweig muss dieses zunächst mithilfe der CO-Dehydrogenase über die Wassergas-Shift-Reaktion zu CO₂ umgesetzt werden (Ragsdale und Pierce 2008). Zur Bildung eines Acetatmoleküls sind 8 Reduktionsäquivalente notwendig, wenn Wasserstoff diese bereitstellt, und 6 Reduktionsäquivalente notwendig, wenn CO diese bereitstellt. Die stöchiometrischen Gleichungen zu Acetatbildung basierend auf H₂/CO₂ beziehungsweise CO lauten hierbei wie folgt.



Die Verwertung von CO im Acetyl-CoA Stoffwechselweg ist für einige acetogene Mikroorganismen beschrieben (zum Beispiel *Acetobacterium woodii*, *Clostridium ljungdahlii* oder *Clostridium aceticum*) (Bertsch und Müller 2015; Tanner et al. 1993; Sim et al. 2007). Für *Clostridium autoethanogenum* oder *Butyribacterium methylotrophicum* ist die Nutzung von CO sogar als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angegeben (Abrini et al. 1994; Grethlein et al. 1991). Jedoch kann eine hohe CO-Exposition Einfluss auf die Produktverteilung bei der Fermentation acetogener Bakterien haben kann (Vega et al. 1989; Hurst und Lewis 2010; Najafpour und Younesi 2006) oder gar inhibierende Effekte zur Folge haben (Min et al. 2013).

3.1.2 Heterotropher Metabolismus

Acetogene Bakterien sind neben der autotrophen Stoffverwertung anorganischer Substrate (Autotrophie) auch in der Lage organische Kohlenstoffquellen (Heterotrophie) wie zum Beispiel Hexosen zu verwerten. Im Folgenden soll dies anhand der Umsetzung von Glucose zu Acetat dargestellt werden (Abbildung 3.2). Zunächst wird 1 Molekül Glucose über die Glykolyse zu 2 Molekülen Pyruvat unter Freisetzung von 4 Reduktionsäquivalenten umgesetzt (Diekert und Wohlfarth 1994; Drake et al. 2006; Wood et al. 1986). Im Anschluss daran setzt die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase das Pyruvat unter CO₂-Bildung und Freisetzung von 4 weiteren Reduktionsäquivalenten zu Acetyl-CoA um und ist damit Verknüpfungselement zwischen Autotrophie und Heterotrophie, da dieses Intermediat im weiteren Verlauf mit den Enzymen Phosphotransacetylase und Acetatkinase über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgewandelt wird. Dabei werden wiederum über Substratkettenphosphorylierung 2 Moleküle ATP gewonnen. Die während der heterotrophen Verstoffwechslung freiwerdenden

Reduktionsäquivalente und das gebildete CO₂ können sodann in den Acetyl-CoA-Weg fließen und dort nochmals ein Molekül Acetat bilden.

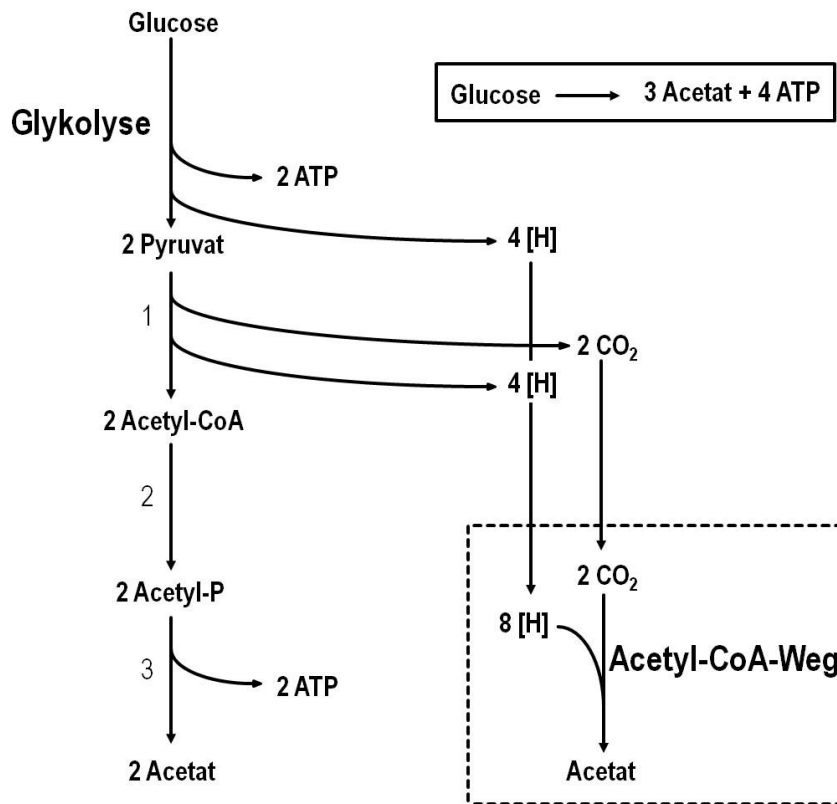


Abbildung 3.2: Homoacetogene Verwertung von Glucose zu Acetat mit den beteiligten Enzymen 1) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, 2) Phosphotransacetylase und 3) Acetatkinase nach Drake et al. (2008) sowie Schuchmann und Müller (2014).

3.1.3 Energiegewinnung

Energiekonservierung kann über zwei verschiedene Arten erfolgen: der Substratkettenphosphorylierung, bei der eine chemische Reaktion direkt mit der Phosphorylierung von ADP zum zentralen Energieträger ATP gekoppelt wird, und der chemiosmotisch getriebenen Phosphorylierung, bei der exergonische Reaktionen (in der Regel Elektronentransferreaktionen) mit der Translokation von Ionen über die Membran gekoppelt werden. Der dabei entstehende Ionengradient über die Membran treibt sodann die ATP-Synthese über eine membrangebundene ATP-Synthase an. Beim Acetyl-CoA-Stoffwechselweg wird im letzten Schritt zur Bildung von Acetat zwar über Substratkettenphosphorylierung ein Molekül ATP generiert, jedoch wird für die Bindung von Formiat an THF im Methylzweig ein Molekül ATP benötigt (Abbildung 3.1), sodass über diesen reduktiven Stoffwechselweg per se keine Nettoenergie gewonnen wird. Die

Energiekonservierung erfolgt bei Acetogenen daher über den Aufbau membranständiger, chemiosmotischer Ionengradienten zur Kopplung für die ATP-Synthese.

Bis vor kurzem wurden die acetogenen Mikroorganismen in Abhängigkeit des translozierenden Ions in H^+ -Gradienten abhängige und Na^+ -Gradienten abhängige Acetogene unterteilt, wobei erstere Cytochrome zur Ausbildung transmembraner Protonengradienten nutzen, und letztere über Corrinnoide zum Aufbau des Na^+ -Gradienten verfügen und nicht über Cytochrome verfügen (Müller 2003; Biegel und Müller 2010). Diese Unterteilung wurde jedoch in Frage gestellt, nachdem *Clostridium ljungdahlii* weder über Cytochrome verfügt, noch einen Na^+ -Gradienten aufbaut. Daher schlugen Schuchmann und Müller (2014) eine neue Klassifizierung vor. Diese unterteilt Acetogene jetzt in Rnf-abhängige und Ech-abhängige Klassen zur Energiekonservierung. Rnf-abhängige Acetogene benutzen demnach eine membranständige Ferredoxin- NAD^+ -Oxidoreduktase zum Aufbau des Ionengradienten, dessen Komplex als Rnf-Komplex bezeichnet wird. Ech-abhängige Acetogene verwenden eine membranständige energieübertragende Hydrogenase, den sogenannten Ech-Komplex, und H^+/H_2 anstelle von $NAD^+/NADH$ für den Transport von Ionen. Eine weitere Unterteilung wird dann durch das translozierende und den Gradienten aufbauende Ion vorgenommen, sodass man von H^+ -abhängigen Rnf-abhängigen Acetogenen (zum Beispiel *Clostridium ljungdahlii*), Na^+ -abhängigen Rnf-abhängigen Acetogenen (zum Beispiel *Acetobacterium woodii*), H^+ -abhängigen Ech-abhängigen Acetogenen (zum Beispiel *Moorella thermoacetica*) und Na^+ -abhängigen Ech-abhängigen Acetogenen spricht. Letzterer Unterteilung konnte noch kein Acetogen zugeordnet werden.

Bezüglich seiner Energiekonservierung ist *Clostridium carboxidivorans* nur geringfügig untersucht. Die Existenz eines Rnf-Komplexes legt jedoch die Nutzung dieses Rnf-Komplexes zur ATP-Synthese mittels eines H^+ -Gradienten nahe (Bruant et al. 2010; Hemme et al. 2010; Bengelsdorf et al. 2018).

3.1.4 *Clostridium carboxidivorans*

Clostridium carboxidivorans (*C. carboxidivorans*) ist ein obligat anaerober, acetogener Mikroorganismus, der aus einem landwirtschaftlichen Absatzbecken isoliert wurde. Mit einer Sequenzähnlichkeit von 99,7 % ist *C. carboxidivorans* nah verwandt zu *Clostridium scatologenes* ATCC 25775^T. Das grampositive Stäbchen (0,5 x 3 μm) kommt dabei einzeln oder in Paaren vor und ist über seine peritriche Begeißelung beweglich. Es

ist in der Lage Sporen zu bilden. Als mesophiles Bakterium liegt sein optimaler Temperaturbereich zwischen 37 °C und 40 °C. Es konnte in einem Bereich von pH 4,6 bis pH 7,2 kultiviert werden, wobei der optimale pH für das Wachstum bei pH 6,2 liegt. (Liou et al. 2005)

C. carboxidivorans nutzt eine Vielzahl an heterotrophen Kohlenstoffquellen (unter anderem Ribose, Fructose, Xylose, Glucose, Galactose, L-Arabinose, Mannose, Rhamnose, Sucrose), Alkohole (Glycerin, Ethanol, Propanol, 2-Propanol, Butanol) zum Wachstum. Autotrophes Wachstum wurde im Rahmen des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges mit den Gaskomponenten CO/CO₂ sowie mit H₂/CO₂ beobachtet (Liou et al. 2005). Auch wurde Wachstum mit Aminosäuren (Histidin, Glutamat, Aspartat, Casaminosäuren, Asparagin) sowie mit quartären organischen Ammoniumverbindungen wie Betain und Cholin beschrieben. (Liou et al. 2005)

Neben dem Hauptprodukt Acetat weist *C. carboxidivorans* eine weitere Vielzahl an weiteren natürlichen Produkten auf. Diese sind Ethanol, Butyrat, Butanol, Hexanoat, und Hexanol (Phillips et al. 2015; Ramachandriya et al. 2013; Ukpong et al. 2012). Im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* verfügt *C. carboxidivorans* nicht über CoA-Transferasegene, sodass kein Aceton produziert werden kann (Daniell et al. 2012). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass *C. carboxidivorans* nicht in der Lage ist, vorgelegtes Aceton in Isopropanol umzuwandeln (Ramachandriya et al. 2011).

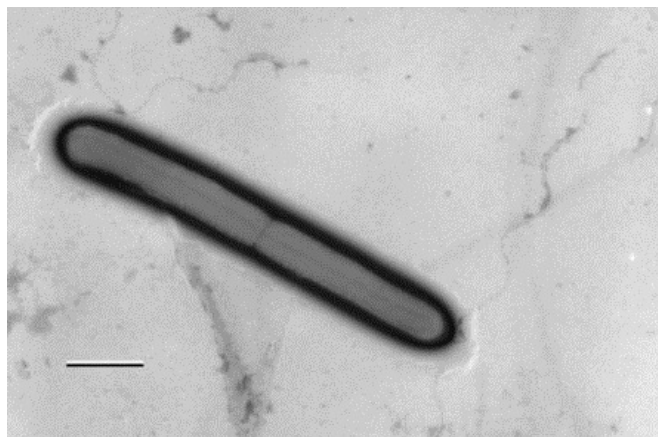


Abbildung 3.3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Clostridium carboxidivorans* aus Liou et al. (2005). Der dargestellte Balken stellt die Länge von 1 µm dar.

3.1.5 Produktbildung und Produktinhibierung

C. carboxidivorans ist neben der Bildung von Acetat als Hauptprodukt auch in der Lage längerkettige Produkte wie Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol zu bilden. Der Stoffwechselweg zu den Produkten Ethanol, Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol ausgehend vom Acetyl-CoA wurde in der Literatur beschrieben (Daniell et al. 2012; Fernández-Naveira et al. 2017b) und ist in Abbildung 3.4 skizziert.

Die Bildung von Ethanol kann über zwei verschiedene Wege erfolgen. Beim ersten Weg wird Ethanol aus Acetat gebildet. Dabei wird Acetat zunächst unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten mit einer Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) Ferredoxin-abhängig zu Acetaldehyd reduziert. Im Anschluss daran wird Acetaldehyd wiederum unter Verwendung der Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE) zum Ethanol reduziert. Alternativ kann Ethanol über die Reduktion zum Acetaldehyd ausgehend vom Acetyl-CoA mithilfe von Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenasen (ADHE) gebildet werden. Jeder dieser beiden Reduktionsschritte benötigt dabei 2 Reduktionsäquivalente.

Acetyl-CoA kann durch Kettenverlängerung eines weiteren Acetyl-CoA-Moleküls über mehrere Schritte zum Intermediat Butyryl-CoA reagieren. Dies geschieht mit den Enzymen Thiolase (THLA), 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase (HBD), Crotonase (CRT) und Butyryl-CoA-Dehydrogenase (BCD) mit den Intermediaten Acetoacetyl-CoA, 3-Hydroxy-Butyryl-CoA und Crotonyl-CoA (Bennett und Rudolph 1995). Für die Reaktionabfolge werden insgesamt 4 Reduktionsäquivalente benötigt. Der letzte Schritt zum Butyryl-CoA ist dabei Ferredoxin-abhängig.

Butyryl-CoA wird mithilfe einer Phosphotransferase (PTF) zum Butyryl-Phosphat umgesetzt, worauf mithilfe einer Butyratkinase (BUK) unter Bildung von ATP Butyrat gebildet wird. Ausgehend vom Butyrat kann dann die Bildung des Butanols analog zur Bildung von Ethanol aus Acetat erfolgen. Hierbei wird Butyrat unter Verwendung einer Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) Ferredoxin-abhängig zum Butyraldehyd reduziert und dieses wiederum mithilfe einer Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE) unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten zum Butanol reduziert. Beim zweiten Reaktionsweg zur Bildung von Butanol wird mithilfe einer Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase (ADHE) das Butyryl-CoA unter Verbrauch von 4 Reduktionsäquivalenten zunächst zum Butyraldehyd und anschließend zum Butanol umgesetzt.

Die C6-Produktbildung erfolgt wiederum aus dem zentralen Stoffwechselintermediat Acetyl-CoA durch Kettenverlängerung von Butyryl-CoA nach dem Muster einer reversen β -Oxidation, wobei Hexanoyl-CoA entsteht (Bengelsdorf et al. 2018).

Es wird angenommen, dass die Bildung des Hexanoyl-CoA über die Intermediate 3-keto-Hexanoyl-CoA, 3-Hydroxy-Hexanoyl-CoA und trans-2-Hexanoyl-CoA erfolgt (Fernández-Naveira et al. 2017b; Bengelsdorf et al. 2018). Diese Schritte könnten durch ähnliche, noch nicht charakterisierte Enzyme analog zur Bildung von Butyryl-CoA bewerkstelligt werden: Thiolase (THLA2*), 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase (HBD2*), Crotonase (CRT2*) und Butyryl-CoA-Dehydrogenase (BCD2*). Im Anschluss kann das Hexanoyl-CoA über eine Phosphotransferase (PTF2*) zum Hexanoyl-Phosphat reagieren und unter der Freisetzung von ATP mithilfe einer Fettsäurekinase (FAK*) zu Hexanoat umgesetzt werden. Die Reduktion der Säure Hexanoat soll wiederum über eine Ferredoxin-abhängige Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR*) erfolgen. Die Bildung von Hexanol aus dem entstandenen Hexaldehyd soll unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH*) katalysiert werden. Alternativ könne die Hexanolbildung wiederum direkt über das Intermediat Hexanoyl-CoA erfolgen. Eine Aldehyddehydrogenase (ALDH*) und eine Alkoholdehydrogenase (ADH*) sollen die reduktiven Schritte zum Hexaldehyd und zum Hexanol unter Verbrauch von insgesamt 4 Reduktionsäquivalenten übernehmen.

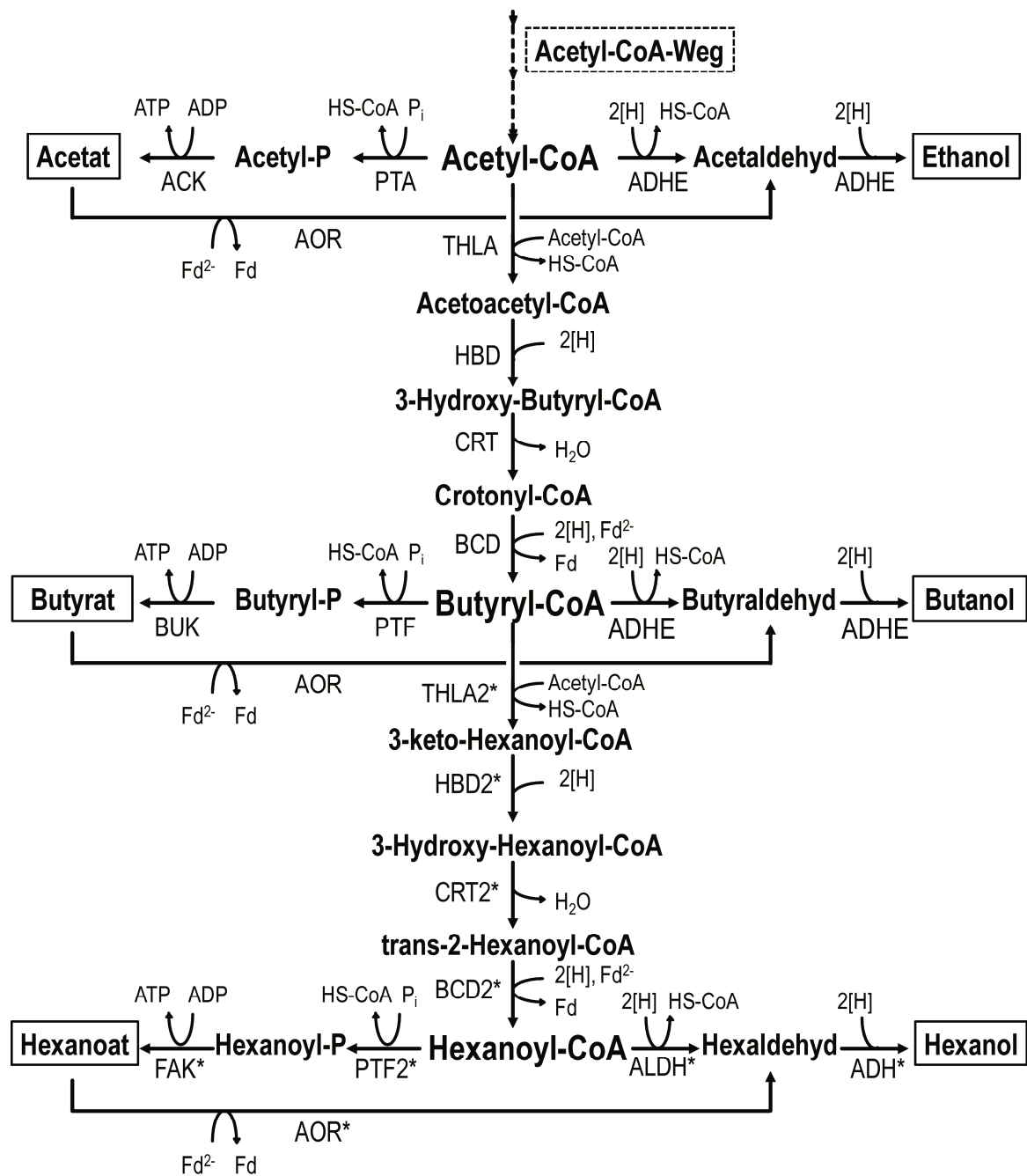
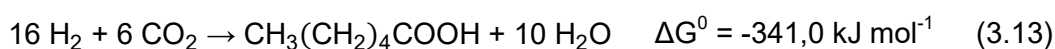
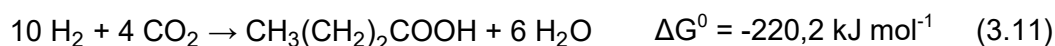
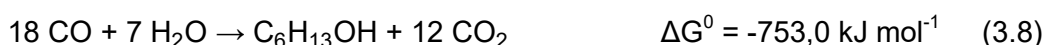
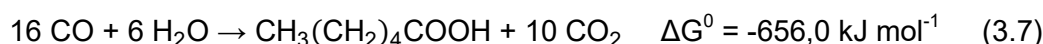
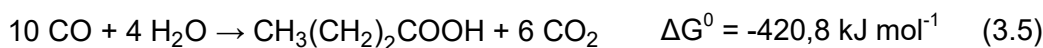
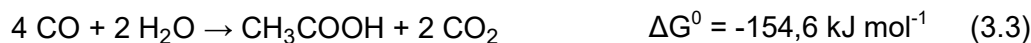


Abbildung 3.4: Darstellung der autotrophen Bildung der Endprodukte für *C. carboxidivorans* ausgehend vom Acetyl-CoA mit den Enzymen: ACK (Acetatkinase), ADH (Alkoholdehydrogenase), ADHE (Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase), ALDH (Aldehyd-Dehydrogenase), AOR (Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase), BCD (Butyryl-CoA-Dehydrogenase), BUK (Butyratkinase), CRT (Crotonase), HBD (3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase), FAK (Fettsäurekinase), PTA (Phosphotransacetylase), PTF (Phosphotransferase), THLA (Thiolase). Die Enzyme zur Hexanoat/Hexanolbildung ausgehend vom Butyryl-CoA wurden noch nicht charakterisiert und sind mit einem zusätzlichen * gekennzeichnet. Acetyl-P: Acetyl-Phosphat, Butyryl-P: Butyryl-Phosphat, Hexanoyl-P: Hexanoyl-Phosphat. Abgeändert nach Daniell et al. (2012); Fernández-Naveira et al. (2017b) und Bengelsdorf et al. (2018).

Die Stöchiometrie zur Bildung der einzelnen Produkte basierend auf CO als Substrat sowie deren freie Enthalpie stellt sich wie folgt dar (Fernández-Naveira et al. 2017b):



Bei Clostridien tritt die Bildung der Alkohole aus den korrespondierenden Säuren oftmals bei niedrigem pH in der späteren Phase einer Satzkultivierung bei gleichzeitig hohen, vorliegenden Konzentration gebildeter Säuren in undissoziierter Form auf und wird in der Literatur neben *Clostridium carboxidivorans* bei *Clostridium ljungdahlii* (Phillips et al. 1993), *Clostridium ragsdalei* (Kundiya et al. 2011), *Butyribacterium methylotrophicum* (Grethlein et al. 1990) und *Clostridium autoethanogenum* (Abubackar et al. 2016a) beobachtet. Diese Säuren sind in der Lage die Zellmembran wiederum zu passieren, dort zu deprotonieren und durch Akkumulation den so lebensnotwendigen Protonengradienten mit der Zeit zu zerstören, was unweigerlich zum Zelltod führen würde (Dürre 2005). Gleichzeitig haben diese freien Protonen auch negative Auswirkungen auf die Aktivität unterschiedlichster Enzyme über Konformationsänderungen (Herrero 1983). Daher ist die Bildung von Alkoholen durch Reduktion organischer Säuren bei Clostridien als adaptive Antwort auf die inhibitorischen Effekte der gebildeten Säuren zu verstehen (Jones und Woods 1986; Hartmanis et al. 1984) und grenzt die sogenannte Solventogenese von der vorangegangenen Acidogenese ab

(Liew et al. 2013). In der solventogenen Phase steigt der extrazelluläre pH wieder an und es ist kaum noch Wachstum zu beobachten (Ukpong et al. 2012). Diese Verhaltensweise ermöglicht es den Zellen jedoch zu überleben und sich Zeit zur Sporulation zu verschaffen (Daniell et al. 2012).

Nachdem der pH eine große Rolle bei der Produktbildung spielt (Mohammadi et al. 2012; Abubackar et al. 2011), sind in Abbildung 3.5 die Dissoziationsgleichgewichte für Essigsäure/Acetat, Buttersäure/Butyrat und Hexansäure/Hexanoat dargestellt, welche die Anteile der protonierten und deprotonierten Säurespezies in Abhängigkeit des jeweiligen pH zeigen. Der pH des wässrigen Mediums hat demnach eine entscheidende Rolle für das Vorliegen der Säureformen. Der pK_s entspricht dabei dem Wert, bei dem der Anteil der Säureform und des Säureanions gleich hoch ist.

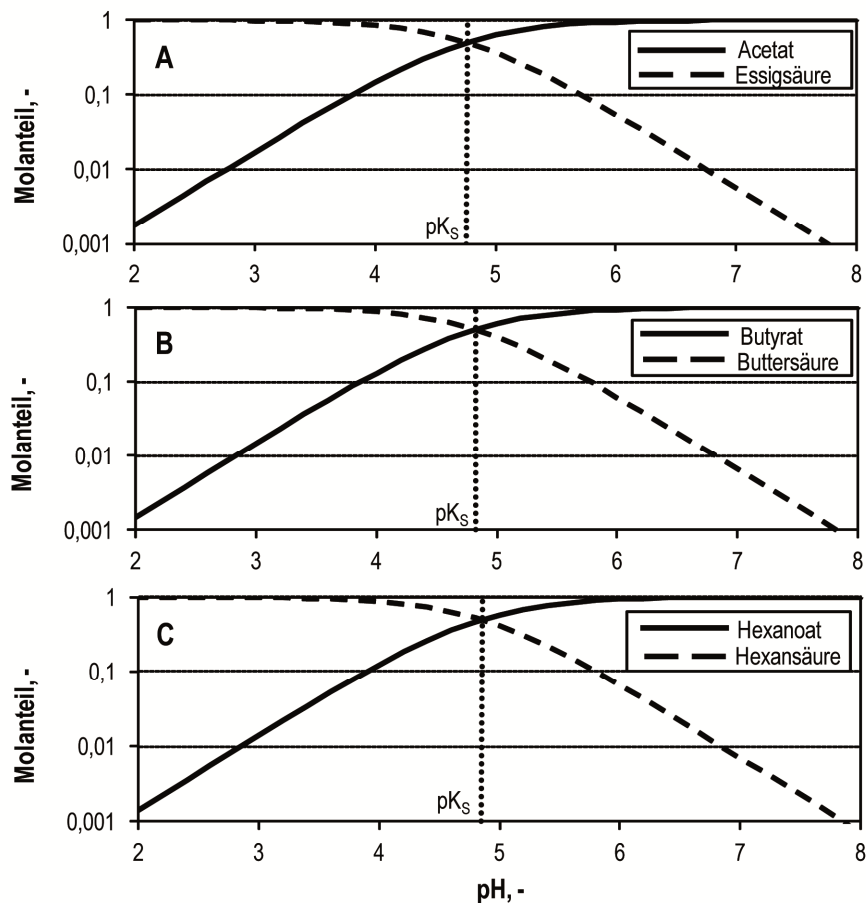


Abbildung 3.5: Dissoziationsgleichgewichte für die Säuren A) Essigsäure/Acetat, B) Buttersäure/Butyrat und C) Hexansäure/Hexanoat zur Darstellung der Anteile der protonierten und deprotonierten Spezies in Abhängigkeit des pH mit den pK_s -Werten von 4,76 (Essigsäure), 4,82 (Buttersäure) und 4,85 (Hexansäure) für 25 °C bei einer Ionenstärke von 0 mol L^{-1} (Atkins und Paula 2012).

Aber auch die gebildeten Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol weisen ab gewissen Konzentrationen inhibierende Effekte auf. Während für Ethanol eine relativ hohe Toleranz angegeben wird (Wachstum um 50 % reduziert bei Anwesenheit von 40 g L^{-1} Ethanol (Costa und Moreira 1983), zeigen bereits vorgelegte Butanolkonzentrationen zwischen 7 g L^{-1} und 13 g L^{-1} die selbigen Effekte, weswegen die Butanolbildung in der industriellen Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation (ABE-Fermentation) mit Clostridien bereits bei geringen Produktkonzentrationen von 13 g L^{-1} – 20 g L^{-1} zum Erliegen kommt (Jones und Woods 1986; Woods 1995). Dabei wird die höhere Toxizität von Butanol einer erhöhten Zellmembranfluidität zugeschrieben, welche aus der Integrität des hydrophoben Butanol in die Phospholipidmembran und der Veränderung von Phospholipidmembrankomponenten resultiert (Jones und Woods 1986; Lee et al. 2008a; Bowles und Ellefson 1985; Vollherbst-Schneck et al. 1984). Da sich dieser Effekt mit der Kettenlänge hydrophober Substanzen verstärkt, bedeutet dies eine umso stärkere Inhibierung durch Hexanol bei gleicher vorliegender Konzentration.

Mittlerweile sind über 100 Acetogene aus 22 Gattungen bekannt (Drake et al. 2008). Dabei sind nur einige wenige gut charakterisiert. Neben *C. carboxidivorans* ist die autotrophe Bildung von Alkoholen mit weiteren Stämmen bekannt (Tabelle 3.1). *C. ragsdalei* wurde im 100 L Maßstab mit einer Gasmischung aus H_2 , CO und CO_2 im einem Rührkesselreaktor im Satzbetrieb kultiviert und dabei konnten Konzentrationen von etwa 6 g L^{-1} Ethanol erreicht werden (Kundiya et al. 2010). Ebenfalls 6 g L^{-1} Ethanol wurde bei der kontinuierlichen Kultivierung mit Zellrückhaltung von *Alkalibaculum bacchi* erzielt (Liu et al. 2014). Für *C. autoethanogenum* wurden $7,2 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol bei der kontinuierlichen Begasung mit reinem CO in einem Rührkesselreaktor mit zyklischen pH-Verschiebungen sowie einer partiellen Medienerneuerung gebildet (Abubackar et al. 2016b). Eine der höchsten Ethanolkonzentrationen wurde mit *C. ljungdahlii* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor mit Zellrückhaltung bei der Begasung mit H_2 , CO und CO_2 erreicht. Nach einer Prozesszeit von 560 h lagen 48 g L^{-1} Ethanol vor.

Die autotrophe Bildung von Butanol ist mit den Stämmen *C. drakei* (Küsel et al. 2000), *C. scatologenes* (Daniell et al. 2012), *C. carboxidivorans* (Bruant et al. 2010) und *Butyribacterium methylotrophicum* (Grethlein et al. 1991) bekannt. Letztere erzielten Butanolkonzentrationen von $2,7 \text{ g L}^{-1}$ mit Zellrückhaltung in einem kontinuierlichen Prozess. Über genetische Modifikation wurde *C. ljungdahlii* zur Butanolbildung befähigt (Köpke et al. 2010).

Ein weiterer acetogener Mikroorganismus, der wie *C. carboxidivorans* über die autotrophe Hexanolbildung verfügt, ist bisher nicht bekannt. Lediglich mit dem anaeroben Stamm *C. kluyveri* wird eine Hexanolbildung aus den organischen Substraten Ethanol und Butyrat angenommen (Seedorf et al. 2008).

Das vielfältige Produktspektrum mit der Bildung von C2-, C4- und C6-Alkoholen von *C. carboxidivorans* aus gasförmigen Substraten macht es zu einem einzigartigen acetogenen Mikroorganismus mit herausragenden Eigenschaften. Dabei liegen die bisher höchsten, erzielten Alkoholkonzentrationen mit diesem Stamm bei 5,55 g L⁻¹ Ethanol, 2,66 g L⁻¹ Butanol und 1,0 g L⁻¹ Hexanol (Phillips et al. 2015; Fernández-Naveira et al. 2016b).

Tabelle 3.1: Zusammenstellung alkoholproduzierender Acetogene auf Basis gasförmiger Substrate.

	Substrat	Referenz
Ethanolbildung		
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	H ₂ /CO ₂	Allen et al. 2010
	CO/CO ₂	Liu et al. 2012; Liu et al. 2014
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	CO	Grethlein et al. 1991; Lynd et al. 1982
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	CO	Abrini et al. 1994
	CO, H ₂ /CO ₂	Cotter et al. 2009a; Abubackar et al. 2016b
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	CO/CO ₂	Liou et al. 2005; Ukpong et al. 2012; Hurst und Lewis 2010
	H ₂ /CO/CO ₂	
<i>Clostridium drakei</i>	H ₂ /CO ₂ , CO/CO ₂	Küsel et al. 2000
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	H ₂ /CO/CO ₂	Phillips et al. 1993; Gaddy et al. 2012; Mohammadi et al. 2012
<i>Clostridium ragsdalei</i>	H ₂ /CO ₂ , CO/CO ₂	Huhnke et al. 2010; Kundiyana et al. 2010; Saxena und Tanner 2011
	H ₂ /CO ₂ /CO/N ₂	
<i>Clostridium scatologenes</i>	CO/CO ₂ , H ₂ /CO ₂	Liou et al. 2005
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	H ₂ /CO ₂	Möller et al. 1984
<i>Sporomusa ovata</i>	H ₂ /CO ₂	Möller et al. 1984
Butanolbildung		
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	CO	Liou et al. 2005; Ukpong et al. 2012; Bruant et al. 2010
	H ₂ /CO/CO ₂	
<i>Clostridium drakei</i>	H ₂ /CO ₂ , CO/CO ₂	Küsel et al. 2000
<i>Clostridium scatologenes</i>	H ₂ /CO ₂ , CO/CO ₂	Daniell et al. 2012
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	CO	Grethlein et al. 1991; Worden et al. 1991
Hexanolbildung		
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	H ₂ /CO/CO ₂	Ramachandriya et al. 2013; Phillips et al. 2015

3.1.6 Medienbestandteile

Hefeextrakt wird oftmals Kultivierungsmedien zugesetzt, um den Nährstoffbedarf der Mikroorganismen auf einfache Weise zu decken. Hefeextrakt enthält Oligopeptide, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Cholin und Vitamine (Fuchs 2014), wobei die genaue Zusammensetzung je nach Charge und Bezugsquelle variiert. Unter Verwendung von Hefeextrakt liegt somit ein Komplexmedium vor, bei dem die Zusammensetzung nicht definiert ist. Für die Kultivierung mit *C. carboxidivorans* ist angegeben, dass der Zusatz von Hefeextrakt vorteilhaft ist, da sonst lange Adaptionsphasen mit geringer Biomassebildung auftreten (Wan et al. 2017).

Zur Steigerung der Alkoholbildung mit Clostridien wird (neben hohen Säurekonzentrationen und niedrigem pH) die Limitierung von Nährstoffen zum Beispiel Stickstoff oder Phosphor angegeben (Jones und Woods 1986; Cotter et al. 2009a).

Auch die Anpassung von Spurenelementkonzentrationen werden als günstige Faktoren für die Solventogenese beschrieben (Saxena und Tanner 2011). Alle wichtigen Schlüsselenzyme des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges sind Fe-Schwefel-Proteine und besitzen zwischen 2 – 8 Fe-Atome pro Enzym (Ragsdale 2008; Ragsdale und Pierce 2008), weswegen der Bedarf an Eisen verglichen mit anderen Metallen wohl um Größenordnungen höher ist (Phillips et al. 2015). Nickel ist ein Teil des aktiven Zentrums der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (CODH) welche für die Fixierung von CO verantwortlich ist (Ragsdale 2006). Die Formiat-Dehydrogenase sowie einige Aldehyd-Oxidoreduktasen (AOR; zur weiteren Umsetzung organischer Säuren zu Alkoholen) sind Wolfram abhängige Enzyme. Dabei ist Molybdän ein Analogon zu Wolfram und kann in wolframhaltigen aktiven Zentren binden. Umgekehrt ist Kupfer ein Inhibitor für die Acetyl-CoA-Synthetase (Bramlett et al. 2003). In nachfolgender Tabelle sind die daher die metallbindenden Enzyme des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges in *C. carboxidivorans* aufgelistet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Zusammenstellung von metallbindenden Enzymen im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg und alkoholbildenden Enzymen für *C. carboxidivorans* nach der Universal Protein Database (UniProt) und nach Bruant et al. (2010).

Enzym	UniProt- Bezeichnung	Ligand/Cofaktor
Formiat Dehydrogenase	Ccar_1225 Ccar_2671	Fe-S, Mo, Se
5-Methyl-THF:-CFeSP Methyltransferase	Ccar_3246	Fe-S
CO-Dehydrogenase	Ccar_3257	Fe-S, Ni
CoFeSP	Ccar_3247, Ccar_3248	Fe-S
Acetatkinase	Ccar_3990	Mg, Mn
Bifunktionelle Acetaldehyd/Alkohol- Dehydrogenase	Ccar_5153	Fe
NADH abhängige Butanol-Dehydrogenase	Ccar_0005, Ccar_0017	Fe

3.2 Stofftransport gas-flüssig

Bei autotrophen Prozessen spielt der Transfer von Gaskomponenten aus der Gasphase in die Flüssigphase (und umgekehrt) eine wichtige Rolle, da die Löslichkeiten der Gase H_2 und CO in Wasser gering sind ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ beziehungsweise $22,7 \text{ mg L}^{-1}$ bei 37 °C) (Perry et al. 1997). Wegen der geringen Löslichkeit der Gase H_2 und CO im Vergleich zu O_2 mit 4 % beziehungsweise 66 % bezogen auf die Masse (Bredwell et al. 1999) kann der Stofftransport gas-flüssig gerade in der Gasfermentation einen limitierenden Faktor darstellen. Lediglich die Löslichkeit von CO_2 ($1,1 \text{ g L}^{-1}$, 37 °C) ist höher. Die tatsächliche Löslichkeit von CO_2 ist jedoch deutlich höher als seine physikalische, da sich in Abhängigkeit des pH in Wasser ein Gleichgewicht mit den gelösten Spezies Hydrogencarbonat HCO_3^- und Carbonat CO_3^{2-} einstellt und dieses somit in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. Damit besteht insbesondere nur für die Gase H_2 oder CO die Notwendigkeit zur kontinuierlichen Zufuhr über die Gasphase.

H_2 oder CO muss bis zum Ort der Gasreaktion in der Bakterienzelle eine Vielzahl von Transportwiderständen überwinden, die in Abbildung 3.6 dargestellt sind (Doran 2004; Chmiel 2011). Zunächst erfolgt der Transfer von H_2/CO aus der Kernphase an die Gas-Flüssigkeits-Grenzschicht. Dann erfolgt der Phasenübergang über die Gas-Flüssigkeits-Grenzschicht. Nach der Diffusion durch die Grenzschicht schließt sich die Diffusion

durch den laminaren, die Gasblase umgebenden Flüssigkeitsfilm an, bevor der üblicherweise konvektive Transport durch die Flüssigphase hin zur Bakterienzelle stattfindet. Nachdem die Gasmoleküle wiederum die Grenzschicht um die Bakterienzelle diffusiv überwunden haben, diffundieren sie über die Zellmembran und müssen noch intrazellulär an den Ort der Reaktion gebracht werden. Häufig wird angenommen, dass die Stofftransportgeschwindigkeit durch den Übergang an der Phasengrenzfläche gasflüssig bestimmt wird (geschwindigkeitsbestimmender Schritt) (Munasinghe und Khanal 2010).

Für den Stofftransport gibt es verschiedene Modellvorstellungen (die Zweifilmtheorie, das Penetrationsmodell und das Oberflächenenerneuerungsmodell), wobei die Zweifilmtheorie die gängigste ist (Abbildung 3.6). Bei dieser liegen folgende Annahmen zugrunde. Auf jeder Seite der Grenzfläche gibt es eine Grenzschicht (Film), durch den der Stofftransport über Diffusion erfolgt. Dabei liegt thermodynamisches Gleichgewicht für die übergehende Gaskomponente an der Phasengrenzfläche vor.

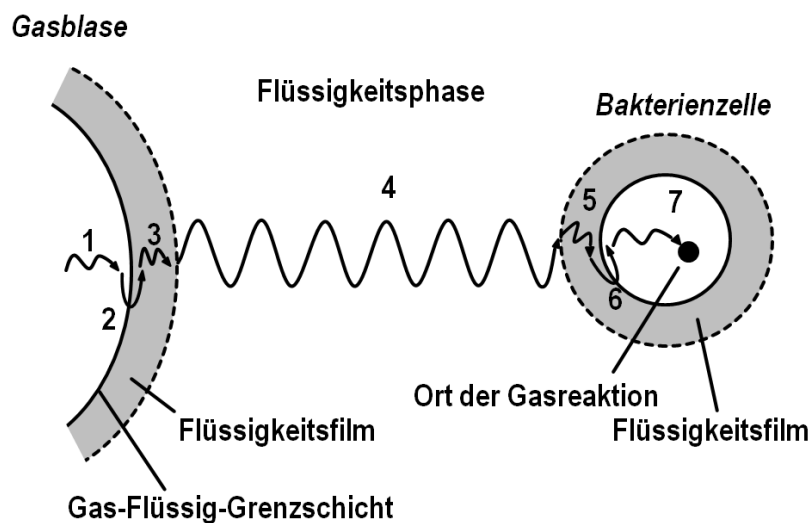


Abbildung 3.6: Transfer von Gasmolekülen durch die Flüssigphase zur Bakterienzelle: 1) Transport von der Kernphase der Gasblase an die Gas-Flüssig-Grenzschicht, 2) Transport über die Gas-Flüssig-Grenzschicht, 3) Diffusion durch den die Gasblase umgebenden Flüssigkeitsfilm, 4) konvektiver Transport durch die Flüssigkeitsphase, 5) Diffusion durch den laminaren Flüssigkeitsfilm der Zelle, 6) Diffusion über die Zellmembran, 7) intrazellulärer Transport zum Ort der Gasreaktion.

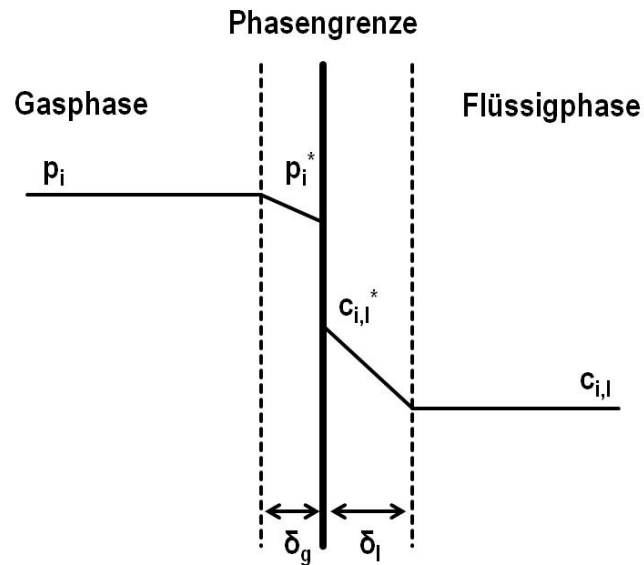


Abbildung 3.7: Darstellung des Zweifilmmodells mit dem gaseitigen Partialdruck p_i und der Gelöstkonzentration $c_{i,l}$ in der Kernströmung der Flüssigphase sowie dem dazugehörigen Partialdruck und Konzentrationen an der Phasengrenzfläche p_i^* und $c_{i,l}^*$ bei Grenzschichtdicken von δ_g und δ_l .

Für die Phasengrenzflächen werden laminare Strömungen angenommen. Für die Phasenkerne wird die Annahme einer vollständigen Durchmischung getroffen, sodass die Konzentrationen konstant sind. Die Diffusion des Gases in die Flüssigphase erfolgt so lange, bis die Gelöstgaskonzentration die Sättigungskonzentration in der Flüssigphase erreicht hat. Wenn die Diffusionskoeffizienten in der Gasphase viel größer sind als in der Flüssigphase, kann die Diffusion durch die gaseitige Grenzschicht vernachlässigt werden. Daraus folgt, dass der Stoffübergangskoeffizient k über die Phasengrenze dem flüssigkeitsseitigen Stoffübergangskoeffizienten k_L entspricht (Chmiel 2011; Storhas 1994) und die Gaseintragsrate kann in Abhängigkeit der Phasengrenzfläche und dem treibenden Konzentrationsgefälle (Differenz aus Sättigungskonzentration in der Flüssigphase und der Gelöstkonzentration in der Kernströmung der Flüssigkeitsphase) wie folgt definiert werden.

$$\text{MTR} = k_L \cdot \frac{A_g}{V} \cdot (c_{i,l}^* - c_{i,l}) \quad (3.15)$$

MTR Massentransferrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

k_L flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient, m h^{-1}

A_g	gasseitige Phasengrenzfläche, m^2
V	Flüssigkeitsvolumen, m^3
c_g^*	Sättigungskonzentration in der Flüssigphase, $g L^{-1}$
c_g	Gelöstkonzentration in der Kernströmung der Flüssigkeitsphase, $g L^{-1}$

Wird das Verhältnis von A_g und V als spezifische auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Austauschfläche a bezeichnet und mit dem Stoffübergangskoeffizienten k_L zum Stofftransportkoeffizienten $k_L a$ zusammengefasst, so lassen sich die Gaseintragsraten der verschiedenen Gase H_2 und CO (HTR und COTR) wie folgt lokal bestimmen.

$$HTR = k_L a \cdot (c_{H_2}^* - c_{H_2}) \quad (3.16)$$

$$COTR = k_L a \cdot (c_{CO}^* - c_{CO}) \quad (3.17)$$

Neben dem treibenden Konzentrationsgefälle stellt der $k_L a$ ein Maß für die Geschwindigkeit des Gaseintrags in das Flüssigmedium dar. Je größer die Austauschfläche zwischen Gasphase und Flüssigphase ist, desto höher ist der Gaseintrag bei konstantem Konzentrationsgefälle, weswegen die Größe der Gasblasen hierbei eine Rolle spielt. Die Dispergierung der Gasblasen in der Flüssigphase sollte möglichst hoch sein. Diese kann bei Rührkesselreaktoren durch hohen Leistungseintrag (Rührerdrehzahl) erreicht werden (Hass und Pörtner 2011).

Die Gelöstkonzentration von Gasen in der Flüssigphase kann mithilfe des Henry'schen Verteilungskoeffizienten und dem Partialdruck bestimmt werden (3.18). H_e ist abhängig von der Temperatur und den in Wasser gelösten Komponenten.

$$c_i = H_e \cdot p_i \quad (3.18)$$

H_e	Henry'scher Verteilungskoeffizient, $mol L^{-1} bar^{-1}$
c_i	Gelöstkonzentration des Gases i , $mol L^{-1}$
p_i	Partialdruck der Gaskomponente i , bar

Dabei berechnet sich der Partialdruck einer Komponente i über den Anteil des Gases i und dem Gesamtdruck mittels des Gesetzes nach Dalton (3.19), welches für ideale Gase gültig ist.

$$p_i = \chi \cdot p \quad (3.19)$$

p Gesamtdruck, bar

χ Molanteil des Gases i , mol mol⁻¹

Der Druck ist dabei eine Funktion der Wasserhöhe über der Gasblase und wird als hydrostatischer Druck bezeichnet. Damit wird bei konstanter Gaszusammensetzung der Partialdruck zu einer Funktion der Höhenposition im Reaktor und berechnet sich wie folgt (3.20).

$$p(H) = \rho \cdot g \cdot h + p_0 \quad (3.20)$$

$p(H)$ Druck in Abhängigkeit der Höhe H , bar

H Höhe zwischen dem betrachteten Punkt und dem Flüssigkeitsspiegel, m

ρ Dichte der Flüssigkeit, kg m⁻³

g Erdbeschleunigung, m s⁻²

p_0 Druck auf der Flüssigkeitsoberfläche, bar

3.3 Reaktoren für die Gasfermentation

Rührkesselreaktoren sind die am gängigsten eingesetzten Reaktoren (engl.: *stirred-tank reactor*, STR). Die Gasdispersion erfolgt dabei nicht nur durch das am Reaktorboden befindliche Begasungsorgan selbst, sondern auch durch die Rührorgane. Damit wird eine kontinuierliche Begasung der Flüssigphase sowie Homogenisierung innerhalb des Kessels gewährleistet. Die Art der eingesetzten Rührertypen bestimmt dabei das Strömungsprofil (radial oder axial) (Zlokarnik 1999). Höhere Rührerdrehzahlen führen dabei zu kleineren Gasblasen, was die Austauschfläche zwischen der Gasphase und der Flüssigphase vergrößert. Zusammen mit turbulenten Strömungsverhältnissen wird so der Stoffübergang gas-flüssig verbessert. Gleichzeitig verringert sich die Auftriebsgeschwindigkeit dieser kleinen Blasen, was zu einer längeren Verweilzeit in der Flüssigphase führt (Munasinghe und Khanal 2010). Durch Auswahl eines hohen Schlankheitsgrades (Verhältnis von Reaktorhöhe zu Reaktordurchmesser) kann dies nochmals erhöht werden (Chmiel 2011). Dies führt jedoch zu hydrostatischem Druck. Nachteilig beim Einsatz von Rührkesselreaktoren ist jedoch eine inhomogene Energiedissipationsverteilung.

Im Blasensäulenreaktor (engl.: *bubble column reactor*, BCR) befinden sich keine mechanisch bewegten Teile (Rührerorgane) zur Durchmischung. Der Leistungseintrag erfolgt lediglich über die Gasexpansion (statische Gasverteiler über den Reaktorquerschnitt (zum Beispiel Sinterplatten). Die Gasexpansion übernimmt auch die Durchmischung des Reaktorinhaltes. Blasensäulenreaktoren sind zylindrische Kessel mit deutlich größerer Höhe als Durchmesser. Blasensäulen haben gegenüber Rührkesselreaktoren eine deutlich homogenere Energiedissipationsverteilung, sodass lokale Energiedissipationsmaxima deutlich geringer sind. Blasensäulenreaktoren sind aufgrund ihrer einfachen Bauweise, ihrer geringen Betriebs- und Instandhaltungskosten in der Industrie für große Reaktorvolumina sehr beliebt (Doran 2004). Allerdings muss bei hohen Gasgeschwindigkeiten die Rückvermischung von Gas durch zirkulierende Flüssigkeit in Kauf genommen werden.

Gas-Lift-Reaktoren sind spezielle Blasensäulenreaktoren, bei denen durch die Einbringung eines Leitrohrs ein innerer und äußerer Umlauf entsteht. Damit wird nur ein Teil des Reaktorquerschnitts zur Begasung verwendet (engl.: *riser*). Beim Eintreten des aufsteigenden Gases in den Kopfraum bewirkt die hydrostatische Druckdifferenz zwischen begaster und nicht begaster Flüssigphase eine Pumpwirkung, die eine Flüssigkeitsumwälzung zur Folge hat. An der Flüssigkeitsoberfläche verlassen Gasblasen die Flüssigphase, sodass in der unbegasten Zone (engl.: *downcomer*)

gasblasenfreie Flüssigkeit wieder zurück strömt und damit eine Rezirkulation der Flüssigphase ermöglicht wird. *Gas-Lift*-Reaktoren weisen gegenüber Blasensäulenreaktoren bei ausreichend hoher Flüssigkeitsgeschwindigkeit ein besseres Mischungsverhalten auf (Doran 2004).

Membranreaktoren werden häufig kontinuierlich betrieben und dienen dabei der Zellrückhaltung bei gleichzeitigem Produktabzug (Chmiel 2011). Gegenüber kontinuierlichen Prozessen ohne Zellrückhaltung können die Produktkonzentrationen durch den Verbleib der Zellen im Reaktor erhöht werden. Hierzu werden Mikrofiltrationsmembranen verwendet, die entweder in den Reaktor integriert werden oder als externe Membranmodule im Bypass des Reaktors eingesetzt werden, um die Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Flüssigphase zu gewährleisten. Der stabile Betrieb kann durch die Querstromfiltration lange aufrecht erhalten werden, da die Überströmung so eingestellt werden kann, dass die Schichtdicke des Filterkuchens aus sedimentierten Zellen gering gehalten werden kann und das sogenannte "*Biofouling*" verhindert. Beim Einsatz von externen Membranmodulen wird das Reaktionsvolumen über eine Pumpe in das Membranmodul geleitet. Die zellfreie Kultursuspension mit den Produkten (Permeat) wird in einen Sammelbehälter geleitet, während die Zellen (Retentat) wieder zurück in den Reaktor geführt werden. Diese Betriebsart ermöglicht bei Bedarf auch den schnellen Austausch von Membranmodulen (Chmiel 2011).

Bei einem Festbettreaktor werden Zellen an einem den Reaktor füllenden Packungsmaterial/Trägermaterial immobilisiert. Die Flüssigphase wird kontinuierlich in den Reaktor eingetragen und wieder abgeführt. Diese Aufgabe wird von Pumpen übernommen. Die Flüssigphase hierbei kann entweder am Reaktordeckel oder am Reaktorboden eingetragen werden und bildet eine kontinuierliche flüssige Phase zwischen den Partikeln des Packungsmaterials aus. Gängigerweise wird die Flüssigphase rezykliert. Das Trägermaterial sollte weder kompressibel noch deformierbar sein, um den Flüssigkeitsstrom durch das Festbett sicherzustellen und porös genug sein, um genügend Fläche zur Immobilisierung bereitzustellen. Für die Gasfermentation muss die Begasung bei Festbettreaktoren aufgrund der geringen Gaslöslichkeiten direkt erfolgen (anstelle der Begasung von Medium in zusätzlichen externen Kesseln).

Der Rieselbettreaktor (engl.: *trickle bed reactor*, TBR) ist eine Variante des Festbettreaktors. Flüssigkeit wird am oberen Ende des Festbettreaktors eingesprüht oder getropft und fließt dann als Rinnsal durch das Festbett. Die Gasphase wird bei

einem Rieselbettreaktor als kontinuierliche Phase in den Reaktor eingetragen. Über den Einsatz einer Pumpe kann die Flüssigkeit rezykliert werden (Doran 2004).

Wie in der Literatur berichtet, wurde *C. carboxidivorans* bereits in einer Vielzahl von verschiedenen Reaktorkonfigurationen kultiviert (Tabelle 3.3). Ukpong et al. (2012) untersuchten im Rührkesselreaktor unter pH unkontrollierten Bedingungen ($pH_0 = 5,75$) die Bildung von Alkoholen und erreichten dabei Konzentrationen von $3,66 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $0,52 \text{ g L}^{-1}$ Butanol nach etwa 175 h beziehungsweise 270 h im Satzverfahren. Unter pH kontrollierten Bedingungen ($pH = 5,75$) erreichte eine andere Forschungsgruppe im Rührkesselreaktor mit CO als alleiniges autotrophes Substrat bei einer Prozesstemperatur von $33 \text{ }^\circ\text{C}$ im Satzbetrieb die bisher höchsten Alkoholkonzentrationen mit $5,55 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $2,66 \text{ g L}^{-1}$ Butanol nach einer Prozesszeit von knapp 250 h (Fernández-Naveira et al. 2016b). Parallel dazu führten sie auch einen Satzprozess bei pH 4,75 durch. Dabei waren zwar die erzielten Alkoholkonzentrationen geringer, die zellspezifischen Raten zur Bildung von Ethanol und Butanol jedoch höher ($1,6 \text{ g}_{\text{ETOH}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $0,07 \text{ g}_{\text{ETOH}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). In beiden Fällen nahmen sie einen partiellen Medienaustausch mit Zellrückhaltung während der Kultivierung vor (wiederholtes Satzverfahren), was zunächst zu einer Verdünnung der Produktkonzentrationen führte und anschließend zu einem leichten Anstieg der Säurekonzentrationen bei gleichbleibender Biotrockenmassekonzentration. In einer weiteren Forschungsarbeit im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Satzverfahren berichten sie zudem neben der Ethanol- und Butanolbildung von der Hexanolbildung ($0,85 \text{ g L}^{-1}$) mit *C. carboxidivorans* nach einer Prozesszeit von etwa 250 h (Fernández-Naveira et al. 2017a).

Ein kontinuierlicher Prozess im 3-L-Rührkesselreaktor wurde von Ahmed et al. (2006) beschrieben. Unter der Verwendung einer Verdünnungsrate von $0,0072 \text{ h}^{-1}$ und einem aus der Biomassevergasung von Rutenhirse gewonnenen Synthesegas mit Spuren von CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 , C_2H_6 und NO wurden bei einem Start-pH von 5,75 und einer Kontrolle auf einen minimalen pH von 5,25 nach 10 Tagen Prozesszeit $12 \text{ g g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Acetat und $2 \text{ g g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Ethanol erzielt. Dabei wurde ein Filter mit einer Porengröße von $0,025 \text{ }\mu\text{m}$ vorgeschaltet, wodurch Verunreinigungen durch Asche oder Teer zurückgehalten wurden. Ein Filter mit einer Porengröße von $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ konnte hingegen diese Aufgabe nicht mehr erfüllen und die Zellkonzentration begann deutlich zu sinken. Ein weiterer kontinuierlicher Prozess im Rührkesselreaktor mit *C. carboxidivorans* ist beschrieben (Shen et al. 2017). Mit einer Synthesegaszusammensetzung von

CO:H₂:CO₂:N₂ = 20:5:15:60 wird für eine Verdünnungsrate von 0,96 d⁻¹ eine erzielte Ethanolkonzentration von 2,1 g L⁻¹ bei einer Produktivität von 1,98 g L⁻¹ d⁻¹ angegeben.

Daneben wurden in der Literatur auch Prozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlichen Blasensäulenreaktor beschrieben. Neben einem Produktabzug wurde ein Teil des ablaufenden Reaktionsmediums in einer Rezirkulationsschleife dem Reaktor wieder zugeführt. Mit einer Verdünnungsrate von 0,023 h⁻¹ (Datar et al. 2004) beziehungsweise 0,026 h⁻¹ (Rajagopalan et al. 2002) erreichten beide Forschungsarbeiten ähnliche Ethanolkonzentrationen (1,6 g L⁻¹). Während Rajagopalan et al. (2002) mit einer Gaszusammensetzung von CO:CO₂:N₂ (25:15:60) arbeiteten, waren in dem von Datar et al. (2004) verwendeten Synthesegas neben zusätzlichem H₂ auch geringe Anteile an CH₄ enthalten (CO:H₂:CO₂:N₂:CH₄ = 14,7:4,4:16,5:56,8:4,2).

Zellrückhaltende Prozesse in einem sogenannten kontinuierlichen Hohlfasermembranbiofilmreaktor führten zu beachtlicher Ethanolbildung (Shen et al. 2014b). Dabei befand sich ein Hohlfasermembranmodul mit einer aktiven Membranoberfläche von 1,4 m² im Bypass zu einem 7,5 L-Rührkesselreaktor. Das Gesamtarbeitsvolumen des Systems betrug 8 L. Während der ersten 48 h befanden sich die Zellen im Rührkesselreaktor (Reservoirkessel) bei kontrolliertem pH 6,0 und einer angewandten Gaszusammensetzung von 20% CO, 5% H₂, 15% CO₂, 60% N₂. Dabei fand keine Rezirkulation zwischen dem Rührkesselreaktor und dem Membranmodul statt. Anschließend wurde die Rezirkulation zwischen dem Rührkessel und dem Membranmodul gestartet und der pH zwischen pH 4,5 und pH 5,5 geregelt. Die Begasung erfolgte anschließend über das Hohlfasermembranmodul am unteren Ende der Einheit in das Lumen. Das Abgas wurde sodann in den Kopfraum des Rührkesselreaktors geleitet und verließ diesen wiederum. Sobald sich die suspendierten Zellen an der Membranoberfläche des Moduls angelagert hatten, wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Die Untersuchungen fanden bei verschiedenen Volumenströmen zur Medienrezirkulation (50 – 500 mL min⁻¹), verschiedenen Verdünnungsraten (0,12 d⁻¹ – 0,96 d⁻¹) und unterschiedlichen Synthesegasvolumenströmen (50 – 500 mL min⁻¹) statt. Die höchste erzielte Ethanolkonzentration lag bei 23,93 g L⁻¹ bei einem Ethanol zu Acetat-Verhältnis von 4,79.

Eine Zellimmobilisierung in einem Monolithen aus Cordierit führten Shen et al. (2014a) durch. Dabei wurde das Trägermaterial in einem zylinderförmigen Plexiglasrohr befestigt und befand sich extern zum 7,5 L-Rührkesselreaktor. Das Arbeitsvolumen des Gesamtsystems betrug 8 L. Analog zu Shen et al. (2014b) befanden sich die Zellen während der ersten 48 h im Rührkesselreaktor bei kontrolliertem pH 6,0 mit

kontinuierlicher Begasung ($\text{CO}:\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{N}_2 = 20:5:15:60$), jedoch ohne Rezirkulation der Flüssigphase zwischen dem Rührkesselreaktor und dem Membranmodul. Nach 48 h wurde die Rezirkulation mit 500 mL min^{-1} gestartet und die Begasung wurde vom Rührkesselreaktor zu einem Mikrodifusor am Boden der Monolitheinheit gewechselt. Das Abgas wurde schließlich in den Kopfraum des Rührkesselreaktors eingebracht und verließ diesen wieder. Nach 15 Tagen war die Biofilmbildung abgeschlossen und der kontinuierliche Betrieb mit Verdünnungsraten von $1,5 - 7,5 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Mit diesem Versuchsaufbau wurden Maximalkonzentration von $4,89 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $3,05 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gewonnen.

Einen kontinuierlichen Tauchtropfkörper verwendeten Shen et al. (2017). Dabei wurde ein horizontal liegender zylindrischer Käfig gefüllt mit Trägermaterial aus Polyethylen zur Hälfte in die Flüssigphase (1,5 L) getaucht, sodass eine kontinuierliche Rotation des Käfigs das abwechselnde Eintauchen in die Flüssigkeit und die Exposition der Füllkörper im Kopfraum bewirkte. Zur Begasung wurde eine Gaszusammensetzung von $\text{CO}:\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{N}_2 = 20:5:15:60$ verwendet. Der pH wurde für die ersten 48 h auf pH 6,0 geregelt, anschließend zwischen pH 4,5 und pH 5,5. Nach 7 Tagen im Satzbetrieb zur Biofilmbildung wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Sie variierten die Drehgeschwindigkeit der Käfigeinheit (5 – 100 rpm), den Absolutdruck im Kopfraum (16,7 – 29,7 psi) sowie die Verdünnungsrate ($0,12 - 2,00 \text{ d}^{-1}$) bei einer spezifischen Oberfläche von 500 m^{-1} und erzielten damit bis zu 7 g L^{-1} Ethanol bei einer Produktivität von $6,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Tabelle 3.3: Gasfermentationsprozesse mit *C. carboxidivorans* in unterschiedlichen Reaktorsystemen.

Reaktorsystem	Gaszusammensetzung, (v/v, %)	pH	Produktkonzentrationen	Referenz
Rührkesselreaktor, Satzverfahren	CO (100)	5,75	1,20 g L ⁻¹ Acetat 5,55 g L ⁻¹ Ethanol 0,30 g L ⁻¹ Butyrat 2,66 g L ⁻¹ Butanol	Fernández-Naveira et al. 2016b
Rührkesselreaktor, Satzverfahren	CO:CO ₂ :H ₂ :N ₂ (20:20:10:50)	5,75	0,5 g L ⁻¹ Acetat 2,7 g L ⁻¹ Ethanol 0,35 g L ⁻¹ Butyrat 1,9 g L ⁻¹ Butanol 0,2 g L ⁻¹ Hexanoat 0,85 g L ⁻¹ Hexanol	Fernández-Naveira et al. 2017a
Rührkesselreaktor, Satzverfahren	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	5,75 (pH ₀)	1,98 g L ⁻¹ Acetat 0,06 g L ⁻¹ Butyrat 3,66 g L ⁻¹ Ethanol 0,52 g L ⁻¹ Butanol	Ukpong et al. 2012
Rührkesselreaktor, kontinuierlich	CO/CO ₂ /H ₂ /N ₂ (16,5:15,5:5:56)	5,85 (pH ₀) >5,25	12 g g _{BTM} ⁻¹ Acetat 2 g g _{BTM} ⁻¹ Ethanol	Ahmed et al. 2006

Reaktorsystem	Gaszusammensetzung, (v/v, %)	pH	Produktkonzentrationen	Referenz
Rührkesselreaktor, kontinuierlich	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	6,0	2,1 g L ⁻¹ Ethanol	Shen et al. 2017
Blasensäulenreaktor, kontinuierlich	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ /CH ₄ (14,7:4,4:16,5:56,8:4,2)	5,8 (0 – 4 d) >5,4 (4 d – Ende)	1,2 g L ⁻¹ Butyrat 1,6 g L ⁻¹ Ethanol	Datar et al. 2004
Blasensäulenreaktor, kontinuierlich	CO/CO ₂ /N ₂ (25:15:60)	5,75 (pH ₀) >5,3	1,6 g L ⁻¹ Ethanol 1,1 g L ⁻¹ Butanol	Rajagopalan et al. 2002
Hohlfasermembran- biofilmreaktor, kontinuierlich	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	6,0 (0 – 2 d) 4,5 – 5,5 (2 d – Ende)	23,98 g L ⁻¹ Ethanol 0,45 g L ⁻¹ Butanol	Shen et al. 2014b
Monolithbiofilmreaktor, kontinuierlich	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	6,0 (0 – 2 d) 4,5 – 5,5 (2 d – Ende)	4,89 g L ⁻¹ Ethanol 3,05 g L ⁻¹ Acetat	Shen et al. 2014a
Tauchtropfkörperreaktor, kontinuierlich	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	6,0 (0 – 2 d) 4,5 – 5,5 (2 d – Ende)	7 g L ⁻¹ Ethanol	Shen et al. 2017

3.4 Bioprozesstechnische Grundlagen

In diesem Kapitel soll auf die Bilanzierung im idealen Rührkesselreaktor, die Kinetik von Wachstum und Produktbildung, sowie die Bilanzierung im Satzverfahren und bei kontinuierlichen Prozessen eingegangen werden. Sofern nicht anders beschrieben, werden diese Beschreibungen vorwiegend nach Chmiel (2011) dargestellt.

3.4.1 Bilanzierung im idealen Rührkesselreaktor

Bioreaktoren werden zur Stoffumwandlung mithilfe von Biokatalysatoren eingesetzt. Ein gängiger Bioreaktor ist der Rührkesselreaktor. Ideale Rührkesselreaktoren werden als isotrop, isotherm und isobar verstanden, das heißt es liegt eine ideale Durchmischung vor, bei der alle physikalischen Eigenschaften des Reaktorinhalts sowie die Reaktionsgeschwindigkeiten räumlich konstant sind. Die Massenbilanz eines idealen Rührkesselreaktors ist in Gleichung (3.21) angegeben.

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V \quad (3.21)$$

c_i	Konzentration der Komponente i, g L^{-1}
V	Reaktionsvolumen, L
$F_{\text{ein}}, F_{\text{aus}}$	Zulaufvolumenstrom beziehungsweise Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
$c_{i,\text{ein}}, c_{i,\text{aus}}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf- beziehungsweise Ablaufvolumenstrom, g L^{-1}
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Basierend auf diesem Prozessmodell lässt sich die Massenbilanz für die unterschiedlichen Betriebsweisen (Satzverfahren, Zulaufverfahren, kontinuierliches Verfahren) lösen. Als Komponenten i werden das Substrat S, das Produkt P und die Biomasse X verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Satzprozesse sowie kontinuierliche Prozesse durchgeführt. Auf die Lösung der Massenbilanzen wird im jeweiligen Kapitel eingegangen.

3.4.2 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Wachstum kann bei Bakterien mit der Zunahme der Zellzahl gleichgesetzt werden. Dabei wird von einem unstrukturierten (keine Substrukturen) und unsegregiertem (Zelleigenschaften als Mittelwerte der Population) Modell ausgegangen. Die Wachstumsrate r_X unter nicht-limitierenden Bedingungen wird wie folgt beschrieben:

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad (3.22)$$

r_X	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
c_X	Biomassekonzentration, g L^{-1}
t	Prozesszeit, h
μ	zellspezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Dadurch wird die zellspezifische Wachstumsrate definiert.

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.23)$$

In der Regel ist das Wachstum jedoch von einer limitierenden Nährstoffquelle, meist einer Kohlenstoffquelle, begrenzt. Der formalkinetische Ansatz nach Monod (1949) liefert dabei eine Sättigungsfunktion nach Gleichung (3.24) für den Zusammenhang zwischen zellspezifischer Wachstumsrate in Abhängigkeit einer limitierenden Substratkonzentration c_S . Dabei gibt die Sättigungskonstante K_S die Konzentration an, bei der die spezifische Wachstumsrate den halbmaximalen Wert annimmt. Bei hohen Werten von c_S im Vergleich zu K_S nähert sich die zellspezifische Wachstumsrate der maximalen zellspezifischen Wachstumsrate an. Wird die Substratkonzentration hoch, kann diese inhibierend wirken und der Ansatz nach Monod muss um eine Inhibierungskonstante K_I erweitert werden (Andrews 1968).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.24)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad (3.25)$$

μ_{\max}	maximale, zellspezifische Wachstumsrate, h^{-1}
c_S	Substratkonzentration, g L^{-1}
K_S	Sättigungskonstante, g L^{-1}
K_I	Inhibierungskonstante, g L^{-1}

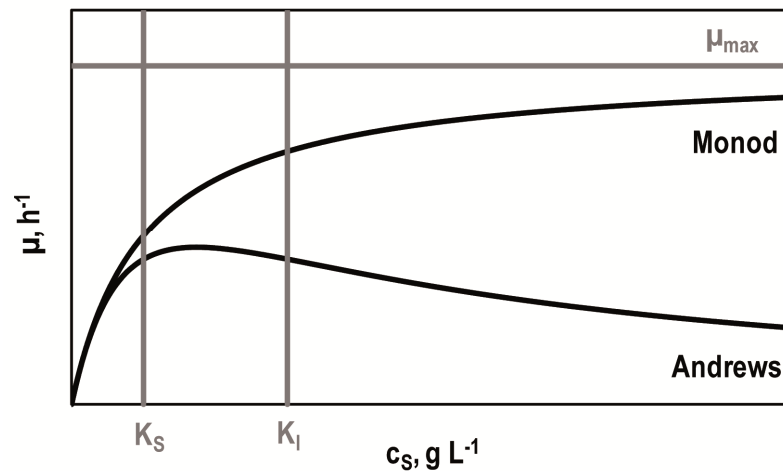


Abbildung 3.8: Sättigungsfunktion mit einem limitierenden Substrat nach Monod (Monod 1949) sowie Funktion der Substratüberschussinhibierung nach Andrews (Andrews 1968).

Analog zur Wachstumsrate können die Bildungs- und Aufnahmeraten für eine Komponente i definiert werden. Dabei bezeichnen r_i (oft auch Q_i) die volumetrischen Raten und q_i die zellspezifischen Raten.

$$r_i = \frac{dc_i}{dt} = q_i \cdot c_X \quad (3.26)$$

r_i volumetrische Aufnahme-/Bildungsrate der Komponente i , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

q_i zellspezifische Aufnahme-/Bildungsrate der Komponente i , $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Mit dem Verhältnis dieser Raten lassen sich die Ausbeutekoeffizienten der Komponente i gegenüber der Komponente j berechnen.

$$Y_{ij} = \frac{dc_i}{dc_j} = \frac{r_i}{r_j} = \frac{q_i}{q_j} \quad (3.27)$$

Y_{ij} spezifischer Ausbeutekoeffizient der Komponente i gegenüber j, $g\ g^{-1}$

3.4.3 Satzbetrieb im Rührkesselreaktor

Als Satzbetrieb wird ein Reaktionssystem verstanden, bei dem die Flüssigphase ein geschlossenes System darstellt und das Reaktionsvolumen nach Prozessbeginn als konstant angenommen wird ($V_R = \text{konst}$; $F_{\text{ein}} = F_{\text{aus}} = 0$). Zugabe von Titrationsmittel zur Korrektur von pH oder Antischaummittel werden vernachlässigt. Das Medium muss bei einem Satzprozess alle zum Wachstum notwendigen Nährstoffe bereitstellen. Die Massenbilanz nach Gleichung (3.21) für die Komponente i (Biomasse X, Substrat S Produkt P) vereinfacht sich bei einem Satzprozess zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.28)$$

Damit lassen sich aus den Konzentrationsänderungen der Komponenten i die Umsatzgeschwindigkeiten als Funktion der Prozesszeit bestimmen. Liegt ausreichend Substrat vor, ist die spezifische Wachstumsrate μ nach dem Modell von Monod maximal und die Lösung der Differentialgleichung (3.23) liefert die Biomassekonzentration c_X in der exponentiellen Wachstumsphase.

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\text{max}} \cdot t} \quad (3.29)$$

$c_{X,0}$ Anfangsbiomassekonzentration, $g\ L^{-1}$

Während dieser exponentiellen Wachstumsphase ist die spezifische Wachstumsrate μ konstant. Dies wird durch halblogarithmische Auftragung der Biomassekonzentration gegenüber der Zeit in der Wachstumskurve (Abbildung 3.9) deutlich (Monod 1949).

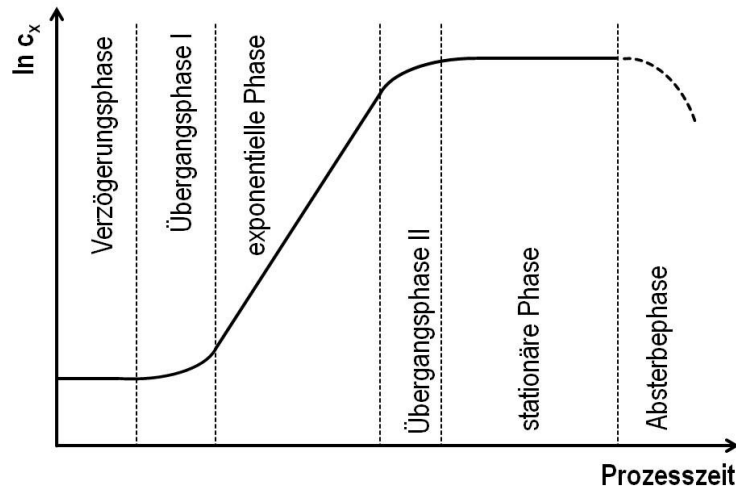


Abbildung 3.9: Darstellung der unterschiedlichen Wachstumsphasen im Satzbetrieb: Verzögerungsphase, Übergangsphase I, exponentielle Phase, Übergangsphase II, stationäre Phase, Absterbephase.

In der Verzögerungsphase, passen sich die Bakterien an die Reaktionsbedingungen an. Wachstum setzt erst in der Übergangsphase I ein. In der exponentiellen Phase findet unlimitiertes Wachstum statt und es stellt sich eine konstante Wachstumsrate (μ_{\max}) ein. Wird das Substrat limitierend, tritt das Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein. Dabei ist c_S nicht mehr viel größer als K_S . Nach dieser Übergangsphase II wird die stationäre Phase erreicht, in dem sich Wachstumsrate und Absterberate der Zellen die Waage halten, wodurch die Biomassekonzentration konstant bleibt. Schließlich überwiegt das Absterben der Zellen durch Lyse und die Biomassekonzentration sinkt (Absterbephase).

3.4.4 Kontinuierliche Prozessführung im Rührkesselreaktor

Kontinuierliche Prozesse sind offene Systeme, bei denen kontinuierlich Zulaufmedium mit Reaktionskomponenten in den Reaktor eingetragen und ein Ablaufstrom kontinuierlich ausgetragen wird. Bei idealer Durchmischung besitzt jedes Flüssigkeitselement im Reaktor dieselbe Zusammensetzung wie im Ablaufstrom. Nach einer gewissen Zeit stellt sich ein Fließgleichgewicht (engl.: *steady state*) ein, bei dem die Konzentrationen für die Komponenten i konstant sind und die Stoffflüsse sich nicht mehr ändern ($dc_i/dt = 0$).

Wenn der Zulauf- und der Ablaufvolumenstrom konstant ist ($F_{\text{ein}} = F_{\text{aus}}$), wird das Volumen im Reaktor konstant und es lässt sich die Verdünnungsrate D definieren. Der Kehrwert der Verdünnungsrate D wird als mittlere hydraulische Verweilzeit τ bezeichnet.

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau} \quad (3.30)$$

D	Verdünnungsrate, h ⁻¹
F	Zulaufvolumenstrom des Zulaufmediums, L h ⁻¹
τ	mittlere hydraulische Verweilzeit, h

Mit der Verdünnungsrate D vereinfacht sich die Massenbilanz zu:

$$r_i = D \cdot (c_{i,\text{aus}} - c_{i,\text{ein}}) \quad (3.31)$$

Unter der gängigen Annahme eines sterilen Zulaufmediums ($c_{X,\text{ein}} = 0$) und der Verwendung von Gleichung ($r_X = \mu \cdot c_X$), entspricht die spezifische Wachstumsrate im Fließgleichgewicht der Verdünnungsrate ($\mu = D$).

Über die Verdünnungsrate (chemostate Betriebsweise) lässt sich die Wachstumsrate einstellen. Wenn $D < \mu$ ist, stellt sich ein stabiler Zustand ein. Wenn $D > \mu$, findet ein Auswaschen der Zellen aus dem Reaktor statt, da diese schneller ausgetragen werden als durch Wachstum neu gebildet werden. Daher kann die Verdünnungsrate nur bis zu einer kritischen Verdünnungsrate D_c in Abhängigkeit der maximalen Substratkonzentration ($c_S = c_{S,\text{ein}}$) erhöht werden.

Der Fließgleichgewichtszustand eines kontinuierlichen betriebenen Rührkesselreaktors tritt ein, wenn 99,9 % der Volumenelemente des Reaktorinhaltes ausgetauscht wurden. Dies ist der Fall, wenn in etwa 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten τ vergangen sind. (Müller-Erlwein 2007).

Eine Rührkesselkaskade entsteht durch Hintereinanderschalten mehrerer kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktoren. Dadurch kann die Aufteilung des Gesamtvolumens in mehrere Kessel mit unterschiedlichem Reaktionsvolumen realisiert werden, In den unterschiedlichen Reaktoren können unterschiedliche Reaktionsbedingungen herrschen. Das System erlaubt die Entkopplung von idealen Reaktionsbedingungen und notwendigen Neben- beziehungsweise Zusatzreaktionen (Storhas 1994). Eine Hintereinanderschaltung von unendlich vielen Reaktoren in einer Kaskade kommt dem kinetischen Verhalten eines idealen Rohrreaktors mit Pfröpfenströmung gleich.

4 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden dargestellt. Genauere Spezifikationen verwendeter Geräte und Materialien finden sich im Anhang in den Abschnitten 10.4 und 10.5, die Zusammensetzungen verwendeter Medienzusätze und Puffer in Abschnitt 10.3 des Anhangs.

4.1 Anaerobes Arbeiten

Für die Kultivierung obligat anaerober Stämme sind anaerobe Arbeitstechniken (Hungate 1976) unerlässlich, um die Anwesenheit von Sauerstoff zu minimieren. Für offene Arbeitsschritte mit *C. carboxidivorans* oder der Herstellung anaerober Lösungen wurde daher mit einer Anaerobwerkbank mit einer flexiblen Plane aus Polyvinylchlorid (Toepfer Laborsysteme GmbH, Göppingen) bei einer Arbeitsatmosphäre aus Formiergas (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff) gearbeitet. Umwälzpumpen sorgten dabei für die kontinuierliche Durchmischung der Gasatmosphäre. Eindringender Sauerstoff wurde an den installierten Palladiumkatalysatoren mit Wasserstoff zu Wasser umgesetzt und an Trockenperlen gebunden. Die Trockenperlen befanden sich dabei in speziellen Einsätzen der Umwälzpumpe (StakPak) und wurden in regelmäßigen Abständen bei einer Temperatur von 170 °C für 7 h in einem Trockenschrank regeneriert. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch Sensoren angezeigt. Die Konzentrationen von Wasserstoff und Sauerstoff innerhalb der Anaerobwerkbank wurden über Gasmessgeräte im ppm-Bereich kontrolliert. Für eine keimarme Umgebung wurden HEPA-Filter (engl.: *high efficiency particulate arrestance filter*) eingesetzt (Speers et al. 2009). Bakterien, Geräte, Verbrauchsmaterial und Medien konnten über zwei unterschiedlich große Schleusen eingebracht, sowie ausgeschleust werden. Dabei wurde die jeweilige Schleuskammer durch dreimaliges Evakuieren und jeweils anschließender Befüllung mit Formiergas für das anaerobe Arbeiten mit den darin befindlichen Materialien vorbereitet. Verbrauchsmaterial aus Kunststoff (zum Beispiel Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen, sterile Einwegspritzen und -kanülen) wurden mindestens 24 h in der Anaerobwerkbank vor Benutzung gelagert, damit sich darin enthaltener Sauerstoff herauslösen konnte.

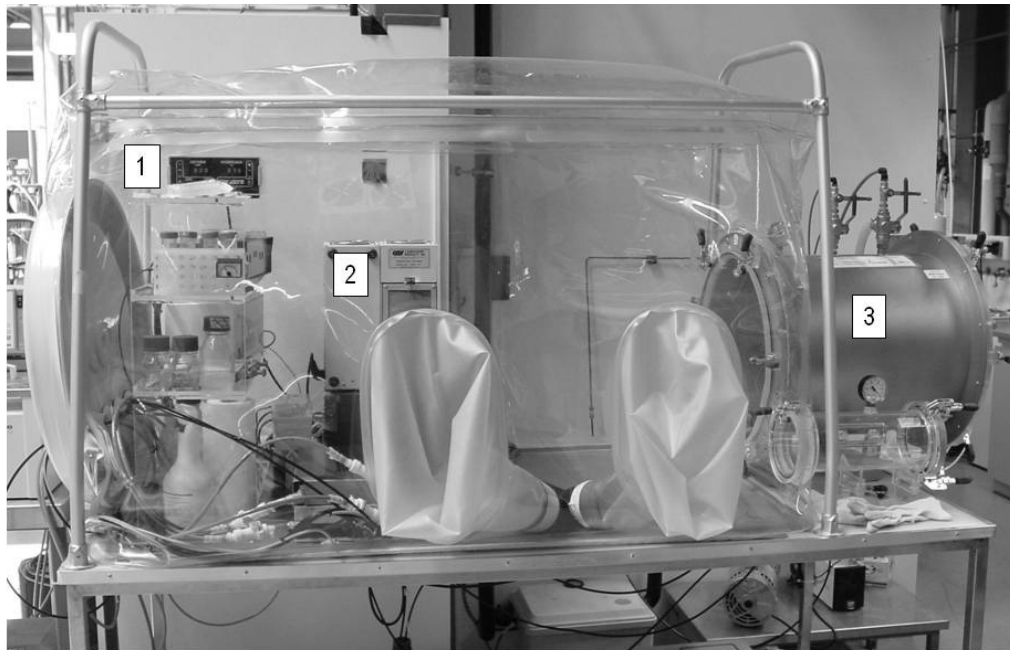


Abbildung 4.1: Anaerobwerkbank mit (1) Gasmessgerät für H_2 und O_2 , (2) Gebläseeinheiten mit Palladium-Katalysatoren und HEPA-Filter, (3) Schleusenkammern.

4.2 Medienherstellung

Für die Kultivierung von *C. carboxidivorans* wurde ein modifiziertes Medium nach Hurst und Lewis (Hurst und Lewis 2010) verwendet. Die Herstellung des Mediums erfolgte nach folgender Zusammensetzung (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des verwendeten Hurst-Mediums für die Gasfermentation mit *C. carboxidivorans*. Die Zusammensetzungen der einzelnen Stammlösungen sind dem Anhang (Abschnitt 10.3) zu entnehmen.

Komponente	Konzentration	Einheit
Mineralienlösung	30,0	mL L ⁻¹
Magnesiumlösung	60,0	mL L ⁻¹
Calciumlösung	60,0	mL L ⁻¹
Spurenelementlösung	10,0	mL L ⁻¹
Vitaminlösung	10,0	mL L ⁻¹
Hefeextrakt	1,00	g L ⁻¹
Cystein-HCl	0,40	g L ⁻¹

Die Medienbestandteile wurden dabei in VE-Wasser gelöst und der pH mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium 20 min lang in Rundkolben auf Heizpilzen gekocht, unter Stickstoffbegasung mit Eiswasserkühlung in Anaerobflaschen anaerobisiert und anschließend gasdicht verschlossen. Weitere Zugabe von Medienbestandteilen, das Auffüllen auf das Zielvolumen mit anaerobem VE-Wasser und die Aliquotierung in verschiedene anaerobe Kulturflaschen erfolgte unter der Anaerobwerkbank. Nach dem Autoklavieren (121 °C, 20 min) wurde L-Cystein-Hydrochlorid als Reduktionsmittel zugefügt.

Zur Herstellung anaerober Stammlösungen (Cystein-HCl, Glucose, PBS; Zusammensetzungen siehe Anhang Abschnitt 10.3) wurden die Mengen der benötigten Chemikalien eingewogen und unter der Anaerobwerkbank mit anaerobem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt, in Anaerobflaschen abgefüllt und mit Butylgummistopfen und Lochkappen verschlossen. Die Anaerobisierung des VE-Wassers erfolgte dabei analog zur Anaerobisierung des Mediums mit Kochen und Stickstoffbegasung unter Eiskühlung. Anschließend wurden die hergestellten Lösungen autoklaviert (121 °C, 20 min) und bei Raumtemperatur gelagert.

4.3 Kultivierung von *Clostridium carboxidivorans*

In diesem Abschnitt werden die Methoden zur Kultivierung mit *C. carboxidivorans* dargestellt. Zunächst wird auf die Stammhaltung sowie die Vorkulturherstellung eingegangen, bevor die Vorgehensweisen zu Satz- und Kaskadenkultivierungen im Rührkesselreaktor sowie zu Parallelkultivierungen in Anaerobflaschen beschrieben werden.

4.3.1 Stammhaltung

Der Stamm *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 wurde von der DSMZ (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben. Zellen wurden in Wilkins-Chalgren Medium gemäß Herstelleranleitung in Anaerobflaschen heterotroph kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase unter der Anaerobwerkbank mit 10 % (v/v) Glycerin als Frostschutzmittel versetzt, in sterile Hungate-Röhrchen zu je 5 mL aliquotiert und verschlossen, und bei -80 °C als Kryokultur stehend eingefroren.

4.3.2 Vorkulturherstellung

Die Vorkulturherstellung mit *C. carboxidivorans* erfolgte heterotroph mit 5 g L^{-1} Glucose in 250 mL Anaerobflaschen mit 50 mL Hurst-Medium und 2,5 mL aufgetauter Kryokultur. Um optimales Wachstum zu gewährleisten, wurde diesem Medium bei der Herstellung 15 g L^{-1} MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) zugesetzt. Nach etwa 21 h Inkubation bei 37 °C befanden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase und waren zur Zellernte bereit. Hierfür wurde die Zellsuspension in 50 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert, bei 4500 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in anaerobem PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung siehe Tabelle 10.1) resuspendiert. Die Inokulation in Anaerobflaschen für Untersuchungen im Parallelansatz beziehungsweise für den Rührkesselreaktor erfolgte sodann mit sterilen Einwegspritzen.

4.3.3 Satzkultivierung im Rührkesselreaktor

Für Rührkesselreaktorprozesse mit kontinuierlicher Begasung im Satzbetrieb wurde der in Abbildung 4.2 dargestellte Kleinlaborfermenter der Firma Bioengineering (KLF2000, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit einem Totalvolumen von 2,4 L und einem Arbeitsvolumen von 1,0 L verwendet. Über seitliche Durchführungen waren pH-Sonde sowie Redoxsonde angebracht. Über den Reaktorboden waren Temperaturfühler sowie Heiz- und Kühlfinger für die Temperierung eingebaut. Am Reaktordeckel war eine Drucksonde eingelassen, zusätzlich war ein mechanisch agierendes Sicherheitsventil angebracht, um Absolutdrücke von 3,8 bar abs (maximaler Betriebsdruck 3,5 bar abs) nicht zu überschreiten. Der Regelkreis bestand aus Drucksonde, einem pneumatisch gesteuerten Druckluftventil in der Abgasstrecke sowie einem PID-Regler zur Regelung des Drucks im Edelstahlkessel. pH, Redoxpotential, Temperatur, Druck und Rührerdrehzahl wurden über eine Steuereinheit ausgelesen und gegebenenfalls über die Software BioSCADA reguliert. Die Einbringung des kontinuierlich eingetragenen Gases erfolgte über ein Begasungsrohr mit Sintermetallfritte. Für eine optimale Dispergierung waren an der Rührwelle zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer angebracht, zudem waren vier Strömungsbrecher in den Reaktor eingelassen. Die Begasung erfolgte über eine externe Gasmischstation der Firma Bronkhorst (Reinach, Schweiz) mit einer Begasungsrate von 5 L h^{-1} des Zielgasgemisches (0,083 vvm). Beim Verlassen des Abgases aus dem Reaktor durchlief dieses einen auf 2 °C temperierten Kondensator, um Verdunstung von Reaktormedium und Produkten zu vermeiden. Das Abgas passierte einen Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) sowie

eine μ -Gaschromatographieeinheit (μ CG 490, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) zur Bestimmung der Gasaufnahmeleistungen.

Der Reaktor wurde *in situ* sterilisiert (121 °C, 20 min) und das extern autoklavierte Medium mit einer Peristaltikpumpe über Anstechgarnituren am Reaktordeckel zugepumpt. Für Kultivierungen im Rührkesselreaktor erfolgte neben der Zugabe des Reduktionsmittels Cys-HCl auch die Zugabe der Vitaminlösung erst nach dem Autoklavieren des Mediums über Einmalspritzen mit Sterilfilter durch Septen am Reaktordeckel in den Reaktor. Die Begasung mit der Zielgas Mischung zur Entfernung von Sauerstoff sowie zur Mediensättigung erfolgte für mindestens 12 h über Nacht. Die Inokulation der Bakterien erfolgte mit einer Biotrockenmassekonzentration von 0,05 g L⁻¹. Sofern notwendig, wurde das Antischaummittel Polypropylenglykol (PPG) mittels steriler Einmalspritzen in Dosen von 0,1 mL (1:10 v/v) zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Temperatur auf 37 °C, die Rührerdrehzahl auf 1200 rpm (entspricht einem volumenbezogenen Leistungseintrag $P V^{-1}$ von 15,1 W L⁻¹), der initiale Start-pH pH_0 mit 3 M NaOH auf pH 6,0 und die Gas Mischung auf 80 % CO und 20 % CO₂ bei einem Absolutdruck von 1,01 bar abs eingestellt. Während des Prozesses wurden in regelmäßigen Abständen Proben über das am Boden des Reaktors befindliche Ablassventil zur Bestimmung der optischen Dichte sowie der Produktkonzentrationen genommen.

Für Untersuchungen zur pH-Kontrolle wurden unter anderem pH-Profile angewandt. Zunächst wurde der pH für 1,0 d oder 2,0 d auf pH 6,0 geregelt, bevor dieser innerhalb von 0,4 d linear auf pH 5,0 abgesenkt wurde. Zur Regelung auf diesen pH wurde ein Totband von 0,05 eingesetzt.

Angegebene Standardabweichungen bei Satzprozessen im Rührkesselreaktor resultieren aus drei sequentiell durchgeführten Experimenten unter identischen Versuchsbedingungen. Hierzu wurden entsprechende Probenahmezeitpunkte der Einzelexperimente zusammengefasst.

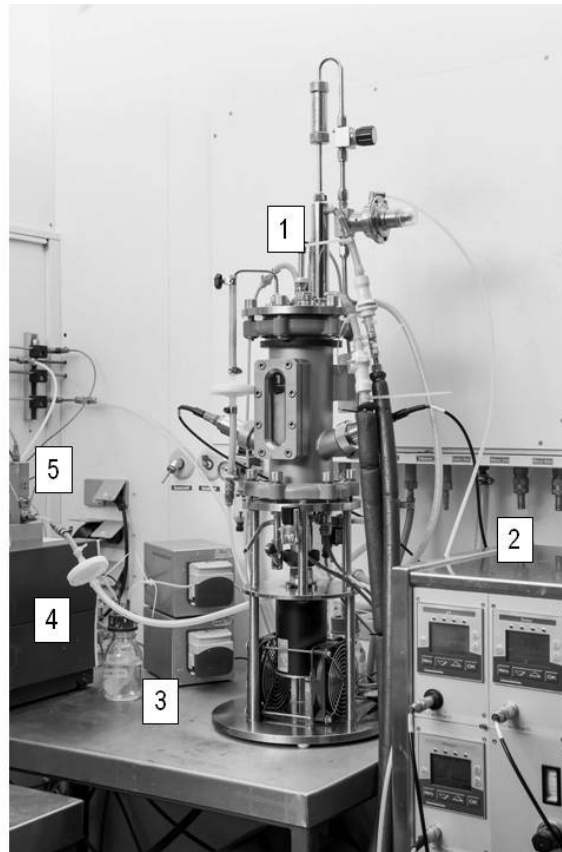


Abbildung 4.2: Darstellung des Rührkesselreaktors KLF2000 für Satzprozesse mit kontinuierlicher Begasung: (1) Rührkesselreaktor, (2) Steuereinheit, (3) Titrationsmittel, (4) μ -Gaschromatographieeinheit, (5) Massendurchflussmesser.

4.3.4 Kaskadenkultivierung im Rührkesselreaktor

Für die kontinuierliche Kultivierung von *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade bestehend aus zwei aufeinander folgenden Reaktoren wurde als erster Reaktor ein Labfors 4 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) mit einem Totalvolumen von 2,0 L bei einem Arbeitsvolumen von 1,0 L verwendet. Als zweiter Reaktor diente der für Satzkultivierungen verwendete und in Abschnitt 4.3.3 bereits beschriebene Laborreaktor KLF2000 mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L. In den Labfors Glasreaktor waren eine pH-Sonde sowie eine Redoxsonde zur Messung dieser Größen eingebaut. Die Temperatur wurde mittels eines Doppelmantels reguliert. Auslesen und Regelung der Parameter pH, Redoxpotential, Temperatur und Rührerdrehzahl erfolgen über die Steuereinheit unter der Regie der IRIS Software. Die Begasung erfolgte analog zum KLF2000 über ein getauchtes Begasungsrohr mit Sintermetallfritte. Neben zwei Sechsstab-Scheibenrührern erfolgte die Durchmischung über drei Strömungsbrecher. Die verwendete Gasmischstation für den Labforsreaktor war die WMR4000 der Firma Westphal Mess- und Regelungstechnik (Ottobrunn). Die Begasung, die Kühlung des

Abgases in der Abgasstrecke sowie die Abgasanalytik aus Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) und μ -Gaschromatographieeinheit (CP-4900, Varian, Darmstadt) erfolgten analog zum KLF2000 (zweiter Reaktor).

Beide Rührkesselreaktoren wurden wie in Abschnitt 4.3.3 bereits beschrieben vorbereitet. Dabei wurde der Glasreaktor des Labfors als Komplettsystem *ex situ* autoklaviert (121 °C, 20 min). Die eingesetzte Gasmischung bestand aus 60 % CO und 40 % CO₂. Zur optimalen Durchmischung und Gasversorgung betragen die Rührerdrehzahlen jeweils 1200 rpm, was volumenspezifischen Leistungseinträgen von 11,8 W L⁻¹ (Labfors, erster Reaktor) beziehungsweise 15,1 W L⁻¹ (KLF2000, zweiter Reaktor) entsprach. Die Begasungsraten betragen jeweils 5 L⁻¹ h⁻¹, was einer Begasungsrate von 0,083 vvm für den ersten Reaktor beziehungsweise von 0,055 vvm für den zweiten Reaktor bedeutete.

Das Zulaufmedium wurde in 5 L-Flaschen bereitgestellt. Dieses war, sofern nicht anders angegeben mit dem vorgelegten Reaktormedium identisch, zur Vermeidung von Schaumbildung wurde diesem Zulaufmedium 0,5 mL L⁻¹ Antischaummittel (Polypropylenglykol, 1:10) zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde es mit einer Gasmischung aus 80 % N₂ und 20 % CO₂ anaerobisiert. Dabei wurden spezielle Flaschendeckel mit drei Durchführungen (Gaszufuhr, Gasabfuhr, zusätzlicher Anschluss zum Zupumpen von Medienbestandteilen) verwendet, an denen oberen Ende wiederum Schnellverschlusskupplungen angebracht waren. Silikonschläuche ragten auf der Unterseite der Anschlüsse bis zum Flaschenboden, um das Medium begasen zu können, sowie das Hinauspumpen des Mediums sicherzustellen. Das Reduktionsmittel Cys-HCl wurde nach der Begasung aus einer mit Butylgummiseptum und Lochkappe verschlossenen Anaerobflasche mit einer Peristaltikpumpe zugeführt. Die Lagerung des Zulaufmediums erfolgte bei 4 °C.

Das Fließschema der kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade mit kontinuierlicher Begasung ist in Abbildung 4.3 und ein Foto in Abbildung 4.4 dargestellt. Der erste Reaktor wurde auf pH 6,0 geregelt, um optimales Wachstum der Zellen mit Säurebildung zu gewährleisten, der zweite Reaktor wurde auf pH 5,0 geregelt, um günstige Bedingungen für die Solventogenese zu bieten. Als Titrationsmittel wurde 6 M NaOH beziehungsweise 2 M H₂SO₄ verwendet mit einer einseitigen pH-Kontrolle im ersten Reaktor mit Base und einer beidseitigen pH-Regulation mit Säure und Base bei einem Totband von 0,1 im zweiten Reaktor. Zur Sicherstellung des Zellwachstums wurde nach Inokulation des ersten Reaktors mit einer Biotrockenmassekonzentration von 0,05 g L⁻¹ der Prozess für 10 h im Satzbetrieb gefahren, bevor der kontinuierliche Betrieb der

Flüssigphase mit anaerobem Zulaufmedium für den ersten Reaktor mit einer Peristaltikpumpe (Ismatec, Cole Parmer, Wertheim) gestartet wurde.

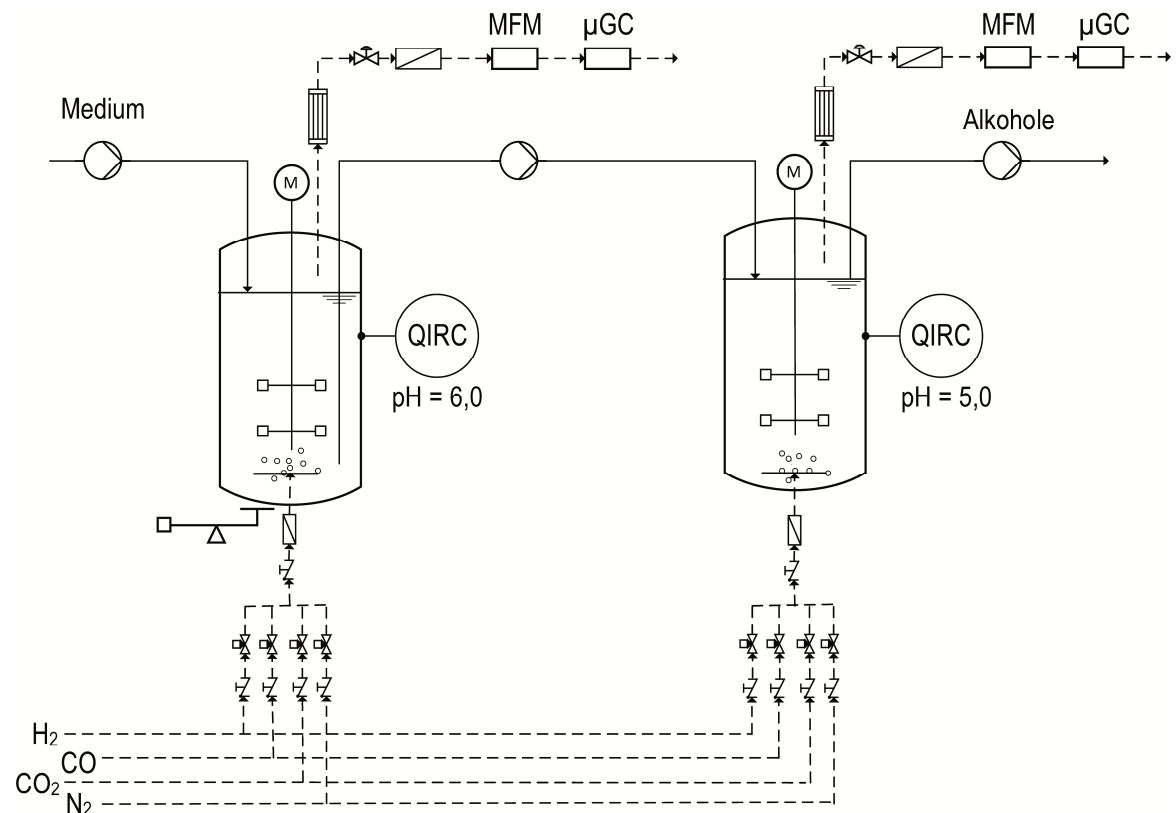


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade mit kontinuierlicher Begasung. Durchgezogene Linien verdeutlichen die Flüssigkeitsströme, gestrichelte Linien die Gasströme. Dargestellt sind der Zulaufmedienstrom für den ersten Reaktor (Medium) und der Produktstrom aus dem zweiten Reaktor (Alkohole). Die Qualitätsgröße des pH wurde im ersten Reaktor auf pH 6,0 geregelt, der pH im zweiten Reaktor auf pH 5,0 geregelt (QIRC). Über Massendurchflussregler für die Gase H_2 , CO , CO_2 und N_2 wurde die Gaszufuhr für die beiden Reaktoren eingestellt, Gasverbrauch wurde über einen Massendurchflussmesser (MFM) in Kombination mit einer μ -Gaschromatographieeinheit (μ GC) in der Abgasstrecke für jeden Reaktor bestimmt. Die Volumenkonstanz im ersten Reaktor wurde gravimetrisch reguliert. Bei Abweichen um 0,5 % wurde der Ablaufvolumenstrom automatisiert angepasst.

Zur Aufrechterhaltung des Volumenstroms war die 5 L-Zulaufmedienflasche mit einem flexiblen, Stickstoffreservoir (Plastigas, Carl Roth, Karlsruhe) verbunden, welcher über ein Septum in regelmäßigen Abständen mit Stickstoff wiederaufgefüllt werden konnte. Es wurden gasdichte Schläuche (ID = 0,89 mm, Cole Parmer, Wertheim) verwendet, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Der Ablaufvolumenstrom vom ersten Reaktor wurde über eine in dem Laborfermentersystem integrierte und ansteuerbare Pumpe geregelt. Dabei wurde während der gesamten Kultivierungsdauer das Gewicht des

ersten Reaktor gemessen und der Ablaufvolumenstrom vom ersten Reaktor bei Abweichung von über $\pm 0,5\%$ über eine hinterlegte Sequenz angepasst. Der zweite Reaktor erhielt dabei kontinuierlich zell- und säurehaltige Fermentationsbrühe aus dem ersten Reaktor zur Bildung von Alkoholen. Das Arbeitsvolumen von 1,5 L im zweiten Reaktor wurde über den kontinuierlichen Eintrag von Kulturbrühe aus dem ersten Reaktor zu dem bereits vorgelegten 1,0 L Medium im zweiten Reaktor erreicht. Bei Erreichen des Flüssigkeitsstands für 1,5 L im zweiten Reaktor sorgte eine Oberflächenabsaugung für die Volumenkonstanz. Hierzu die ebenso die Zulaufmediumpumpe für den ersten Reaktor benutzt und ein Schlauch mit größerem Innendurchmesser (ID = 2,06 mm, Cole Parmer, Wertheim) in einen weiteren Kanal der Pumpe eingespannt. Der Ablauf aus dem zweiten Reaktor wurde in autoklavierten 5 L-Flaschen gesammelt. In regelmäßigen Abständen wurden in beiden Reaktoren Proben mit sterilen Einmalspritzen und -kanülen über im Reaktordeckel befindliche Septen genommen.

Eingetragene Standardabweichungen bei Verläufen von Rührkesselkaskadenprozessen resultieren aus zwei sequentiell durchgeführten Experimenten unter identischen Versuchsbedingungen. Hierzu wurden entsprechende Probenahmezeitpunkte der Einzelexperimente zusammengefasst und die Standardabweichung in x- sowie y-Richtung bestimmt.

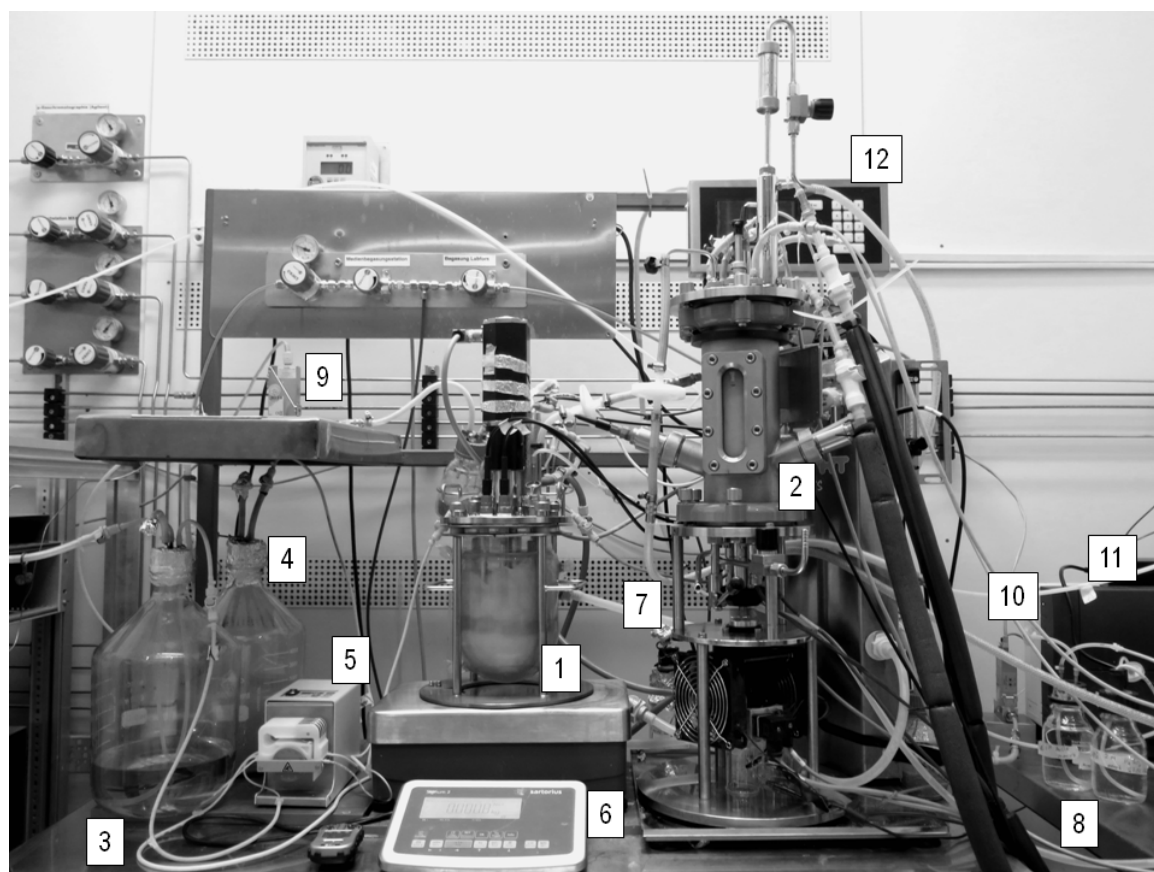


Abbildung 4.4: Foto der Kaskade aus zwei Rührkesselreaktoren mit kontinuierlicher Begasung: (1) erster Rührkesselreaktor, (2) zweiter Rührkesselreaktor, (3) Vorlageflasche für das Zulaufmedium für den ersten Reaktor, (4) Ablaufflasche für den Produktstrom aus dem zweiten Reaktor, (5) Zulaufmedienpumpe für den ersten Reaktor und den Ablaufstrom aus dem zweiten Reaktor, (6) Waage zur Kontrolle der Volumenkonstanz im ersten Reaktor, (7) Titrationsmittel des ersten Reaktors, (8) Titrationsmittel des zweiten Reaktors Massendurchflussmesser des ersten Reaktors, (9) Massendurchflussmesser des ersten Reaktors, (10) Massendurchflussmesser des zweiten Reaktors, (11) μ -Gaschromatographieeinheit des zweiten Reaktors, (12) Steuereinheit des ersten Reaktors. Nicht dargestellt sind das flexible Stickstoffreservoir, die μ -Chromatographieeinheit des ersten Reaktors sowie die Steuereinheit des zweiten Reaktors.

4.3.5 Parallelkultivierungen in Anaerobflaschen

Parallelkultivierungen wurden in 500 mL Anaerobflaschen durchgeführt, wobei das Arbeitsvolumen 100 mL betrug und das Medium zusätzlich 15 g L^{-1} MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) enthielt. Zur Einstellung der Gasphase wurden die mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossenen Flaschen mit autoklaviertem und anaerobem Medium zunächst einige Minuten mit der Gasmischung gespült, bevor dreimal hintereinander 1 bar Überdruck beaufschlagt wurde und jeweils wieder abgelassen wurde. Zuletzt wurde 1 bar Überdruck zur Kultivierung beibehalten.

Parallelansätze wurden zu einer Biotrockenmassekonzentration von $0,025 \text{ g L}^{-1}$ mit sterilen Einmalspritzen und -kanülen über das Butylgummiseptum inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 100 rpm im Schüttelinkubator (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. In regelmäßigen Abständen wurden Proben mit Einmalspritzen genommen, um Biomasse, pH und Produktkonzentrationen bestimmen zu können. Zur Messung des Flaschendrucks wurde ein Manometer verwendet.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit einem Einstrahlphotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Neuss) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei Werten über 0,3 wurde entsprechend mit PBS verdünnt, um im linearen Bereich des Photometers zu bleiben.

Mittels eines experimentell bestimmten Korrelationsfaktors siehe Gleichung (4.1) wurde die optische Dichte zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration herangezogen. Hierzu wurden Bakterien gemäß der Vorkulturherstellung in Abschnitt 4.3.2 kultiviert, auf eine optische Dichte von 10 aufkonzentriert (4500 rpm, 10 min) und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die optische Dichte wurde jeweils dreifach gemessen; ebenso wie die Biotrockenmasse im dreifachen Ansatz gravimetrisch bestimmt, indem abzentrifugiertes Zellpellet (13000 rpm, 10 min) in zuvor getrockneten und gewogenen 2 mL Reaktionsgefäßen bis zur Massenkonstanz bei $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet wurde und die Massendifferenz der mit Zellen gefüllten und der zuvor leeren Reaktionsgefäße bestimmt wurde, um das Gewicht des Zellpellets zu erhalten. Die Auftragung der Biotrockenmassekonzentration gegenüber der optischen Dichte lieferte den experimentell bestimmten Faktor von $0,48 \text{ g L}^{-1}$.

$$c_x = k \cdot \text{OD} \quad (4.1)$$

c_x Biotrockenmassekonzentration, g L^{-1}

k Korrelationsfaktor, g L^{-1}

OD optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm, -

4.4.2 Produktbestimmung mittels HPLC

Konzentrationsbestimmung der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, Hexansäure und Hexanol erfolgte über HPLC (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie). Fermentationsproben wurden hierzu abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min), der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm Spritzenfilter, Carl Roth, Karlsruhe) und bis zur Analytik bei 4 °C in Rollrandfläschchen dicht verschlossen. Für die Bestimmung von Hexanol wurde zusätzlich eine Aufkonzentrierung vorgenommen. Zu sterilfiltrierten Proben wurde Ethylacetat (1:4) zugegeben und 15 min bei 25 s⁻¹ geschüttelt, bevor die Phasen über Zentrifugation (13000 rpm, 3 min) getrennt wurden und die obere Phase zur Messung herangezogen wurde. Zur Messung wurde das Finnigan Surveyor Plus System (Thermo Fisher, Waltham, USA) mit einem Brechungsindexdetektor (RI) verwendet. Als stationäre Phase wurde eine HPX-87H-Säule (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet mit einer vorgeschalteten Vorsäule (Micro-Guard Cation H Cartridge Säule, Bio-Rad, München, Deutschland). Messungen wurden bei 40 °C bei einer Flussrate von 0,6 mL min⁻¹ des Laufmittels 5 mM H₂SO₄ durchgeführt. Injektionsvolumen der Proben waren 10 µL. Über externe Standards wurden aus den integrierten Peakflächen die Konzentrationen der Produkte bestimmt.

4.4.3 Abgasanalytik zur Bestimmung von Gasaufnahme

Die Gasmischungen zur kontinuierlichen Begasung der Reaktoren wurden über externe Gasmischstationen mithilfe von Massendurchflussreglern für die einzelnen Gase H₂, CO, CO₂ und N₂ zusammengesetzt.

Zur Bestimmung der Gasaufnahme wurde ein auf N₂ kalibrierter Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) und eine µ-Gaschromatographieeinheit (µCG 490, Säulentyp: 1m COX Heated Injector mit Backflush, Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt.

Von Massendurchflussmessern ausgelesene Volumenströme von Gasmischungen mit verschiedenen Gaskomponenten weisen aufgrund der Gaskonversionsfaktoren der Einzelgase und in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Gasmischung Unterschiede zu den tatsächlichen Volumenströmen auf. Eine Umrechnung des ausgelesenen Volumenstroms F_{N_2} in den tatsächlichen Volumenstrom F_{Abgas} ist dabei unter Zuhilfenahme des Mischgaskonversionsfaktor MGK unerlässlich.

$$F_{Abgas} = MGK \cdot F_{N_2} \quad (4.2)$$

F_{Abgas}	tatsächlicher Abgasvolumenstrom, L h^{-1}
MGK	Mischgaskonversionsfaktor, -
F_{N_2}	ausgelesener Stickstoffvolumenstrom, L h^{-1}

Dabei berechnet sich der Mischgaskonversionsfaktor über die Gaskonversionsfaktoren der einzelnen Gase.

$$\text{MGK} = \frac{100}{\sum \frac{v_i}{G_{f,i}}} \quad (4.3)$$

v_i	Volumenanteil des Gases i, %
$G_{f,i}$	Gaskonversionsfaktor des Gases i, -

Die Gaskonversionsfaktoren wurden empirisch über eine Korrelation von eingestellten Volumenströmen eines Einzelgases i und der vom Massendurchflussmesser ausgegebenen Volumenströme in Bezug auf Stickstoff ermittelt (Stickstoff: $G_{f,\text{N}_2} = 1,00$).

Die Bestimmung der Volumenanteile jedes Einzelgases i wurde über eine externe Kalibrierung der μ -Gaschromatographieeinheit (μGC) mit verschiedenen eingestellten Gaszusammensetzungen bei einem Volumenstrom von 5 L h^{-1} nach jeweils 30 min durchgeführt. Die Messbedingungen sind Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die Abgaszusammensetzung wurde regelmäßig von der μGC bestimmt und die daraus erhaltenen Peakflächen für die Gase mit den eingestellten Gasanteilen korreliert. Damit konnten die prozentualen Gasanteile der jeweiligen Gase i aus den aufgezeichneten Abgasdaten der μGC bestimmt werden.

Durch Multiplikation der prozentualen Gasanteile für jedes Gas i mit dem tatsächlichen Abgasstrom wurden die Abgasmassenströme der einzelnen Gase i zum Zeitpunkt t bestimmt. Eine Differenz der eingestellten Massenströme am Reaktoreingang und der bestimmten Massenströme am Reaktorausgang lieferte die volumetrische Gasaufnahme r_i der einzelnen Gase i durch die Bakterien zum Zeitpunkt t.

Tabelle 4.2: Einstellungen für die μ -Gaschromatographie. (μ CG 490, Trennsäule: 1m COX Heated Injector mit Backflush).

Parameter	Einstellung
Trägergas	Stickstoff
Temperatur Injektor	80 °C
Temperatur Säule	80 °C
Temperatur Probestrecke	50 °C
Injektionszeit	60 ms
Backflush	50 s
Initialdruck	200 kPa
Probenfrequenz	100 Hz
Laufzeit	3 min
Probezeit	30 s

Zur Berechnung der Kohlenstoffbilanz wurde die fixierte Kohlenstoffmenge in den gebildeten Produkten und Biomasse zur Kohlenstoffmenge aus der Gasaufnahme von CO und CO₂ unter Berücksichtigung von eingesetztem Hefeextrakt und Cystein-Hydrochlorid ins Verhältnis gesetzt.

4.4.4 Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsraten und Ausbeuten

Zur Ermittlung der Wachstumsraten und Produktbildungsraten in Satzprozessen wurden die offline bestimmten Biotrockenmassekonzentrationen und Produktkonzentrationen mithilfe nichtlinearer Regressionen (exponentiell, sigmoidal) interpoliert. Die ersten Ableitungen dieser resultierenden Ausgleichsfunktionen wurden zur Abschätzung der spezifischen Wachstumsrate und der volumetrischen Produktbildungsraten herangezogen siehe Gleichungen (4.4) – (4.5).

$$\mu = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (4.4)$$

$$Q_{P_i} = \frac{dc_{P_i}}{dt} \quad (4.5)$$

μ zellspezifische Wachstumsrate, h⁻¹

c_x Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t, g L⁻¹

c_x Biomassekonzentration, g L^{-1}

t Prozesszeit, d

Q_{P_i} volumetrische Produktbildungsrate des Produkts i , $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$

Die Abschätzung der zellspezifischen Produktbildungsrate q_{P_i} für jedes Produkt P_i erfolgte wie folgt:

$$q_{P_i} = \frac{1}{c_x} \frac{dc_{P_i}}{dt} \quad (4.6)$$

q_{P_i} zellspezifische Produktbildungsrate des Produkts i , $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$

Zellspezifische Produktausbeuten $Y_{P_i/X}$ wurden gemäß Gleichung (4.7) für jedes Produkt i bezogen auf die Biotrockenmassekonzentration c_x bestimmt.

$$Y_{P_i/X} = \frac{c_{P_i}}{c_x} \quad (4.7)$$

Alkohol zu Säure-Verhältnisse wurden über Division der gebildeten Alkoholmenge und der korrespondierenden Säuremenge bestimmt. Raum-Zeit-Ausbeuten wurden für Satzprozesse über die erzielte Produktkonzentration bezogen auf die Prozesszeit bestimmt.

In kaskadierten Prozessen wurden die Raum-Zeit-Ausbeuten RZA von Biomasse X und den Produkten P_i (entspricht den volumetrischen Bildungsraten r_i) basierend auf Gleichung (3.31) für den ersten Reaktor (R1), den zweiten Reaktor (R2) und den Gesamtkaskadeprozess wie folgt bestimmt:

$$RZA_{X,R1} = D_{R1} \cdot c_{X,R1} \quad (4.8)$$

$$RZA_{X,R2} = D_{R2} \cdot (c_{X,R2} - c_{X,R1}) \quad (4.9)$$

$$RZA_{P_i,R1} = D_{R1} \cdot c_{P_i,R1} \quad (4.10)$$

$$RZA_{P_i,R2} = D_{R2} \cdot (c_{P_i,R2} - c_{P_i,R1}) \quad (4.11)$$

$$RZA_{X,Kaskade} = D_{total} \cdot c_{X,R2} \quad (4.12)$$

$$RZA_{P_i,Kaskade} = D_{total} \cdot c_{P_i,R2} \quad (4.13)$$

mit einer Verdünnungsrate des gesamten Kaskadenprozesses D_{total} von:

$$D_{\text{total}} = \frac{F}{V_{R_1} + V_{R_2}} \quad (4.14)$$

$RZA_{X,R_1}/RZA_{X,R_2}$ Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse im ersten/zweiten Reaktor, $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$

$RZA_{P_i,R_1}/RZA_{P_i,R_2}$ Raum-Zeit-Ausbeute von Produkt i im ersten/zweiten Reaktor, $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$

$RZA_{X,\text{Kaskade}}$ Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse der Kaskade, $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$

$RZA_{P_i,\text{Kaskade}}$ Raum-Zeit-Ausbeute von Produkt i der Kaskade, $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$

D_{total} Verdünnungsrate des gesamten Kaskadenprozesses, h^{-1}

F Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}

V_{R_1}, V_{R_2} Reaktionsvolumen im ersten beziehungsweise zweiten Reaktor, L

Das Erreichen des Gleichgewichtszustands (Annahme: nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten) wurde für die Gesamtkaskade unter der Bestimmung der Gesamtverweilzeit τ_{gesamt} festgelegt. Diese berechnete sich zu:

$$\tau_{\text{gesamt}} = \frac{V_{R_1} + V_{R_2}}{F} \quad (4.15)$$

τ_{gesamt} Verweilzeit der Gesamtkaskade, h

4.4.5 Bestimmung der CO-Inhibierungskinetik

Zur Bestimmung der CO-Inhibierungskinetik wurden für unterschiedliche CO-Eingangspartialdrücke die spezifische Wachstumsraten in der exponentiellen Phase bestimmt. Diese wurden gegenüber den CO-Partialdrücken aufgetragen, wobei die einzelnen CO-Partialdrücke aus dem Mittelwert der jeweils während der exponentiellen Wachstumsphase vorliegenden CO-Partialdrücke bestimmt wurden ($\overline{p_{CO}}$), da dieser dem CO-Partialdruck entspricht, dem die Bakterien ausgesetzt sind. Basierend auf den Daten wurde eine Substratüberschussinhibierungskinetik erstellt.

Dazu wurde der Ansatz nach Andrews (1968) um einen dimensionslosen Sensitivitätsfaktor φ ergänzt siehe Gleichung (4.16) (Pfaffinger et al. 2016), da die Substratinhibierungskinetik nach Andrews die Daten im Bereich der Inhibierung nicht gut widerspiegelte. φ ermöglicht eine Aussage über die Sensitivität der Bakterien gegenüber hohen CO-Partialdrücken und entspricht dabei der negativen Steigung der CO-abhängigen Wachstumskinetik im Wendepunkt des CO-inhibierten Bereichs der Kinetik, also bei $p_{CO} = K_I$ (Pfaffinger 2017). Der CO-Partialdruck stellt dabei die Substratkonzentration dar ($c_S = \overline{p_{CO}}$). Die Identifikation der formalkinetischen Parameter (K_S , K_I , μ_{max} , φ) dieser Inhibierungskinetik erfolgte mit nichtlinearer Regression aus den Originaldaten. Dazu wurde in der Software MATLAB R2107b die Methode *nonlinearLeastSquares* mit dem Trust-Region-Algorithmus verwendet und anschließend die 95 %-Konfidenzintervalle ausgegeben.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S + c_S \cdot \left(\frac{c_S}{K_I}\right)^\varphi} \quad (4.16)$$

5 Parameterstudien im Satzprozess

5.1 Referenzprozess

Zunächst wurde ein autotrophes Satzverfahren als Referenzprozess mit *Clostridium carboxidivorans* im kontinuierlich begasten, vollständig kontrollierten 1 L-Rührkesselreaktor basierend auf Literaturangaben etabliert. Als Kultivierungsmedium wurde das Medium nach Hurst (Hurst und Lewis 2010) in leicht abgeänderter Form verwendet. Dabei wurde als Reduktionsmittel nur L-Cystein-Hydrochlorid (Cys-HCl) eingesetzt, da Natriumsulfid in wässrigem Medium zu H₂S umgesetzt und in kontinuierlich begasten Reaktoren ausgetragen werden würde. Gleichzeitig wurde auf den Puffer 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) verzichtet. Der Satzprozess wurde bei 37 °C durchgeführt. Der Start-pH wurde auf pH 6,0 eingestellt, da hier günstige Bedingungen für das Wachstum von *C. carboxidivorans* vorliegen (Liou et al. 2005), und wurde nicht geregelt. Das gasförmige Substrat wurde über eine Gasmischung aus CO:CO₂ (80:20, v/v) bereitgestellt und mit einem Gasvolumenstrom von 5 L L⁻¹ h⁻¹ in den Rührkesselreaktor eingetragen. Um eine gute Dispergierung der Gasphase zu gewährleisten, wurde die Rührerdrehzahl auf 1200 rpm ($P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$) eingestellt.

Abbildung 5.1 zeigt die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration, des pH und der Produkte dreier unabhängig voneinander durchgeführter Satzprozesse. Nach Inokulation erfolgte sofortiges exponentielles Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Im stationären Zustand wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $0,45 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Mit Einsetzen des Wachstum direkt nach Inokulation fand die Acetatbildung bis auf eine Maximalkonzentration von $0,91 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ nach 1,0 d Prozesszeit statt, welche von einem starken pH-Abfall von pH 6,0 auf pH 4,4 begleitet war. Von Beginn an wurde auch die Bildung von Ethanol beobachtet, welche nach einer Kultivierungszeit von 3,3 d mit $1,21 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ ihr Maximum erreichte und danach geringfügig abnahm. Acetat wurde unmittelbar nach Erreichen eines pH von 4,5 wieder aufgenommen. Die Acetatkonzentration fiel auf $0,31 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ ab und der pH stieg wieder an. Mit dem leichten Anstieg der Acetatkonzentration zwischen 2,0 d – 6,0 d fiel der pH analog dazu wiederum ab. Die Säuren Butyrat und Hexanoat wurden nur in geringem Umfang gebildet (Maximalwerte: $c_{\text{Butyrat}} = 0,21 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, $c_{\text{Hexanoat}} = 0,07 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$). Deren Bildung setzte zu einem späteren Zeitpunkt ein (1,0 d beziehungsweise 3,3 d). Ähnliches zeigte sich für die länger-kettigen Alkohole Butanol und Hexanol mit Maximalkonzentrationen von $c_{\text{Butanol}} = 0,44 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ und $c_{\text{Hexanol}} = 0,15 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ nach 3,0 d beziehungsweise 3,4 d Prozesszeit.

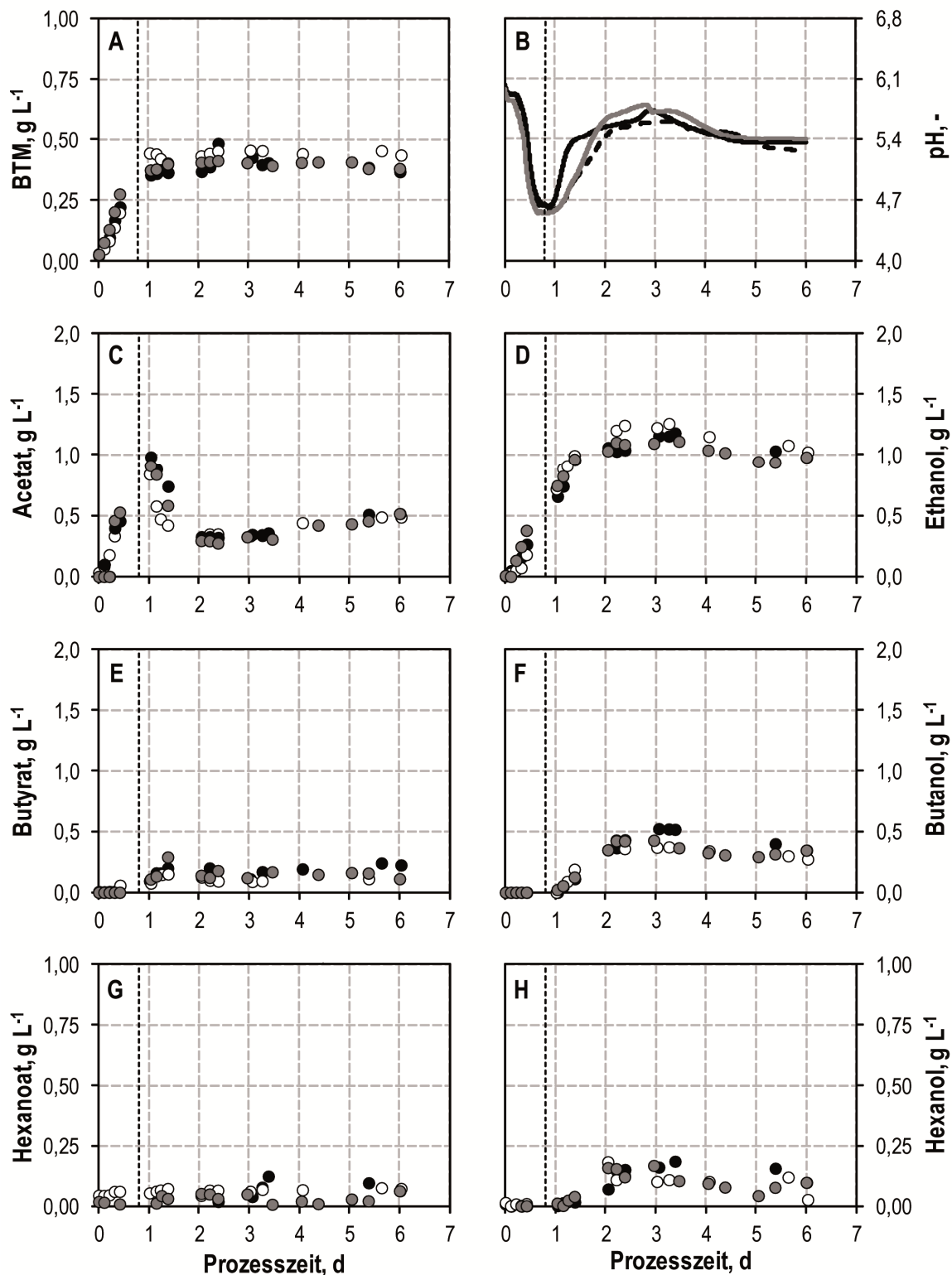


Abbildung 5.1: Autotrophe Satzkultivierungen ($n = 3$) mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit einer Gaszusammensetzung von $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$ unter pH unkontrollierten Bedingungen mit den Verläufen für die Biotrockenmassekonzentration (BTM), des pH und der Produktkonzentrationen. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($T = 37\text{ °C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

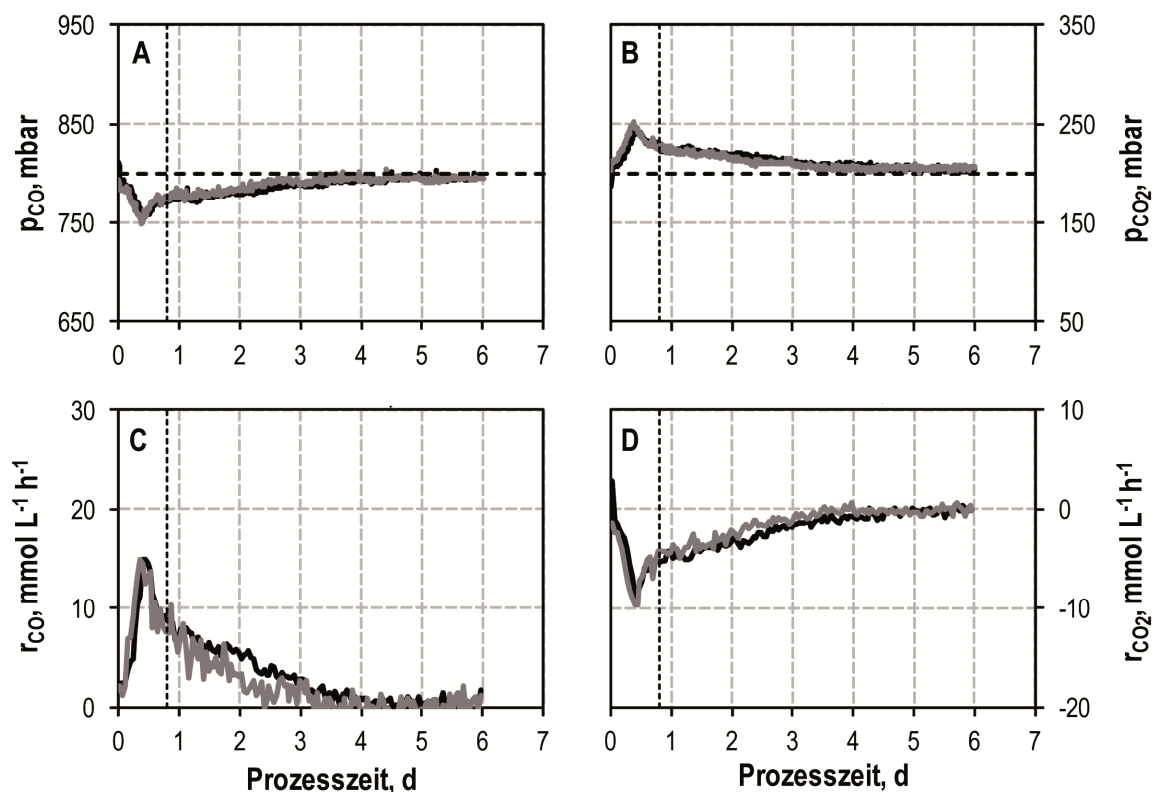


Abbildung 5.2: Abgasanalytik bei zwei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit einer Gaszusammensetzung von $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$ unter pH unkontrollierten Bedingungen mit den Verläufen für den CO -Partialdruck (p_{CO}), CO_2 -Partialdruck (p_{CO_2}) und die volumetrischen Gasaufnahme- und Gasabgaberraten für CO und CO_2 (r_{CO} , r_{CO_2}). Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($T = 37\text{ °C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

Der Gasverbrauch während dieser autotrophen Prozesse wurde mittels *online* Abgasanalytik gemessen. Die Ausgangspartialdrücke der Gase CO und CO_2 und deren volumetrische Gasaufnahme- und Gasabgaberraten sind exemplarisch für zwei Satzversuche in Abbildung 5.2 dargestellt. Dabei entspricht eine negative Gasabgabe einer Gasbildung. Auf den Ausgangspartialdrücken basierend ließen sich die volumetrischen Gasaufnahme- und Gasabgaberraten der Gase CO und CO_2 mithilfe des Abgasvolumenstroms bestimmen. Bereits nach 0,4 d Prozesszeit wiesen die Gasabgaberraten für CO und die Gasbildungsraten für CO_2 mit Werten von $15\text{ mmol L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ beziehungsweise $9\text{ mmol L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ihre Maxima auf. Danach nahmen die Bakterien zwar weiterhin CO unter Nettobildung von CO_2 auf, jedoch in einem geringeren Maße, bis die Gasabgabe etwa nach 4,0 d Prozesszeit zum Erliegen kam.

Diskussion

Anhand der Produktbildung sowie des pH-Verlaufs sind unterschiedliche Prozessphasen zu erkennen. Dabei korreliert der pH-Verlauf mit der Acetatbildung und dessen Umsetzung. Die acidogene Phase findet sich daher im Zeitraum der Acetatbildung wieder. Acetat ist aufgrund seiner gebildeten Maximalkonzentration gegenüber Butyrat und Hexanoat das Hauptsäureprodukt. Das Einsetzen der solventogenen Phase kann mit dem Wiederanstieg des pH definiert werden. Dabei herrscht jedoch keine scharfe Trennung zur vorausgegangenen acidogenen Phase, da die Ethanolbildung bereits vor dem Erreichen der maximalen Acetatkonzentration beziehungsweise dem Erreichen des pH-Minimums einsetzt. Auch bei den Alkoholen ist der C2-Alkohol Ethanol gegenüber den längerkettigen C4- beziehungsweise C6-Alkoholen Butanol und Hexanol das Hauptprodukt. Die Butanol- und Hexanolbildung findet nur in der solventogenen Phase statt.

Die abgeschätzten volumetrischen sowie zellspezifischen Produktbildungsraten sind in Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4 dargestellt. Diese zeigen, dass Acetat und Ethanol die zuerst gebildeten Stoffwechselprodukte sind. Dabei weist Acetat nach einer Prozesszeit von 0,4 d seine maximale volumetrische Produktbildungsrate von $1,67 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf. Das zweite Stoffwechselprodukt stellt Ethanol dar, welches gegenüber Acetat eine geringere maximale volumetrische Produktbildungsrate aufweist ($0,95 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Faktor 0,6). Die Bildung von Butyrat setzt ein, wenn die Bildung des Acetats sein Maximum durchlaufen hat und erreicht mit einem Wert von $0,38 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ einen im Vergleich zu Acetat deutlich geringeren Maximalwert. Die maximale volumetrische Produktbildungsrate für Butanol liegt mit $0,40 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ im selben Größenbereich. Dieser Wert wird wiederum erst nach Durchschreiten der maximalen volumetrischen Produktbildungsrate für Butyrat nach einer Prozesszeit von 1,9 d erlangt. Mit diesen Werten spielen die C4-Produkte gegenüber den C2-Produkten, insbesondere gegenüber Acetat eine untergeordnete Rolle im Produktspektrum. Das Einsetzen der Hexanoatbildung setzt ein, nachdem die Produktbildungsrate für Butanol sein Maximum durchschritten hat und erreicht bei einer Prozesszeit von 3,0 d ein Maximum ($0,06 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Für Hexanol liegt die maximale volumetrische Produktbildungsrate bei $0,25 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Damit fällt wiederum die Bildung der C6-Produkte Hexanoat und Hexanol gegenüber den C4-Produkten geringer aus.

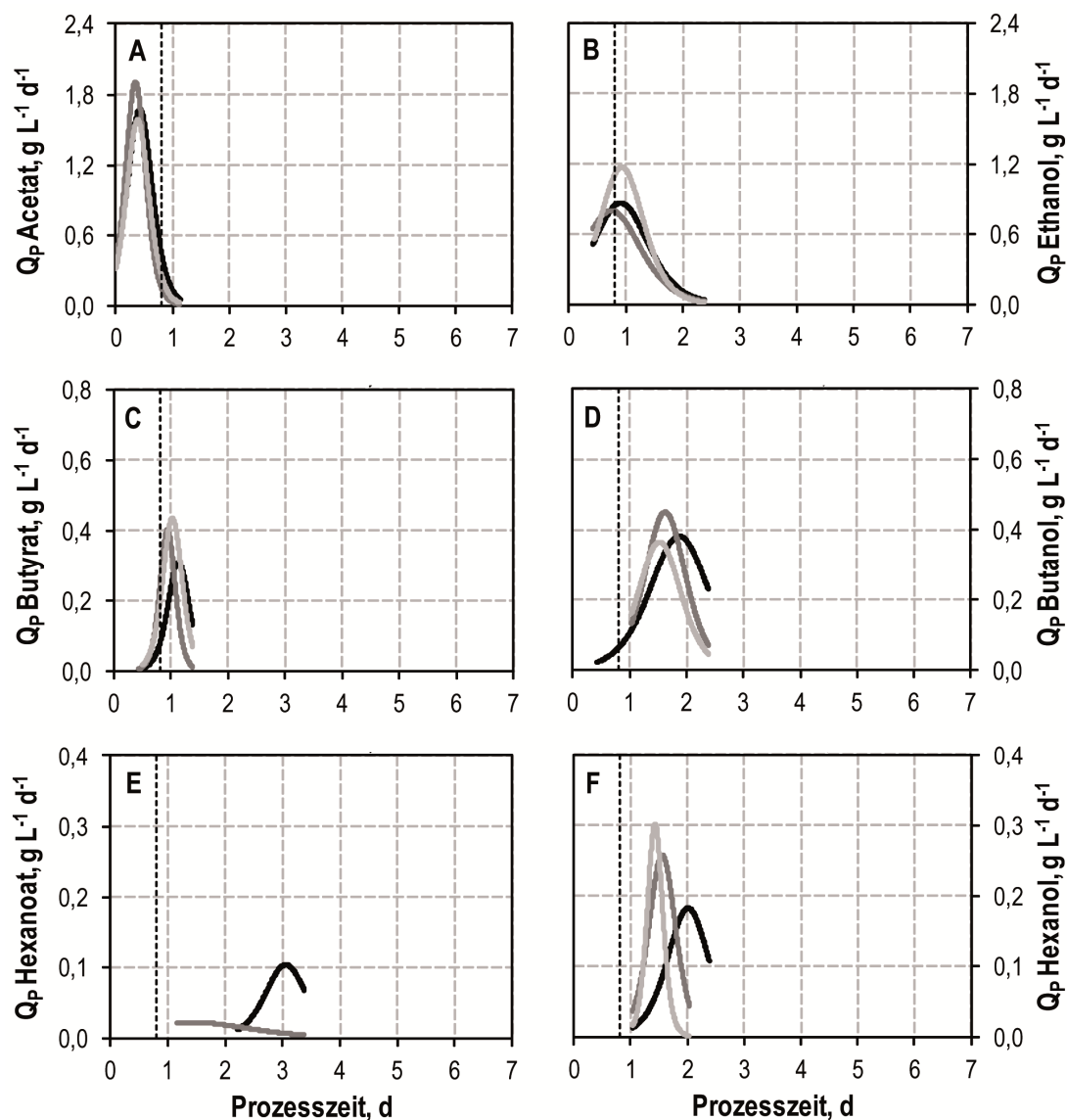


Abbildung 5.3: Volumetrische Produktbildungsrate Q_p von drei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit einer Gaszusammensetzung von $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$ unter pH unkontrollierten Bedingungen. Die Raten wurden anhand nichtlinearer Interpolationen der offline gemessenen Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen bestimmt. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. In einem der drei Satzprozesse konnte die Rate für Hexanoat nicht bestimmt werden. ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

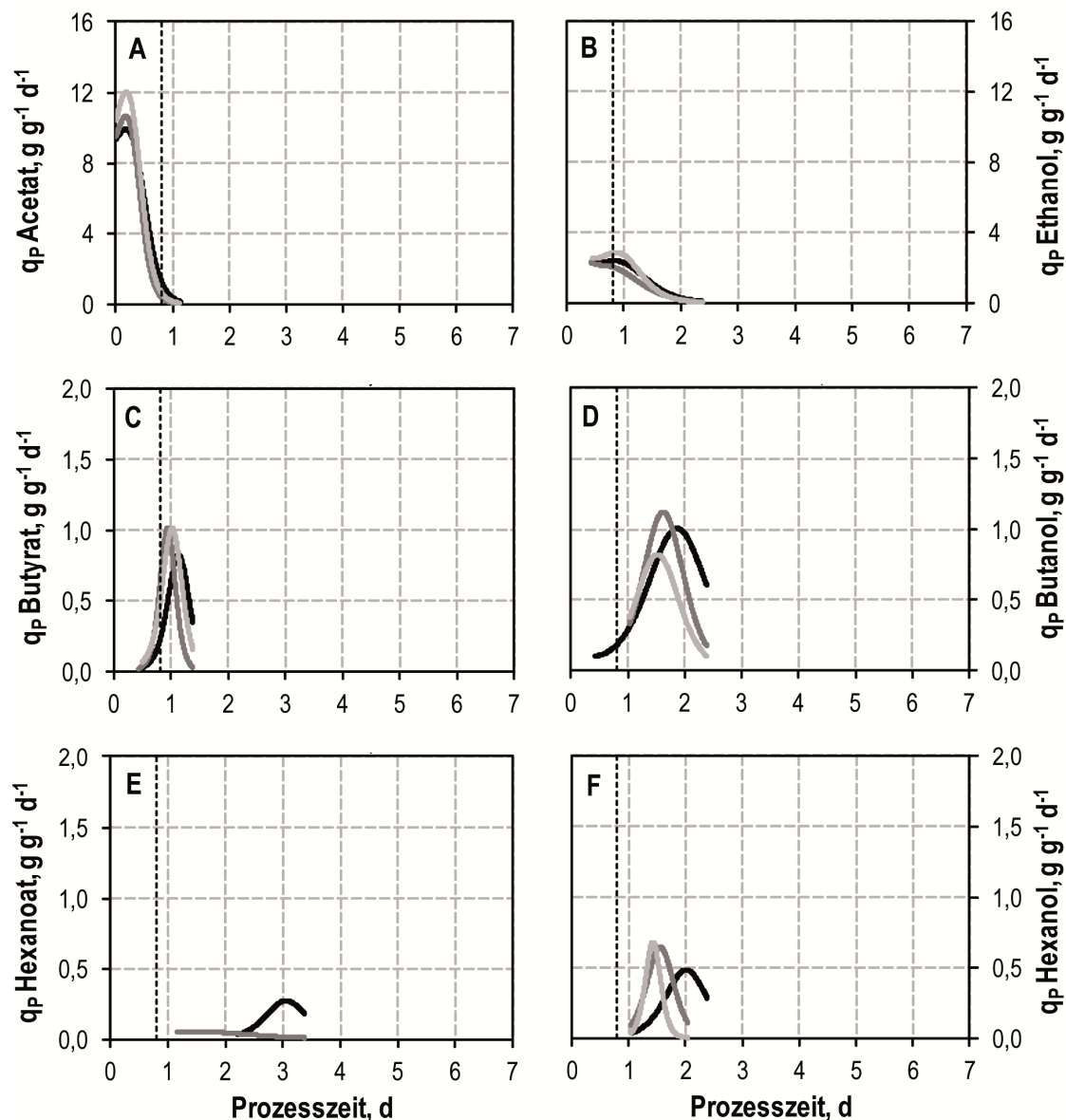


Abbildung 5.4: Spezifische Produktbildungsraten q_p von drei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit einer Gaszusammensetzung von $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$ unter pH unkontrollierten Bedingungen. Die Raten wurden anhand nichtlinearer Interpolationen der offline gemessenen Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen bestimmt. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. In einem der drei Prozesse konnte die Rate für Hexanoat nicht bestimmt werden. ($T = 37\text{ °C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

Die zellspezifischen Produktbildungsraten verhalten sich ähnlich und weisen mit $10,85 \pm 0,88\text{ g g}^{-1}\text{ d}^{-1}$ für Acetat den höchsten Wert auf, während Ethanol den zweithöchsten Wert aufweist ($5,55 \pm 1,48\text{ g g}^{-1}\text{ d}^{-1}$). Die zellspezifischen Raten sind mit Maximalwerten von $0,83 \pm 0,09\text{ g g}^{-1}\text{ d}^{-1}$ für Butyrat beziehungsweise $0,98 \pm 0,12\text{ g g}^{-1}\text{ d}^{-1}$

für Butanol deutlich geringer und die spezifischen Raten für die C6-Produkte fallen am geringsten aus ($0,24 \pm 0,03 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beziehungsweise $0,60 \pm 0,09 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Die Konzentrationen sowie die Produktbildungsraten der gebildeten Produkte weisen die kurzkettigen Produkte Acetat und Ethanol als Hauptprodukte im Produktspektrum von *C. carboxidivorans* aus. Diese werden in der frühen Phase des Prozesses gebildet. Längerkettige Produkte spielen in Bezug auf die erzielten Konzentrationen eine untergeordnete Rolle bei der Produktbildung von *C. carboxidivorans*. Ihre maximalen Produktbildungsraten treten dabei zu späteren Zeitpunkten auf, was wohl der Bildung dieser Produkte über Kettenverlängerung der entsprechenden, kurzkettigen Stoffwechselintermediate (Butyryl-CoA beziehungsweise Hexanoyl-CoA aus Acetyl-CoA) zuzuschreiben ist (Daniell et al. 2012; Bruant et al. 2010; Fernández-Naveira et al. 2017b).

Die Abgasanalytik zeigt den Verbrauch von CO, während CO₂ netto gebildet wurde, was gemäß den Gleichungen zur Produktbildung aus CO als Kohlenstoff und Energiequelle zu erwarten war vergleiche Gleichung (3.3) – (3.8). Die Kohlenstoffbilanz ließ sich in den beiden dargestellten Satzprozessen zu 88,2 % beziehungsweise 88,5 % schließen. Fehlender Kohlenstoff lässt sich durch Verluste über Alkoholverdunstung erklären (siehe Abschnitt 10.2).

Die drei durchgeführten autotrophen Satzprozesse im Rührkesselreaktor bei identischen Reaktionsbedingungen weisen eine hohe Reproduzierbarkeit bezüglich Wachstum, Produktbildung und Gasaufnahme auf. *C. carboxidivorans* bildet dabei unter den gewählten Versuchsbedingungen alle in der Literatur beschriebenen Produkte. Gleichzeitig hatten der hohe Leistungseintrag und der hohe CO-Eingangspartialdruck keine negativen Effekte auf das Einsetzen des Wachstums (keine Scherkräfteempfindlichkeit, keine inhibierenden Effekte durch CO ersichtlich).

5.2 Untersuchungen zur Produktinhibierung

Für Untersuchungen zur Produktinhibierung wurde in parallelen autotrophen Anaerobflaschenprozessen unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Stoffwechselprodukte zugegeben, der Start-pH auf 6,0 eingestellt, das Wachstum verfolgt sowie die Endproduktkonzentrationen bestimmt.

In Abbildung 5.5 sind die maximal erzielten Biotrockenmassekonzentrationen unterschiedlich vorgelegter Säure- beziehungsweise Alkoholkonzentrationen dargestellt.

Bereits die Zugabe von $6,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat hatte Einbußen in der maximalen Biotrockenmassekonzentration von 60 % zur Folge, bei weiterer Steigerung war nahezu kein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration zu sehen. Für Butyrat war eine vergleichbare Reduktion der maximal erzielten Biotrockenmassekonzentration bereits bei einer vorgelegten Konzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ zu beobachten. Mit $7,7 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegtem Butyrat betrug die maximale Biotrockenmassekonzentration nur noch 15 % des Ausgangswertes.

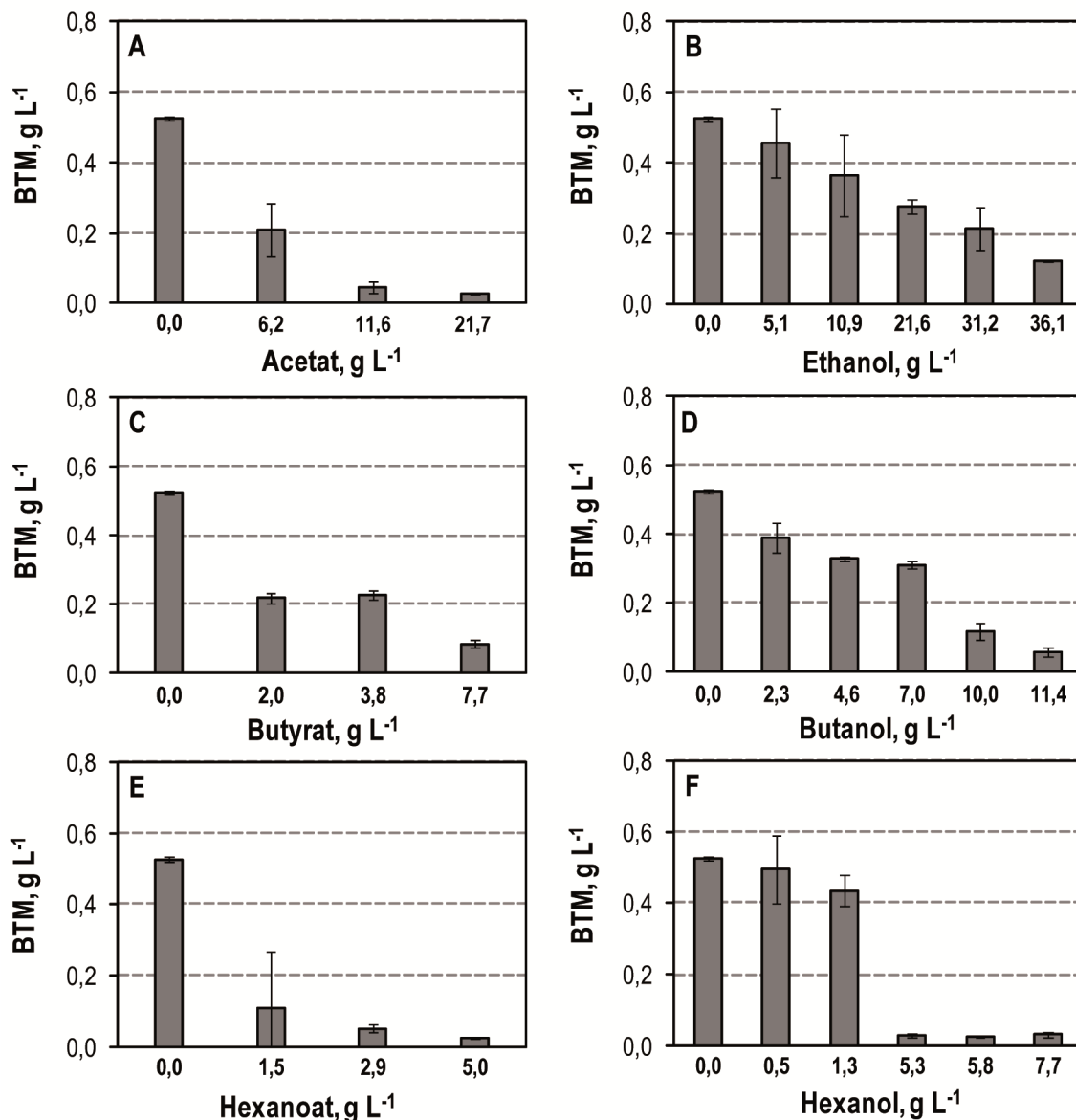


Abbildung 5.5: Maximale Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) bei autotrophen Parallelkultivierungen mit *C. carboxidivorans* in Anaerobflaschen bei unterschiedlichen vorgelegten Produktkonzentrationen. (Gaszusammensetzung $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $P_0 = 2,0 \text{ bar abs}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 100 \text{ rpm}$; $V = 0,1 \text{ L}$).

Mit der Zugabe der geringsten Konzentration an Hexanoat ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) war das Wachstum bereits sehr eingeschränkt, mit einer vorgelegten Hexanoatkonzentration von $2,9 \text{ g L}^{-1}$ wurde eine Biotrockenmassekonzentration von nur 10 % der Biotrockenmassekonzentrationen ohne Zugabe von Hexanoat erreicht.

Vorgelegte Ethanolkonzentrationen bis $5,1 \text{ g L}^{-1}$ resultierten in nahezu vergleichbaren maximalen Biotrockenmassekonzentrationen, erst die Zugabe von $10,9 \text{ g L}^{-1}$ hatte eine Reduktion der Biotrockenmassekonzentration um 30 % zur Folge. Mit weiterhin steigender vorgelegter Ethanolkonzentration nahm die erzielte Biotrockenmassekonzentration stetig ab, jedoch wurden auch noch mit $36,1 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse gebildet. Auch mit der Zugabe stetig steigender Butanolkonzentrationen wurde die erzielte Biotrockenmasse verringert. Bis zu einer Zugabe von $7,0 \text{ g L}^{-1}$ Butanol wurden noch 59 % der Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zum Ansatz ohne Vorlage von Butanol gebildet. Mit $10,0 \text{ g L}^{-1}$ lag dieser Wert bei nur noch 23 %. Bis zu einer vorgelegten Hexanolkonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ waren nur geringe Einbußen von 18 % in der Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen. Ab der Zugabe von $5,3 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol war kein Wachstum mehr zu beobachten und die vorliegende Biotrockenmassekonzentration entsprach der zugegebenen Biomasse bei Inokulation.

Zum Ende der autotrophen Prozesse wurden die Produktkonzentrationen bestimmt. Dabei war teilweise ein Umsatz von vorgelegten Säuren zu Alkoholen und umgekehrt von vorgelegten Alkoholen zu Säuren zu beobachten. Bei einer vorgelegten Konzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat lagen zu Prozessende noch $1,4 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat vor, während $0,6 \text{ g L}^{-1}$ Butanol gebildet wurden. Ohne vorgelegtes Butyrat wurden hingegen nur minimale Mengen an Butanol gebildet. Bei einer vorgelegten Konzentration von $3,8 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat wurden hiervon $1,6 \text{ g L}^{-1}$ abgebaut und zu $1,6 \text{ g L}^{-1}$ Butanol umgesetzt.

Umgekehrt wurden von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegtem Butanol $1,3 \text{ g L}^{-1}$ abgebaut, wobei dabei $3,7 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat gebildet wurden, während ohne Zugabe von Butanol nur $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat produziert worden waren. Auch vorgelegte Ethanolkonzentrationen wurden zum Teil abgebaut. Dabei waren erhöhte Butanol- und Hexanolkonzentrationen verglichen mit Ansätzen ohne Zugabe von Ethanol zu beobachten. Bei Zugabe von Acetat erhöhte sich in allen Fällen die Acetatkonzentration bis zu Prozessende beispielsweise von $6,2 \text{ g L}^{-1}$ auf $9,6 \text{ g L}^{-1}$ oder von $11,6 \text{ g L}^{-1}$ auf $14,6 \text{ g L}^{-1}$. Dabei sanken die Endkonzentrationen von Butyrat und Hexanoat von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,5 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise von $0,04 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,0 \text{ g L}^{-1}$.

Diskussion

Vorgelegte Mengen an unterschiedlichen Produkten haben mit zunehmender Konzentration inhibierende Effekte auf das Wachstum, was anhand der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentrationen abgeleitet werden kann. Dabei zeigt sich, dass die inhibierenden Effekte umso stärker ausfallen, je längerkettiger das Produkt ist. Während mit $6,2 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegtem Acetat noch 40 % der Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zu keiner Zugabe gebildet werden, zeigt die Zugabe von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ Hexanoat kein Wachstum mehr. Selbiges gilt für die Alkohole. Während Wachstum noch mit $36,1 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol zu verzeichnen ist, ist dies für Butanol nur noch mit einer vorgelegten Konzentration von $10,0 \text{ g L}^{-1}$ zu sehen und für Hexanol findet mit $5,3 \text{ g L}^{-1}$ keine Zunahme der inokulierten Biotrockenmassekonzentration mehr statt. Gleichzeitig kann aus diesen Werten abgeleitet werden, dass die Säuren bereits bei geringeren Konzentrationen stärkere inhibierende Effekte als die Alkohole besitzen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Bildung der Alkohole als Entgiftungsmechanismus zu verstehen ist. Dieser stellt eine adaptive Antwort der Zellen auf die steigenden Säurekonzentrationen bei gleichzeitig sinkendem pH dar, welcher wiederum durch die Säurebildung selbst ausgelöst wird (Jones und Woods 1986).

Für *C. carboxidivorans* wurde die Auswirkung der Produkte Ethanol und Butanol auf das Wachstum in Anaerobflaschen unter autotrophen Bedingungen untersucht (Fernández-Naveira et al. 2016a). Dabei führten $14,0 - 14,5 \text{ g L}^{-1}$ Butanol zu 50 % Wachstumsinhibierung und die Vorlage von 20 g L^{-1} Butanol wies kein Wachstum mehr auf. Die Zugabe von 35 g L^{-1} Ethanol zeigte in diesen Untersuchungen eine Reduzierung der finalen Biotrockenmassekonzentration um 50 %. In der vorliegenden Arbeit finden Reduktionen der stationären Biotrockenmassekonzentrationen um etwa 50 % bei Zugabe von $21,6 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol beziehungsweise von Butanol in einem Bereich von $7,0 \text{ g L}^{-1}$ bis $10,0 \text{ g L}^{-1}$ statt. Die bereits früher einsetzenden inhibierenden Effekte könnten den verschiedenen angewandten Temperaturen zugrunde liegen, da hier mit 37 °C gearbeitet wurde, während in der Literatur eine Prozesstemperatur von 30 °C gewählt wurde. Höhere Temperaturen sind verbunden mit einer höheren Zellmembranfluidität, welche wiederum eine Destabilisierung der Membran und eine herabgesetzte Aktivität für Transportprozesse und der ATPase Aktivität bewirkt (Bowles und Ellefson 1985). Zusätzlich wird der Eintritt undissoziierter Säuren erleichtert, welche zellintern dissoziieren mit negativen Effekten auf den für die Energiegewinnung notwendigen Ionengradienten (Dürre 2005).

Untersuchungen zur Inhibierung durch Hexanol bei *C. carboxidivorans* sind bisher nicht beschrieben. Hexanol zeigte in dieser Arbeit noch stärkere Inhibierungseffekte auf die Biotrockenmassekonzentration verglichen mit Ethanol oder Butanol. Aufgrund seiner Kettenlänge ist es als hydrophobe Substanz besonders geeignet, in die Phospholipidmembran zu integrieren, was zu einer erhöhten Zellmembranfluidität führt. Diese Destabilisierung kann den notwendigen Ionengradienten zur Energiekonservierung nachteilig beeinflussen.

Der beobachtete Konzentrationsabfall zugegebener Alkohole bei gesteigerten Säurekonzentrationen sowie umgekehrt der Konzentrationsabfall zugegebener Säuren zugunsten korrespondierender Alkoholbildung (insbesondere C4-Produkte) zeigt die Bestrebung des Stammes, die inhibierenden und toxischen Effekte dieser zugegebenen Substanzen mithilfe dieser Reaktionen zu reduzieren. Dies ist insbesondere der Fall, wenn die zugegebenen Konzentrationen nicht allzu hoch waren, sodass die Inhibierung das Bakterium noch nicht allzu stark am Wachstum hinderte. Derartige Beobachtungen wurden für *C. acetobutylicum* ebenso gemacht, wobei eine vermehrte Butanolbildung bei der Zugabe von 20 – 80 mM Butyrat unter Butyratabbau festgestellt wurde (Bahl et al. 1982).

Vorgelegte Säurekonzentrationen von 4 g L⁻¹ Acetat, 2 g L⁻¹ Butyrat und 1 g L⁻¹ Hexanoat bei *C. carboxidivorans* zeigten eine Verringerung der maximalen Biotrockenmassekonzentration um 50 % (Zhang et al. 2016). In der Literatur sind gegenüber Ethanol relativ hohe Toleranzen mit einer Wachstumsinhibierung von 50 % bei Vorlage von 40 g L⁻¹ für *Clostridium acetobutylicum* beschrieben (Costa und Moreira 1983). Für Butanol wird angegeben, dass Clostridien nicht mehr als 2 % Butanol tolerieren können (Knoshaug und Zhang 2009).

5.3 Verwertung verschiedener Gasmischungen

Der klassische Acetyl-CoA-Stoffwechselweg benutzt H₂ als Energiequelle und CO₂ als Kohlenstoffquelle zur Bildung von Acetyl-CoA. Einigen Acetogenen ist es aber auch möglich, zusätzlich CO im Acetyl-CoA Stoffwechselweg zu verwerten oder gar als alleinige Kohlenstoffquelle und Energiequelle zu nutzen (siehe Abschnitt 3.1.1). Daher wurden Untersuchungen zur Verwertung der Gasbestandteile mit *C. carboxidivorans* vorgenommen.

5.3.1 Verwertung der Gaskomponenten H₂, CO und CO₂

Zunächst wurden in Anaerobflaschen Parallelkultierungen zur Untersuchung der Verwertung von Gaskomponenten durchgeführt. Die verwendeten Gasmischungen waren H₂/CO/CO₂, H₂/CO, H₂/CO₂, CO und als Referenz CO/CO₂ mit Gaszusammensetzungen von 45:50:5, 66:34, 66:34, 80:20 und 100. Ansätze mit reinem N₂ in der Gasphase dienten als Negativkontrolle. Einmalig wurde ein Überdruck der jeweiligen Gasmischung von 1 bar zu Beginn der Satzprozesse angelegt und das Wachstums- und Produktbildungsverhalten verfolgt. Die Endkonzentrationen von Biotrockenmasse und der C2- sowie C4-Produkte nach Prozessende in der stationären Phase (6,0 d) sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

Neben der Referenz mit CO/CO₂ wurde mit Gasmischungen bestehend aus H₂/CO/CO₂ und H₂/CO Wachstum beobachtet, welches von einem raschen Abfall der Absolutdrücke in den Anaerobflaschen sowie einem pH-Abfall begleitet war (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 0,36 g L⁻¹ und 0,57 g L⁻¹ beobachtet. Ansätze mit reiner CO-Begasung ohne zusätzlich andere Gaskomponenten oder der Ansatz ohne CO (H₂/CO₂) wiesen hingegen kaum Wachstum auf. Der Ansatz mit Stickstoff im Kopfraum der Anaerobflaschen zeigte ebenfalls kein Wachstum. Entsprechend des vorhandenen Wachstums wurden neben der Referenz mit CO/CO₂ bei den Gasmischungen H₂/CO/CO₂ und H₂/CO hohe Acetatkonzentrationen erzielt, die im Bereich zwischen 3,17 g L⁻¹ und 3,97 g L⁻¹ lagen. Die Bildung von Butyrat lag bei diesen Gasmischungen zwischen 0,66 g L⁻¹ und 1,89 g L⁻¹. In allen anderen Ansätzen fand mit Ausnahme der Gasmischung aus H₂/CO₂ (0,26 g L⁻¹ Acetat) keine Säurebildung statt. Bei allen angewandten Gaszusammensetzungen, auch bei denen kein Zellwachstum zu beobachten war, wurde Ethanolbildung festgestellt, die höchste mit einer Gasmischung aus H₂/CO/CO₂ mit 0,69 g L⁻¹, die niedrigste bei N₂ mit 0,08 g L⁻¹. Butanol spielte als Produkt eine untergeordnete Rolle mit der höchsten Konzentration von 0,13 g L⁻¹ bei einer Gasmischung von H₂/CO. Geringe Formiatbildung von maximal 0,10 g L⁻¹ waren neben der Referenz mit CO/CO₂ bei den Gasmischungen H₂/CO/CO₂ und H₂/CO₂ zu beobachten.

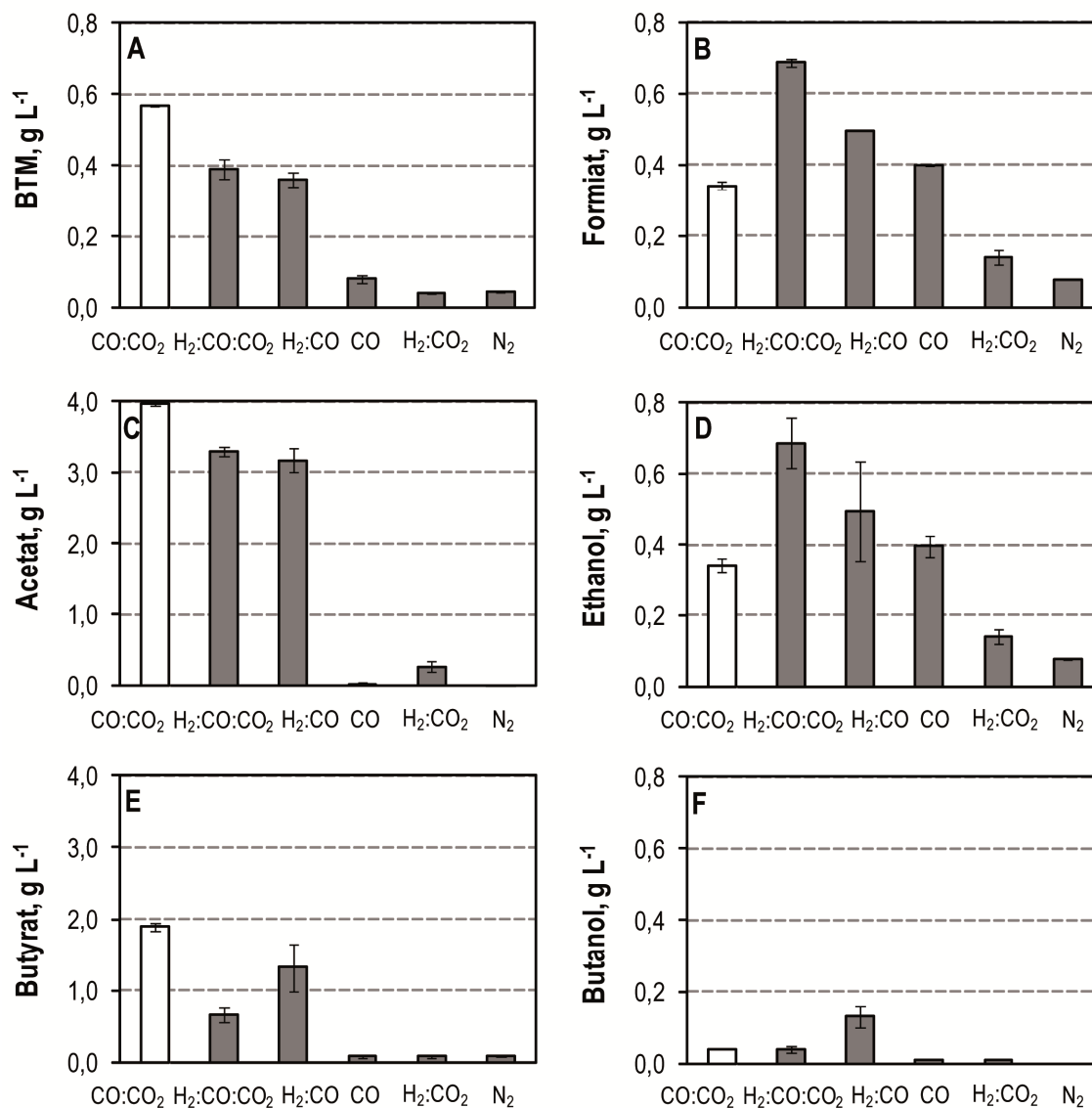


Abbildung 5.6: Endkonzentrationen von autotrophen Parallelkultivierungen mit *C. carboxidivorans* in Anaerobflaschen bei unterschiedlichen vorgelegten Gaszusammensetzungen nach einer Prozesszeit von 6,0 d. Die Gaszusammensetzungen (v/v, %) betragen H₂:CO:CO₂ = 45:50:5; H₂:CO = 66:34; CO:CO₂ = 80:20; CO = 100; H₂:CO₂ = 66:34 bei einem Anfangsdruck von 2 bar abs, pH₀ = 6,0; T = 37 °C; n = 100 rpm; V = 0,1 L.

Eine Gasmischung aus H₂/CO/CO₂ ist interessant, da hier eine erhöhte Ethanolkonzentration gemessen wurde. Im Rührkesselreaktor war der Einsatz von 5 g L⁻¹ MES-Puffer notwendig, um die unzureichende Pufferwirkung durch den geringeren CO₂-Anteil in der Gasmischung zu kompensieren. Die Verläufe für die Biotrockenmassekonzentration, den pH und die Produkte sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Dabei zeigte sich eine ähnliche maximale Biotrockenmassekonzentration (0,38 g L⁻¹), Acetatkonzentration (1,09 g L⁻¹) und Butanolkonzentration (0,37 g L⁻¹) wie im

Referenzprozess mit CO/CO₂-Gaszusammensetzung. Gleichzeitig war die maximale Ethanolkonzentration deutlich erhöht (1,89 g L⁻¹), während hingegen kaum Butyratbildung stattfand.

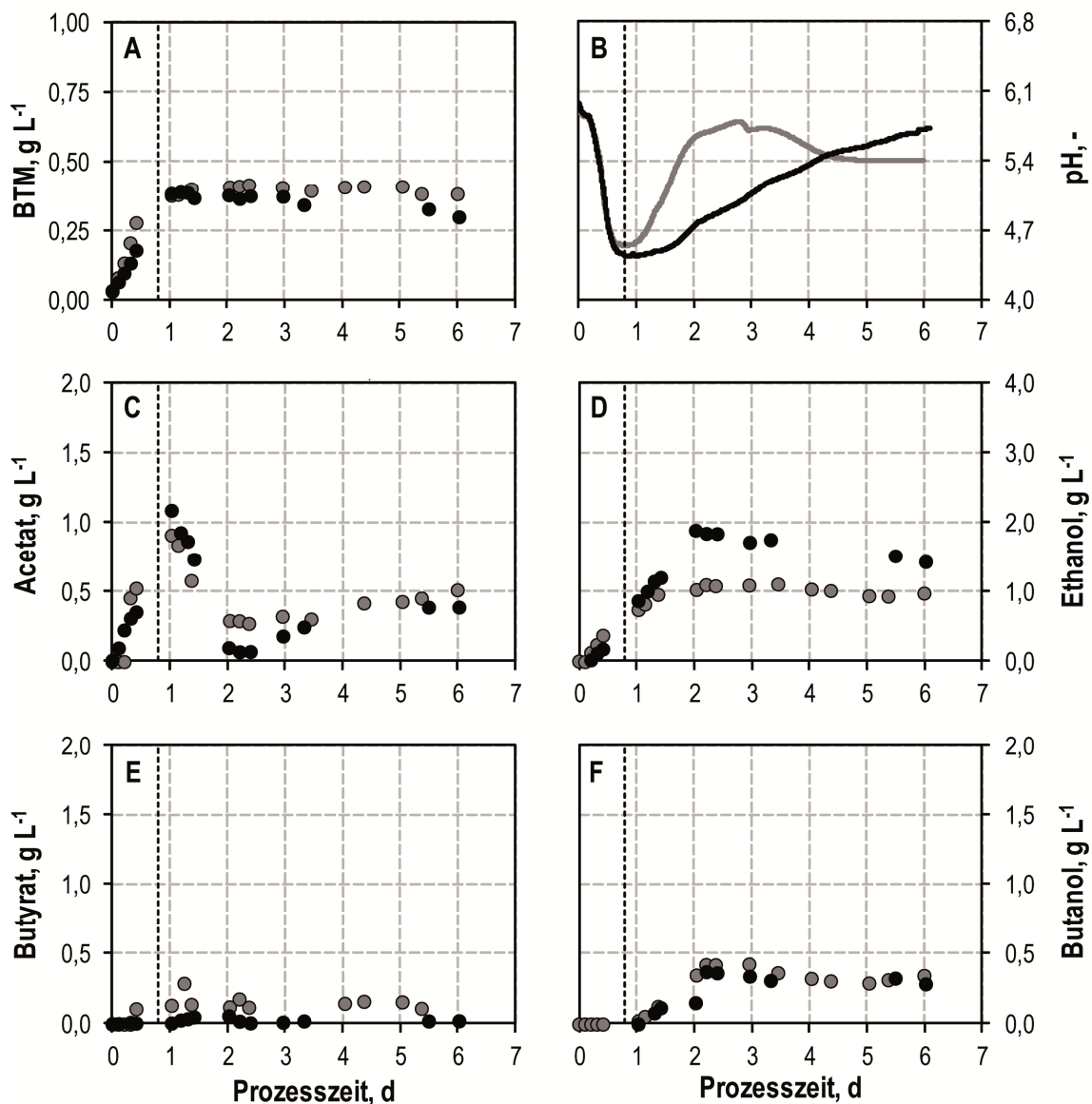


Abbildung 5.7: Autotrophe Satzkultivierungen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit unterschiedlichen Gaszusammensetzungen unter pH unkontrollierten Bedingungen. Gasmischung H₂:CO:CO₂ = 45:50:5 (schwarze Symbole und Linie) im Vergleich zum Referenzprozess mit CO:CO₂ = 80:20 (dunkelgraue Symbole und Linie). Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. (T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Die Gasaufnahmearten für den $H_2/CO/CO_2$ -Prozess sind vergleichend zum CO/CO_2 -Prozess (Referenz) in Abbildung 5.8 dargestellt. Das sofortige Einsetzen des Wachstums mit dieser Gasmischung war verknüpft mit der CO -Gasaufnahme und der CO_2 -Bildung, die mit Werten von $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} CO$ und $9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} CO_2$ bei einer Prozesszeit von 0,7 d ihre Maxima erreichten, bevor die Gasaufnahme bis zu einer Prozesszeit von 2,1 d zum Erliegen kam. Die Verläufe der Partialdrücke für CO und CO_2 sind ebenfalls konsistent mit der Gasaufnahme. Der Partialdruck für H_2 veränderte sich minimal, weswegen auch keine H_2 -Gasaufnahme oder H_2 -bildung zu verzeichnen ist. Damit liegt keine simultane CO und H_2/CO_2 -Verwertung vor.

Die Verwertung von H_2/CO als Gasphase zeigte im Rührkesselreaktor im Gegensatz zu Anaerobflaschen kaum Wachstum und Produktbildung.

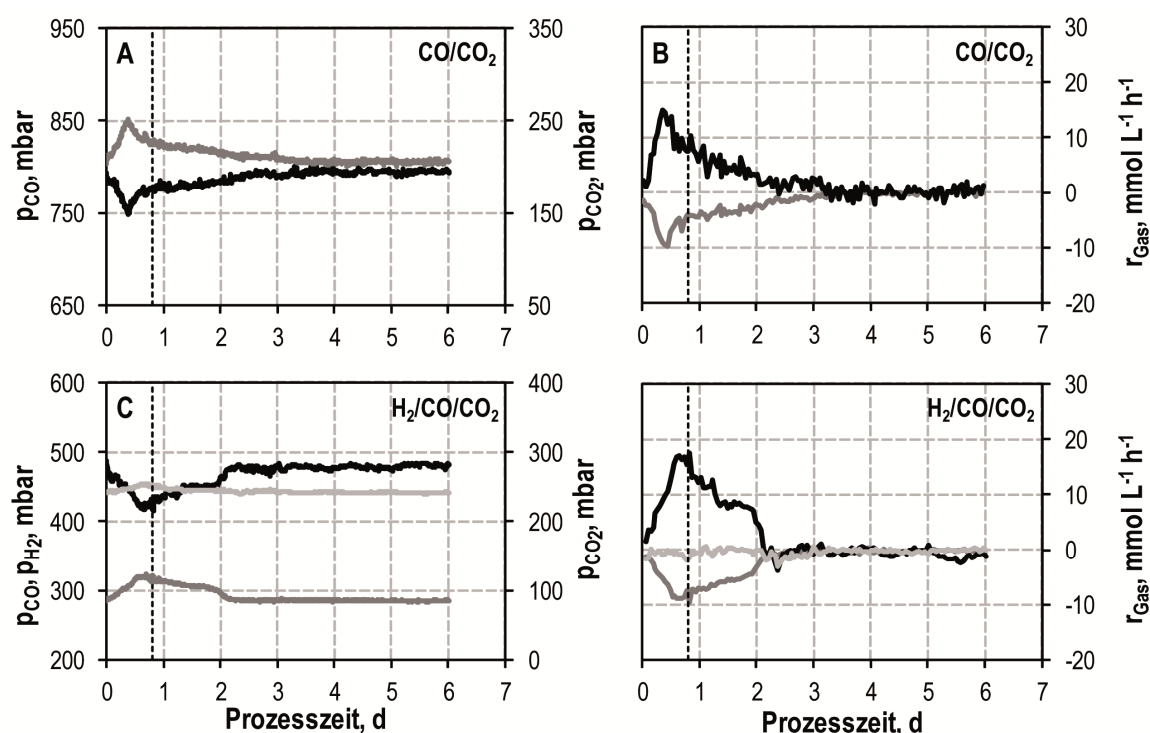


Abbildung 5.8: Ausgangspartialdrücke p_{CO} (schwarz), p_{CO_2} (dunkelgrau) und p_{H_2} (hellgrau) sowie volumetrische Gasaufnahmearten r_{CO} (schwarz), r_{CO_2} (dunkelgrau) und r_{H_2} (hellgrau) der autotrophen Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Gaszusammensetzung von $H_2:CO:CO_2 = 45:50:5$ im Vergleich zur Gaszusammensetzung $CO:CO_2 = 80:20$ (Referenz) unter pH unkontrollierten Bedingungen. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{Gas} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Diskussion

C. carboxidivorans ist neben CO/CO₂ (Referenz) mit den Gasmischungen H₂/CO/CO₂ und H₂/CO in Anaerobflaschen kultivierbar. Die höchste Biotrockenmassekonzentration wird mit der CO/CO₂-Gasmischung erzielt, vermutlich aufgrund des am höchsten gewählten CO-Anteils mit 80 % gegenüber den Gaszusammensetzungen H₂/CO/CO₂ oder H₂/CO, welche beide über einen geringeren Anteil an CO verfügen (50 % beziehungsweise 34 %) und vermutlich deswegen auch etwas geringere Biotrockenmassekonzentrationen erzielen. Bei der Negativkontrolle mit N₂ als Gasphase trat kein Wachstum auf.

Bei einigen Gasmischungen tritt Formiatbildung auf. Dies ist ein Zwischenintermediat im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg und dessen Akkumulation deutet stets auf eine Störung im Energiemetabolismus hin, da ATP zur weiteren Reduktion des Formiats im Methylzweig fehlt (Peters et al. 1999). Im Rührkesselreaktor wurde bei keiner Gasmischung Formiatbildung beobachtet. Dieser Unterschied könnte eventuell der Anlegung von Überdruck in den Anaerobflaschen zugrunde liegen. Die hohen Partialdrücke bei gleicher Gaszusammensetzung könnten zu inhibierenden Effekten im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg geführt haben, die eine Akkumulation an Formiat zur Folge hatte.

Abgasdaten im Rührkesselreaktor zeigen, dass keine simultane CO- und H₂/CO₂-Verwertung bei H₂/CO/CO₂ als Gaszusammensetzung stattfindet. Es wird lediglich CO aufgenommen und CO₂ als Nebenprodukt netto gebildet. Dies könnte auf Inhibierungen von Hydrogenasen durch CO bei den aufgeprägten CO-Partialdrücken zurückzuführen sein, welches selbst reversibel in aktiven Zentren von Hydrogenasen binden kann und somit eine H₂-Aufnahme unterbindet (Ragsdale 2004; Bennett et al. 2000).

Gemäß der Stöchiometrie der Produktbildung basierend auf CO siehe Gleichungen (3.3) – (3.8) müssten auch Prozesse mit reinem CO als Substrat möglich sein, jedoch ist bereits in Parallelkultivierungen in Anaerobflaschen kaum Wachstum zu beobachten gewesen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass CO₂ zwingend notwendig zur Satzkultivierung von *C. carboxidivorans* notwendig ist. In der Literatur gibt es hierzu einen Widerspruch. Auf die Notwendigkeit von CO₂ mit diesem Stamm bei einem kontinuierlich betriebenen Blasensäulenreaktor wird hingewiesen (Rajagopalan et al. 2002; Lewis et al. 2006). Allerdings ist auch Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* mit reiner CO-Begasung in einem Satzprozess im Rührkesselreaktor beschrieben (Fernández-Naveira et al. 2016b). Hierbei wurde der Reaktor mit Zellen angeimpft, die bereits in der Vorkultur auf CO herangezogen wurden, sodass die Fähigkeit zur Verwertung von reinem CO eventuell einem Adaptionseffekt unterlag. Es

wäre aber auch denkbar, dass ein hoher CO-Gasdurchsatz notwendig ist, um auf eine zusätzliche Zufuhr von CO₂ in der Gasphase verzichten zu können. Erst wenn ein hoher Verbrauch an CO vorliegt, hat auch die Gasphase im Reaktor einen ausreichend hohen CO₂-Anteil.

C. carboxidivorans konnte eine Gasmischung aus H₂/CO₂ im Satzprozess nicht verwerten, was bisher nicht beschrieben wurde. Möglicherweise könnten energetische Gründe dazu beitragen, dass CO₂ nicht verwertet wird, da die freiwerdende Enthalpie zur Produktbildung mit CO als Kohlenstoffquelle verglichen mit CO₂ höher ist siehe Gleichung (3.3) – (3.14). Eventuell liefert die Verwertung von CO₂ als Kohlenstoffquelle für *C. carboxidivorans* nicht ausreichend Energie zum Aufbau von Biomasse.

5.3.2 CO-Partialdruck p_{CO}

Aus der Literatur ist bekannt, dass der CO-Partialdruck Einfluss auf die Produktverteilung bei der Fermentation acetogener Bakterien haben kann oder gar inhibierende Effekte zur Folge hat. Auf der anderen Seite ist die Löslichkeit der Gase, insbesondere von CO gering, weswegen für eine verbesserte CO-Versorgung die Erhöhung des CO-Partialdrucks notwendig erscheint. Daher wurde der Einfluss unterschiedlicher CO-Eingangspartialdrücke auf Wachstum und Produktbildung in autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* mit kontinuierlicher CO/CO₂-Begasung untersucht.

Hierzu wurde der CO-Eingangspartialdruck zwischen 0,2 bar und 2,8 bar variiert. Der CO₂-Eingangspartialdruck wurde für CO-Eingangspartialdrücke bis 1,0 bar auf einen Wert von p_{CO₂,in} = 0,2 bar eingestellt und mit N₂ auf einen Gesamtdruck von 1,0 bar aufgefüllt. Für die Einstellung des CO-Eingangspartialdruckes von 1,0 bar wurde unter Verwendung eines CO₂-Eingangspartialdruckes von 0,2 bar der Gesamtdruck auf 1,2 bar absolut erhöht. Für die Einstellung des CO-Eingangspartialdruckes von 2,8 bar wurde der Gesamtdruck des Reaktorsystems auf 3,5 bar absolut erhöht, wodurch sich ein CO₂-Eingangspartialdruck von 0,7 bar ergab. Abbildung 5.9 zeigt ausgewählte Verläufe für Biomasse, pH und Produkte dieser Versuchsreihe. Tabelle 5.1 liefert einen Überblick über erzielte Biomasse- und Produktkonzentrationen. Mit dem geringsten CO-Eingangspartialdruck von 0,2 bar wurde auch die geringste Biotrockenmassenkonzentration (0,31 g L⁻¹) bei einer spezifischen Wachstumsrate von 0,13 h⁻¹ in der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Schon mit Erhöhung des CO-Eingangspartialdrucks auf 0,4 bar, 0,6 bar oder 0,8 bar wurden vergleichbare

Biotrockenmassekonzentrationen in der stationären Phase erreicht bei ähnlichen spezifischen Wachstumsraten. Bei einem CO-Eingangspartialdruck von 1,0 bar sank die spezifische Wachstumsrate wieder bei leicht geringerer maximaler Biotrockenmassekonzentration ab. Für den höchsten CO-Eingangspartialdruck von 2,8 bar war zunächst eine eintägige Verzögerungszeit vor dem Einsetzen des Wachstums zu sehen, bevor *C. carboxidivorans* mit einer äußerst geringen spezifischen Wachstumsrate von $0,03 \text{ h}^{-1}$ zu einer Biotrockenmassekonzentration von $0,40 \text{ g L}^{-1}$ zu wachsen vermochte (Verlauf nicht dargestellt).

Die maximale Acetatkonzentration, die nach 1,0 d Prozesszeit erreicht wurde, war mit Werten zwischen $0,76 \text{ g L}^{-1}$ und $0,91 \text{ g L}^{-1}$ für die CO-Eingangspartialdrücke zwischen 0,2 bar und 0,8 bar in einem ähnlichen Bereich, lediglich mit einem $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 1,0 bar wurde eine höhere maximale Acetatkonzentration erreicht.

Maximalwerte der erzielten Produktkonzentrationen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Es zeigten sich große Unterschiede in der maximal erzielten Ethanolkonzentration. Während diese für $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,2 \text{ bar}$ bei $0,63 \text{ g L}^{-1}$ lag, war diese für $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,4 \text{ bar}$ um den Faktor 1,8 höher und bei einem p_{CO} von 0,6 bar bereits um das 2,9-fache angestiegen. Eine weitere Erhöhung des CO-Eingangspartialdrucks resultierte nur für einen $p_{\text{CO},\text{in}} = 1,0 \text{ bar}$ im Vergleich zu $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,2 \text{ bar}$ in einer weiteren Steigerung der Ethanolbildung (Faktor 2,5). Die Bildung an Ethanol spiegelte sich im Anstieg der pH-Verläufe wider.

Analog zur Beobachtung für das Acetat war die maximale Butyratkonzentration bei einem p_{CO} von 1,0 bar zu beobachten ($0,28 \text{ g L}^{-1}$). Für Butanol ergaben sich ebenfalls Unterschiede für die verschiedenen angewandten CO-Eingangspartialdrücke. Mit einem $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 0,2 bar wurde der geringste Wert ($0,35 \text{ g L}^{-1}$) erhalten, während dessen Konzentration für einen $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 0,4 bar oder $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 0,8 bar um den Faktor 1,2 anstiegen. Die größte Erhöhung mit einem Faktor von jeweils 1,6 wurde bei den angelegten CO-Eingangspartialdrücken von 0,6 bar oder 1,0 bar erhalten. Die Bildung von Hexanol war mit Ausnahme eines angelegten p_{CO} von 0,8 bar für alle eingesetzten CO-Eingangspartialdrücke mit $0,23 \text{ g L}^{-1} - 0,30 \text{ g L}^{-1}$ in einem ähnlichen Bereich.

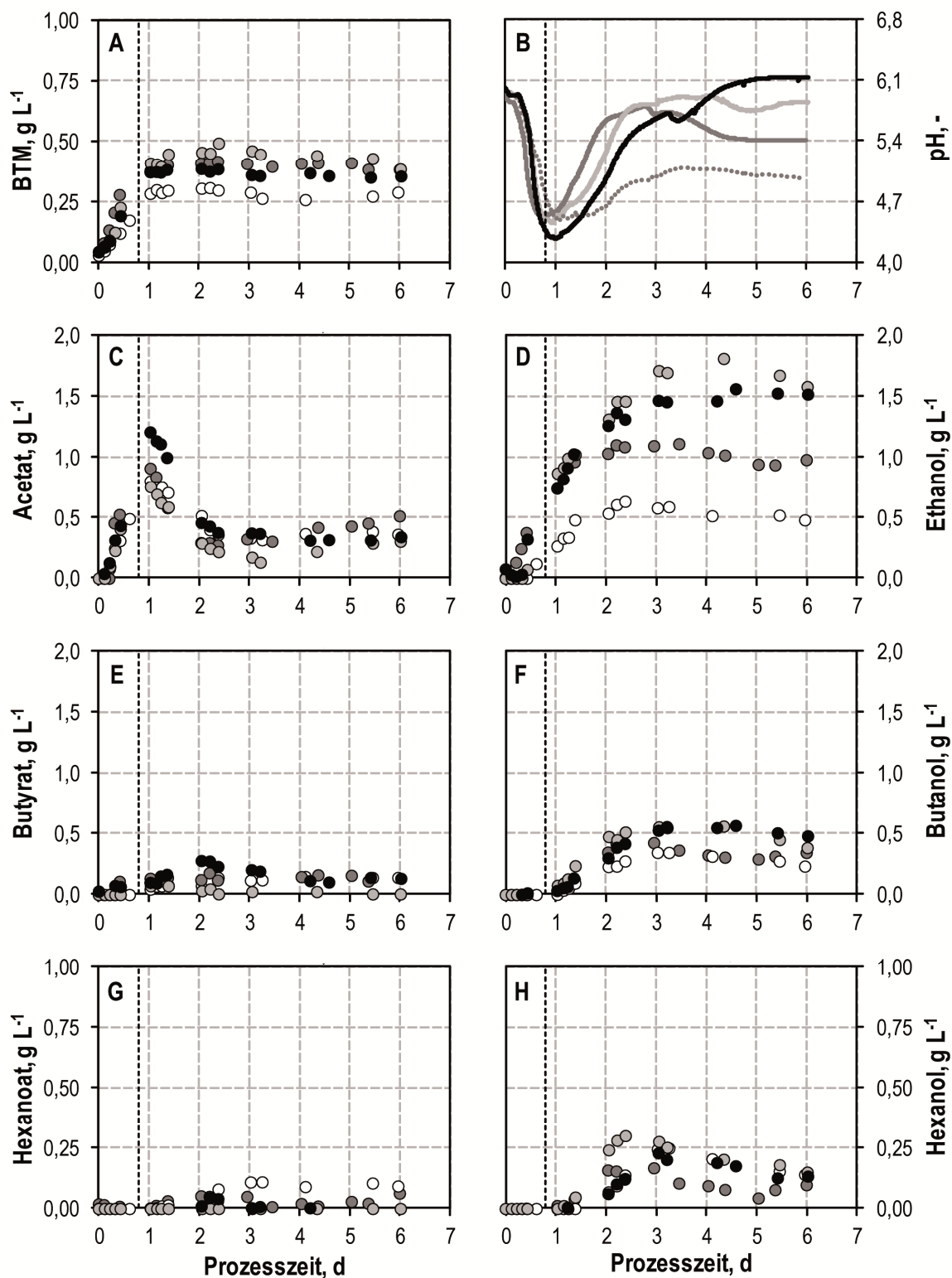


Abbildung 5.9: Autotrophe Satzkultivierungen von *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken $p_{\text{CO},\text{in}}$ unter pH unkontrollierten Bedingungen. $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,2$ bar (weißer Kreis, dunkelgraue gepunktete Linie), $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,6$ bar (hellgrauer Kreis, hellgraue Linie), $p_{\text{CO},\text{in}} = 0,8$ bar (Referenzprozess) (dunkelgrauer Kreis, dunkelgraue Linie), $p_{\text{CO},\text{in}} = 1,0$ bar (schwarzer Kreis, schwarze Linie). Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($T = 37$ °C; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1$ W L⁻¹; $F_{\text{Gas}} = 5$ L h⁻¹; $V = 1,0$ L).

Tabelle 5.1: Maximalwerte für die Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifische Wachstumsrate μ und erzielte Säure- und Alkoholkonzentrationen bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken. Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; V = 1,0 L; p_{CO₂,in} = 0,2 bar; bei p_{CO,in} = 2,8 bar betrug p_{CO₂,in} = 0,7 bar; V = 1,0 L).

p _{CO,in} , bar	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,8
μ , h ⁻¹	0,13	0,16	0,17	0,17 ± 0,01	0,14	0,02 ^{a)}
BTM, g L ⁻¹	0,31	0,41	0,49	0,45 ± 0,03	0,39	0,40
Acetat, g L ⁻¹	0,80	0,96	0,76	0,91 ± 0,06	1,21	0,93
Ethanol, g L ⁻¹	0,63	1,15	1,81	1,21 ± 0,05	1,56	1,09
Butyrat, g L ⁻¹	0,15	0,10	0,11	0,21 ± 0,06	0,28	0,26
Butanol, g L ⁻¹	0,35	0,43	0,56	0,44 ± 0,07	0,57	0,21
Hexanoat, g L ⁻¹	0,11	-	-	0,07 ± 0,00	0,04	-
Hexanol, g L ⁻¹	0,25	0,23	0,30	0,15 ± 0,04	0,23	n.d.

^{a)}mit Verzögerungszeit von 24 h; n. d. nicht bestimmt.

Eine normierte Darstellung der Produktkonzentrationen in einem Netzdiagramm zeigt, dass ein CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar die höchsten Alkoholkonzentrationen lieferte, da hier die größte Fläche aufgespannt wird (Abbildung 5.10). Zudem ist bei diesem CO-Eingangspartialdruck das Biomassewachstum maximal. Damit übersteigt die Prozessleistung bei einem CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar die des Referenzprozesses (p_{CO,in} = 0,8 bar). Die Anwendung eines CO-Eingangspartialdrucks von 1,0 bar hingegen präferiert die Säurebildung von Acetat und Butyrat. Die geringste Prozessleistung wurde bei einem CO-Eingangspartialdruck von 2,8 bar erreicht.

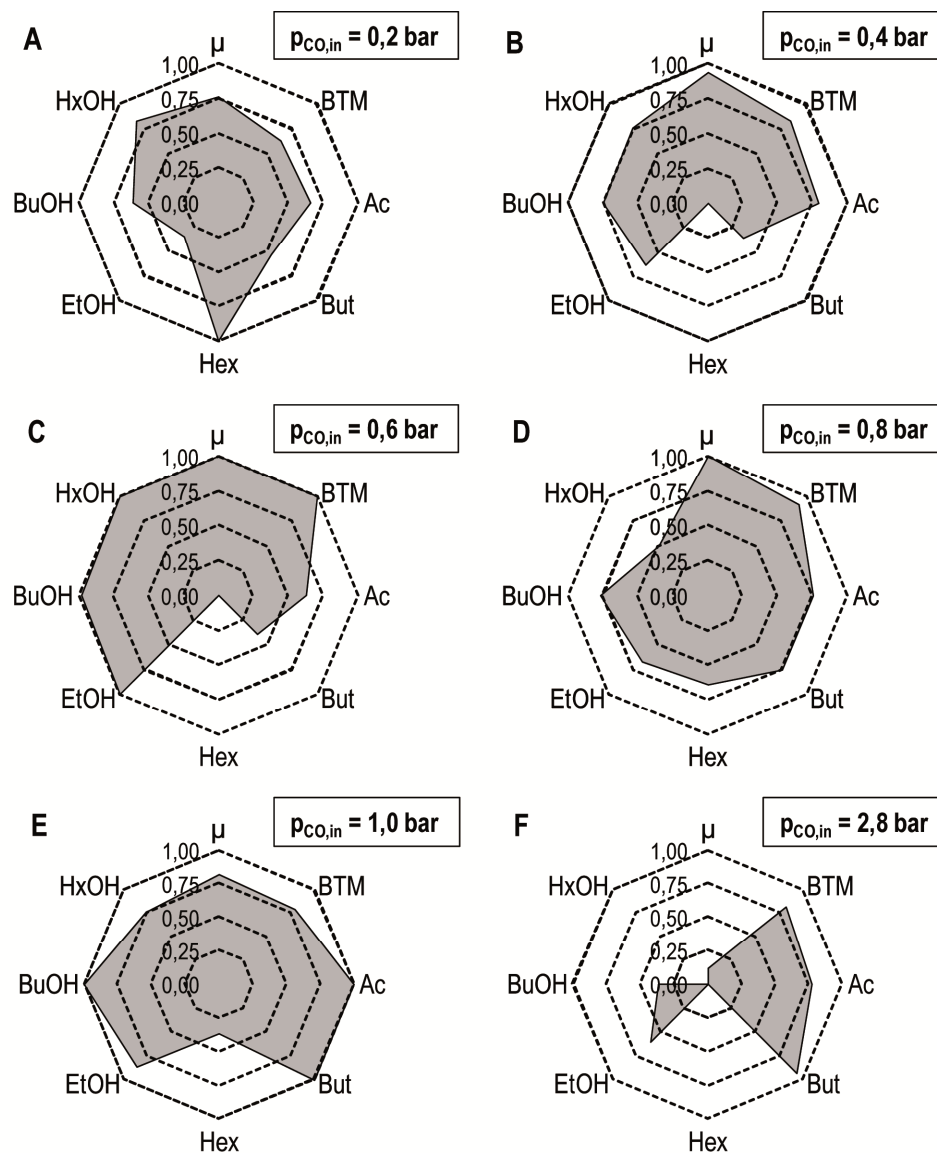


Abbildung 5.10: Graphische Darstellung der maximalen Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifischen Wachstumsrate (μ) und der erzielten Säure- und Alkoholkonzentrationen Acetat (Ac), Butyrat (But), Hexanoat (Hex), Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH) und Hexanol (HxOH) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $p_{CO_2, in} = 0,2 \text{ bar}$; bei $p_{CO_2, in} = 2,8 \text{ bar}$ betrug $p_{CO_2, in} = 0,7 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

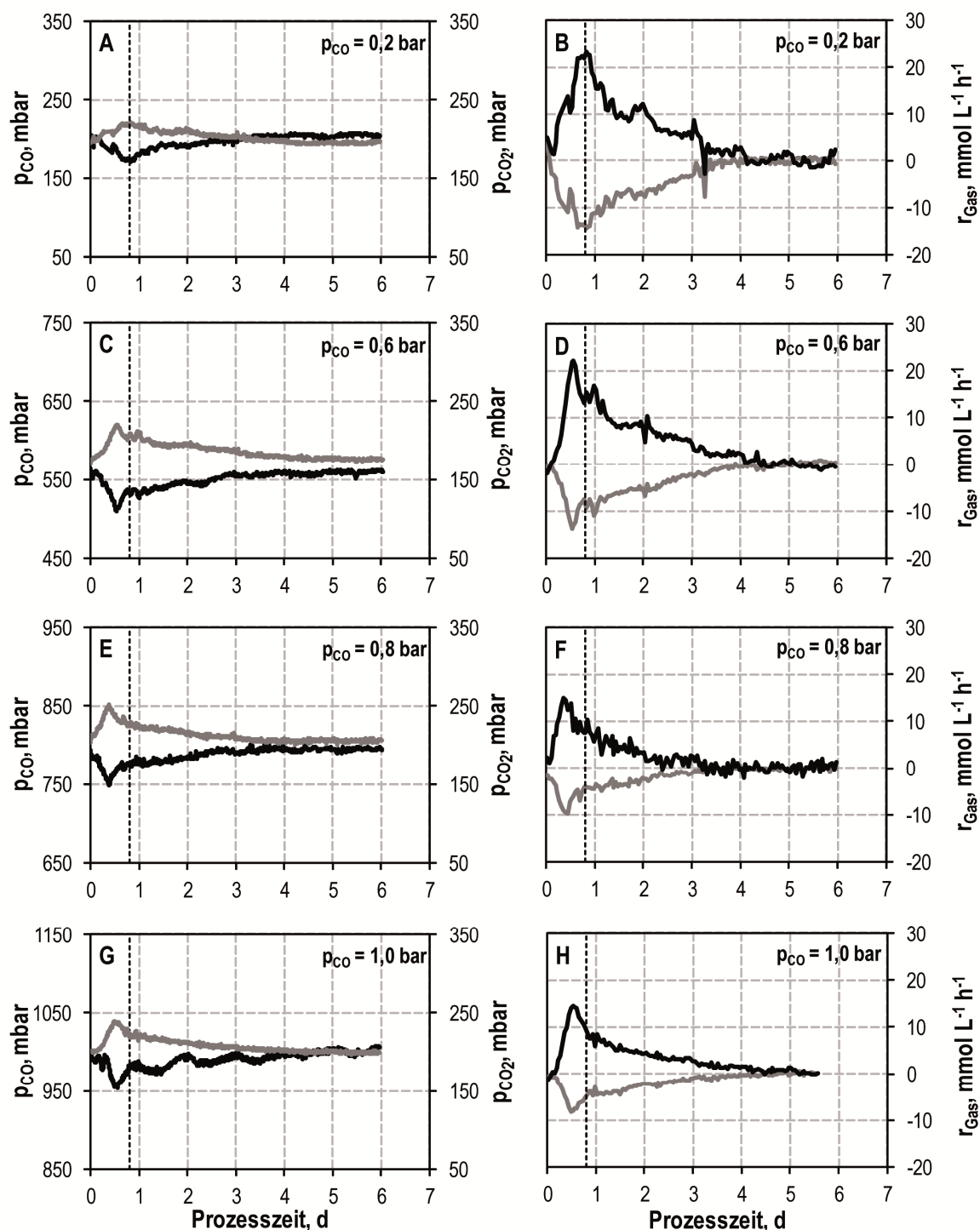


Abbildung 5.11: Partialdrücke p_{CO} (schwarz) und p_{CO_2} (grau) sowie volumetrische Gasaufnahmeleistungen r_{CO} (schwarz) und r_{CO_2} (grau) der Satzkultivierungen im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit unterschiedlichen CO -Eingangspartialdrücken $p_{CO,in}$ unter pH unkontrollierten Bedingungen. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($T = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{Gas} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $p_{CO_2,in} = 0,2 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Die für die Satzprozesse aufgezeichneten Partialdrücke im Abgas sowie die volumetrischen Gasaufnahmeleistungen sind in Abbildung 5.11 als Funktion der Prozesszeit bei verschiedenen CO-Eingangspartialdrücken dargestellt. Diese weisen den charakteristischen Abfall des p_{CO} und den Anstieg des p_{CO_2} auf, was sich in den Gasaufnahmeleistungen in der CO-Aufnahme und der CO₂-Bildung widerspiegelt. Bei allen dargestellten Prozessen stieg die volumetrische CO-Aufnahme bis zu einer Prozesszeit von 0,6 d auf einen Maximalwert zwischen 15 mmol L⁻¹ h⁻¹ und 22 mmol L⁻¹ h⁻¹ bei maximal erreichten CO₂-Bildungsleistungen zwischen 8 mmol L⁻¹ h⁻¹ und 14 mmol L⁻¹ h⁻¹, welche im Anschluss daran stetig geringer wurden. Ab einer Prozesszeit von etwa 4,0 d wurde bei allen Prozessen keine Gasaufnahme mehr beobachtet.

Das Substrat CO weist mit steigender Konzentration inhibierende Effekte auf. Daher wurde eine Substratüberschussinhibierungskinetik für CO erstellt. Für die genaue Vorgehensweise wird auf Abschnitt 4.4.5 verwiesen. Hierzu wurden die spezifischen Wachstumsleistungen in der exponentiellen Phase bestimmt. Dies ist in Abbildung 5.12 graphisch gezeigt. Für den höchsten CO-Eingangspartialdruck von 2,8 bar lag keine exponentielle Wachstumsphase mehr vor. Es wurde dennoch eine spezifische Wachstumsleistung bestimmt, um die CO-Inhibierungskinetik abschätzen zu können. Die Auftragung der spezifischen Wachstumsleistungen gegenüber den mittleren CO-Partialdrücken $\overline{p_{\text{CO}}}$ während der exponentiellen Phase lieferte eine Abschätzung der CO-Inhibierungskinetik, die auf der Substratüberschussinhibierungskinetik von Andrews (1968) basierte und mit dem Sensitivitätsfaktor ϕ ergänzt wurde (siehe Abschnitt 4.4.5), um die Daten gut widerspiegeln zu können. Die formalkinetischen Parameter K_S , K_I , μ_{max} und ϕ wurden zu 180 mbar, 1259 mbar, 0,247 h⁻¹ und 2,616 abgeschätzt (Abbildung 5.13). Damit ergibt sich ein optimaler $\overline{p_{\text{CO}}}$ von 565 mbar, bei dem eine spezifische Wachstumsleistung von 0,171 h⁻¹ erreicht wird.

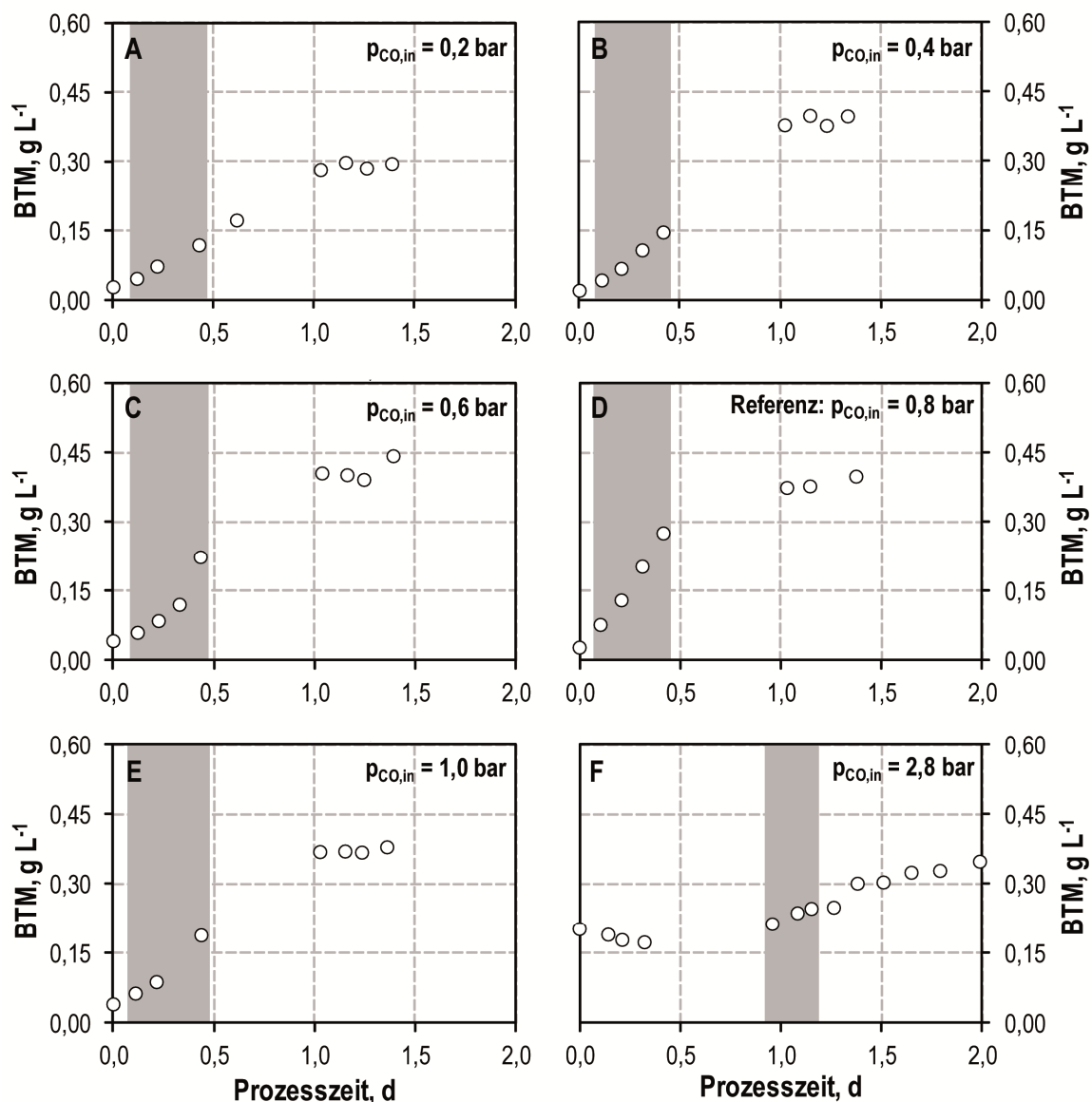


Abbildung 5.12: Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) bei autotrophen Satzprozessen von *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken p_{CO} unter pH unkontrollierten Bedingungen. Der graue Bereich markiert die exponentielle Wachstumsphase zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate sowie des CO-Partialdrucks \bar{p}_{CO} . ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

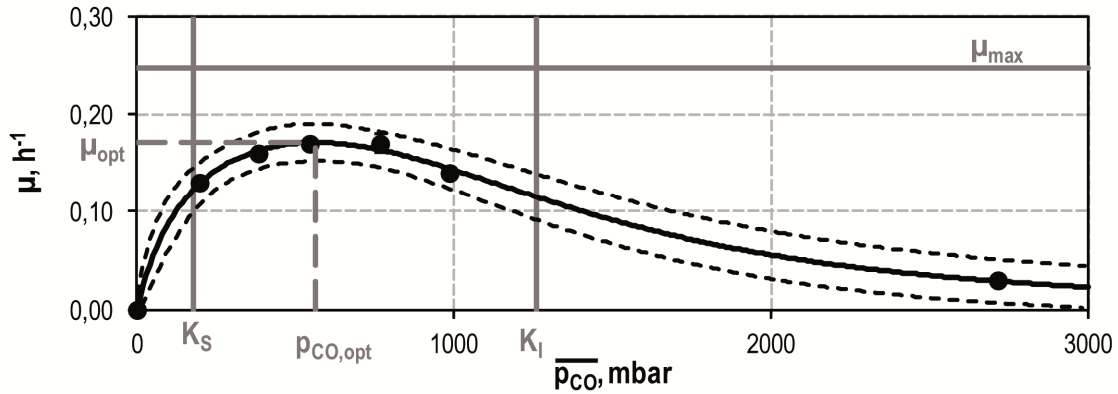


Abbildung 5.13: CO-Inhibierungskinetik (schwarze Linie) für *C. carboxidivorans* nach einer modifizierten Substratüberschussinhibierungskinetik nach Pfaffinger et al. (2016) mit Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls (schwarze gestrichelte Linie). Die spezifischen Wachstumsraten wurden in der exponentiellen Wachstumsphase von autotrophen Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken $p_{\text{CO},\text{in}}$ unter pH unkontrollierten Bedingungen bestimmt (schwarze Punkte). \bar{p}_{CO} ist der gemittelte CO-Partialdruck in der exponentiellen Wachstumsphase. μ_{max} : maximale spezifische Wachstumsrate, K_S : Sättigungskonstante, K_I : Inhibierungskonstante, $p_{\text{CO},\text{opt}}$: optimaler CO-Partialdruck, μ_{opt} : optimale spezifische Wachstumsrate. ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Diskussion

Es zeigt sich, dass der Eingangspartialdruck von CO einen entscheidenden Einfluss auf Wachstum und Produktbildung hat. Dabei erweist sich *C. carboxidivorans* als sehr tolerant gegenüber CO. Erste negative Effekte auf das Wachstum mit reduzierter spezifischer Wachstumsrate und reduzierter maximaler Biotrockenmassekonzentration in der stationären Phase treten erst ab einem angelegten $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 1,0 bar auf. Vergleichbare maximale Biotrockenmassekonzentrationen werden sogar mit einem CO-Eingangspartialdruck von 2,8 bar detektiert, wenn auch mit einer ausgeprägten Verzögerungszeit und einer stark reduzierten spezifischen Wachstumsrate.

Bereits mit einem CO-Eingangspartialdruck von 0,4 bar ist im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor eine Tendenz zur vermehrten Ethanolbildung bei ähnlicher Acetatbildung zu sehen. Demzufolge steigt auch das Ethanol zu Acetat-Verhältnis mit steigendem CO-Eingangspartialdruck an und weist bei einem $p_{\text{CO},\text{in}}$ von 0,6 bar einen Maximalwert von $12,06 \text{ g g}^{-1}$ auf (Tabelle 5.2). Auch das Butanol zu Butyrat-Verhältnis ist bei diesem $p_{\text{CO},\text{in}}$ im Vergleich zu den anderen angewandten CO-Eingangspartialdrücken am höchsten. Das größte Hexanol zu Hexanoat-Verhältnis wurde bei einem CO-Eingangspartialdruck von 1,0 bar identifiziert, während mit einem CO-Eingangspartialdruck von 0,4 bar und 0,6 bar keine Hexanoatbildung stattfand. Ein Vergleich der

gebildeten Konzentrationen an Ethanol, Butanol und Hexanol zeigt die untergeordnete Rolle von Butanol als gebildeten Alkohol gegenüber Ethanol, und Hexanol wiederum gegenüber Butanol. Dies ist nicht verwunderlich, da länger-kettige Produkte durch Kettenverlängerung aus den kurz-kettigen Intermediaten Acetyl-CoA und Butyryl-CoA oder alternativ aus den in das Medium abgegebenen korrespondierenden Säuren gebildet werden (Bruant et al. 2010; Fernández-Naveira et al. 2017b), deren Konzentrationen unter anderem aus selbigen Gründen mit Kettenverlängerung abnimmt.

Die zellspezifische Gesamtalkohol- und -säureausbeute ist für einen CO-Eingangspartialdruck von 1,0 bar am höchsten ($4,40 \text{ g g}^{-1}$), für einen CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar liegt dieser nahezu gleich hoch. Ebenso zeigt sich der angewandte CO-Eingangspartialdruck von 1,0 bar als vorteilhaft für die zellspezifische Butanol- und Hexanol- (1,60 g g^{-1}). Die höchste zellspezifische Hexanol- und -säureausbeute wurde hingegen mit dem geringsten angewandten CO-Eingangspartialdruck von 0,2 bar erreicht. Die normierte Auftragung der Alkohol- zu Säure-Verhältnisse und spezifischen Ausbeuten zeigt eine verbesserte Prozessleistung hinsichtlich der Alkoholbildung für einen CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar (EtOH/Ac, BuOH/But, $Y_{\text{EtOH/X}}$) und 1,0 bar ($Y_{\text{EtOH/X}}$, $Y_{\text{BuOH/X}}$) gegenüber dem Referenzprozess mit $p_{\text{CO}_2,\text{in}} = 0,8 \text{ bar}$ (Abbildung 5.14).

Tabelle 5.2: Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{\text{P/X}}$ bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken. Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. ($T = 37 \text{ °C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $p_{\text{CO}_2,\text{in}} = 0,2 \text{ bar}$; bei $p_{\text{CO}_2,\text{in}} = 2,8 \text{ bar}$ betrug $p_{\text{CO}_2,\text{in}} = 0,7 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

$p_{\text{CO}_2,\text{in}}$, bar	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,8
EtOH/Acetat, g g^{-1}	1,86	4,08	12,06	$3,59 \pm 0,07$	4,92	1,53
BuOH/Butyrat, g g^{-1}	3,87	4,42	23,10	$4,11 \pm 0,15$	5,55	1,47
HxOH/Hexanoat, g g^{-1}	2,28	- ^{a)}	- ^{a)}	$4,33 \pm 1,67$	6,28	n.d.
$Y_{\text{EtOH/X}}$, g g^{-1}	2,25	2,93	4,14	$2,87 \pm 0,04$	4,40	2,97
$Y_{\text{BuOH/X}}$, g g^{-1}	1,32	1,09	1,28	$1,10 \pm 0,17$	1,60	0,54
$Y_{\text{HxOH/X}}$, g g^{-1}	0,95	0,59	0,63	$0,35 \pm 0,03$	0,64	n.d.

^{a)}keine Hexanoatbildung; n.d.: nicht bestimmt

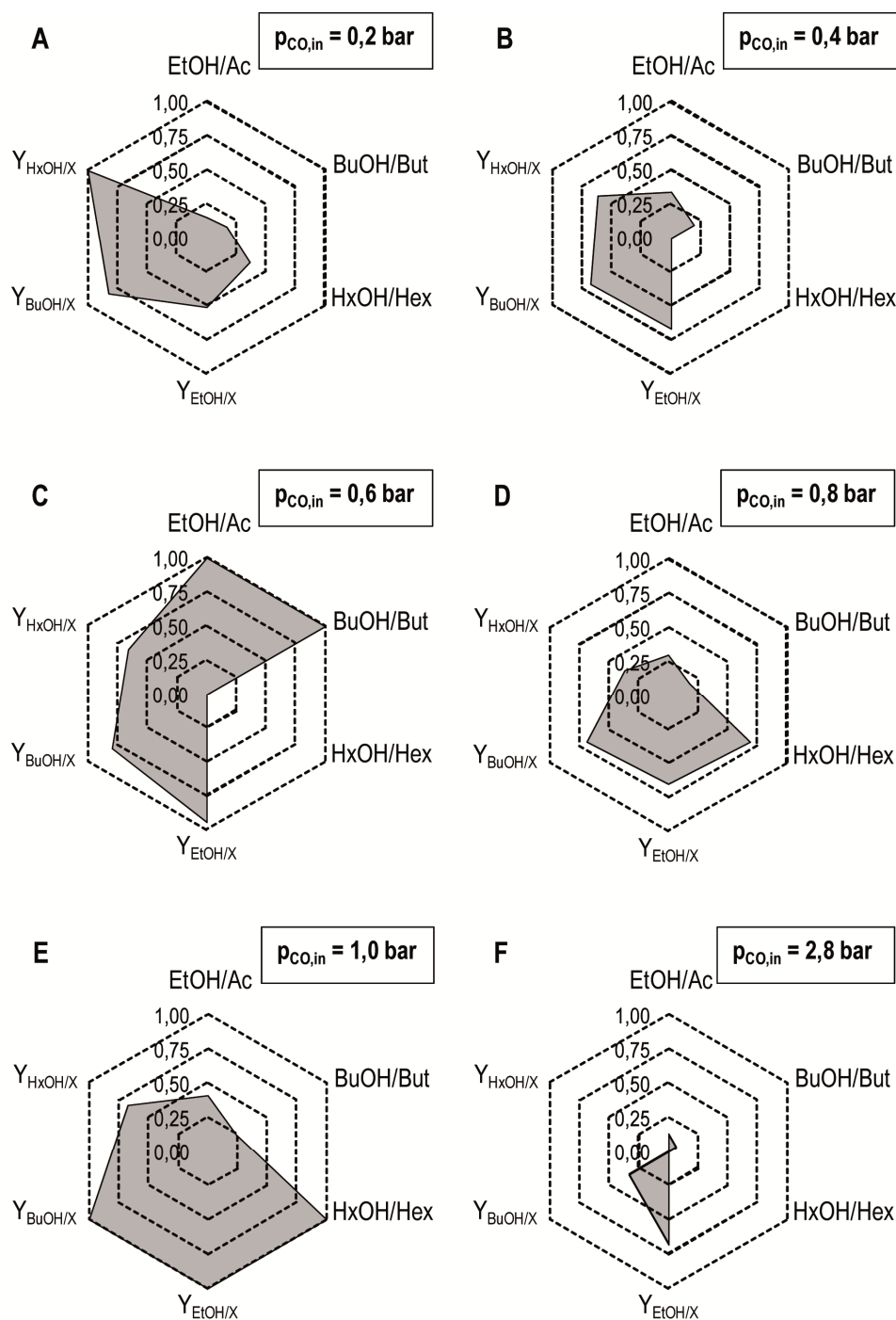


Abbildung 5.14: Graphische Darstellung der Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse Ethanol/Acetat (EtOH/Ac), Butanol/Butyrat (BuOH/But), Hexanol/Hexanoat (HxOH/Hex) und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ für Ethanol ($Y_{EtOH/X}$), Butanol ($Y_{BuOH/X}$) und Hexanol ($Y_{HxOH/X}$) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen CO-Eingangspartialdrücken. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. ($T = 37 \text{ °C}$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{Gas} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $p_{CO_2} = 0,2 \text{ bar}$; bei $p_{CO} = 2,8 \text{ bar}$ betrug $p_{CO_2} = 0,7 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Für *C. carboxidivorans* wurde bereits in Anaerobflaschen der Einfluss des CO-Eingangspartialdruckes auf Wachstum und Produktbildung untersucht (Hurst und Lewis 2010). Der von Hurst und Lewis beobachtete Effekt einer höheren Biotrockenmassekonzentration mit steigendem CO-Eingangspartialdruck wird hier bestätigt. In den hier durchgeführten Arbeiten ist eine CO-Eingangspartialdruckerhöhung von 0,2 bar auf 0,4 bar mit einer Erhöhung in der erzielten Biotrockenmassekonzentration begleitet und zeigt bei weiterer Erhöhung keine weitere Steigerung. In den Untersuchungen von Hurst und Lewis wurde hingegen eine Steigerung der Biotrockenmassekonzentration bis auf einen deutlich höheren CO-Eingangspartialdruck von 2,0 bar beobachtet. Dies könnte den unterschiedlichen Begasungsstrategien zurückzuführen sein, da hier im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor ein hoher Leistungseintrag (hohe Rührerdrehzahl), der Einsatz einer Sintermetallfritte und von Strömungsbrechern eine optimale Gasversorgung gewährleisten, während in den Prozessen bei Hurst und Lewis die Begasung über eine in die Flüssigphase eingetauchte Kanüle bewerkstelligt wurde und der Gasauslass zur Einstellung des Gesamtdrucks und zum Teil auch CO-Eingangspartialdrucks über ein Ventil geregelt wurde.

In Bezug auf die erzielten Alkoholkonzentrationen (1,81 g L⁻¹ Ethanol, 0,56 g L⁻¹ Butanol, 0,30 g L⁻¹ Hexanol) sowie auf die Alkohol zu Säure-Verhältnisse und den spezifischen Alkoholausbeuten stellte sich ein CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar als vorteilhaft für die Alkoholbildung heraus. Dabei scheint eine Exposition bis zu diesem CO-Eingangspartialdruck die selektive Alkoholbildung zu fördern. Die Abschätzung der CO-Substratüberschussinhibierungskinetik wurde für *C. carboxidivorans* bisher nicht beschrieben. Sie liefert daher neue Erkenntnisse im Verständnis für Wachstum und Produktbildung. Mit der Identifikation des optimalen p_{CO} von 565 mbar wird bestätigt, dass bei einem p_{CO} von 0,6 bar ausgeprägtes Wachstum stattfindet, wobei kaum inhibierende Effekte auftreten. Auch bei einem CO-Eingangspartialdruck von 1,0 bar ist die spezifische Ethanol- sowie Butanolausbeute vergleichbar hoch wie bei einem p_{CO} von 0,6 bar, resultiert aber aufgrund der geringeren Biotrockenmassekonzentration in geringeren Produktkonzentrationen. Bei einem CO-Partialdruck von 1,0 bar befindet man sich über dem optimalen Wert des CO-Partialdrucks und nahe der abgeschätzten Inhibierungskonstante in Höhe von 1259 mbar. Hier treten bereits Inhibierungen durch das CO auf.

Grundsätzlich kann die Toleranz von *C. carboxidivorans* gegenüber CO anhand der abgeschätzten formalkinetischen Parameter als hoch eingestuft werden, was diesen Stamm für die Anwendung in der Gasfermentation interessant macht. Andere acetogene

Spezies sind gegenüber CO sensitiver. Beispielsweise tritt bei *C. ljungdahlii* bei einem CO-Partialdruck von 0,743 bar kein Wachstum mehr auf. (Mohammadi et al. 2014).

Die zur Alkoholbildung benötigten Reduktionsäquivalente werden hierbei vermutlich von der Wassergas-Shift-Reaktion bereitgestellt, welche mit steigendem CO-Eingangspartialdruck in ausreichendem Maße zur Verfügung gestellt werden (Lee et al. 2008a). Sobald die ersten inhibierenden Effekte von CO, insbesondere auf die Aktivität von Enzymen, vorliegen (Ragsdale 2004), dient die Wassergas-Shift-Reaktion durch die Umsetzung von CO zu CO₂ auch gleichzeitig dazu, die Konzentration an CO im Medium gering zu halten. Die dabei freiwerdenden Reduktionsäquivalente könnten wiederum für die Umsetzung zu Alkoholen herangezogen werden.

5.4 Satzverfahren mit pH-Kontrolle

Da autotrophe Prozesse mit *C. carboxidivorans* in zwei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden können, eine acidogene Phase und eine solventogene Phase, die mit unterschiedlichen pH-Verläufen verknüpft sind (siehe Abschnitt 3.1.5), wurde der pH als ein entscheidender Faktor zur Verschiebung der Produktverteilung von der Säurebildung zur Alkoholbildung angesehen. Daher wurde der Einfluss des pH auf die Produktbildung insbesondere der Alkoholbildung näher untersucht.

Aufbauend auf den Ergebnissen des Referenzprozesses (siehe Abschnitt 5.1) wurde ein autotropher Satzprozess mit einem pH-Profil durchgeführt, der die Wachstumsphase und damit auch die säurebildende Phase verlängern sollte, um ein größeres Potential zur Umsetzung der gebildeten organischen Säuren in Alkohole zu schaffen. Hierzu wurde der pH für die ersten 2,0 d Prozesszeit auf pH 6,0 geregelt. Im Anschluss daran wurde dieser innerhalb von 0,4 d linear auf pH 5,0 abgesenkt, um mithilfe dieses niedrigen pH die Alkoholbildung voranzutreiben (Abbildung 5.15). Während der ersten 2,0 d Prozesszeit wurde eine vergleichbare Biotrockenmassekonzentration wie im pH unkontrollierten Referenzprozess erzielt (0,45 g L⁻¹). Jedoch stieg die Acetatkonzentration bis zu einer Prozesszeit von 1,4 d auf einen Wert von 2,29 g L⁻¹ an und konnte damit um den Faktor 2,5 erhöht werden. Im Anschluss sank diese wiederum bis Prozessende auf 0,91 g L⁻¹ Acetat ab. Mit einer maximal erzielten Ethanolkonzentration von 2,69 g L⁻¹ konnte die Ethanolbildung um den Faktor 2,2 gesteigert werden. Die Bildung der länger-kettigen Säuren fiel hingegen mit einem Maximalwert von 0,12 g L⁻¹ Butyrat und keiner nachweisbaren Hexanoatproduktion gering aus. Die maximale Butanolbildung fiel im Vergleich zum Referenzprozess mit pH unkontrollierten

Bedingungen ebenfalls niedriger aus und war mit einem Wert von $0,23 \text{ g L}^{-1}$ um die Hälfte verringert. Es wurden lediglich $0,03 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol detektiert, was nur noch einem Fünftel der Hexanolproduktion unter pH unkontrollierten Bedingungen entspricht. Dementsprechend liegt eine Favorisierung kurzkettiger Produkte mit dem angewandten pH-Profil vor. Um auch die Bildung längerkettiger Alkohole voranzutreiben, wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein pH-Profil angewandt, bei dem der pH in der zweiten Phase auf pH 4,5 anstatt pH 5,0 herabgesetzt wurde. Allerdings wurde hier nach Erniedrigung des pH keine metabolische Aktivität der Zellen mehr beobachtet (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der pH während der kompletten Prozesszeit auf pH 6,0 konstant gehalten und dessen Auswirkungen auf Biomasse- und Produktspektrum verfolgt. Nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase nach 1,0 d Prozesszeit war weiterhin Wachstum in linearer Form nahezu bis Prozessende zu verzeichnen. Die erzielte Biotrockenmassekonzentration stieg dabei auf $0,76 \text{ g L}^{-1}$ (70 %-ige Erhöhung im Vergleich zum Referenzprozess beziehungsweise zum Prozess mit pH-Profil) an. Mit $2,53 \text{ g L}^{-1}$ Acetat lag unter Verwendung der pH-Kontrolle die höchste Acetatkonzentration vor, die Ethanolkonzentration erreichte einen Wert von $2,65 \text{ g L}^{-1}$. Während mit dem pH-Profil lediglich eine Restacetatkonzentration von $0,91 \text{ g L}^{-1}$ gegen Ende des Prozesses vorlag, war diese bei Kontrolle auf pH 6,0 nur auf einen Wert von $1,87 \text{ g L}^{-1}$ abgefallen. Die Bildung der C4-Produkte fiel mit $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Butanol gegenüber pH unkontrollierten Bedingungen oder einem pH-Profil sehr gering aus, die C6-Produkte wurden kaum gebildet.

In Anlehnung an die CO/CO_2 -Prozesse mit unterschiedlichen pH-Führungsstrategien wurden autotrophe Satzprozesse mit zusätzlicher H_2 -Zufuhr bei einer Gasmischung aus $\text{H}_2/\text{CO}/\text{CO}_2$ durchgeführt (Abbildung 5.16). Der pH unkontrollierte Prozess wurde mit Zugabe von 5 g L^{-1} MES durchgeführt, um eine unzureichende Pufferwirkung des geringen CO_2 -Anteil ($\text{H}_2/\text{CO}/\text{CO}_2 = 45:50:5$) zu verhindern. Dieser Prozess lieferte mit Werten von $1,89 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $0,37 \text{ g L}^{-1}$ Butanol nicht nur eine höhere Konzentration für den kurzkettigen Alkohol Ethanol, sondern auch eine nahezu vergleichbare Konzentration des längerkettigen Alkohols Butanol verglichen mit pH unkontrollierten Bedingungen unter CO/CO_2 -Begasung bei leicht geringerer Biotrockenmassekonzentration ($0,39 \text{ g L}^{-1}$) in der stationären Phase.

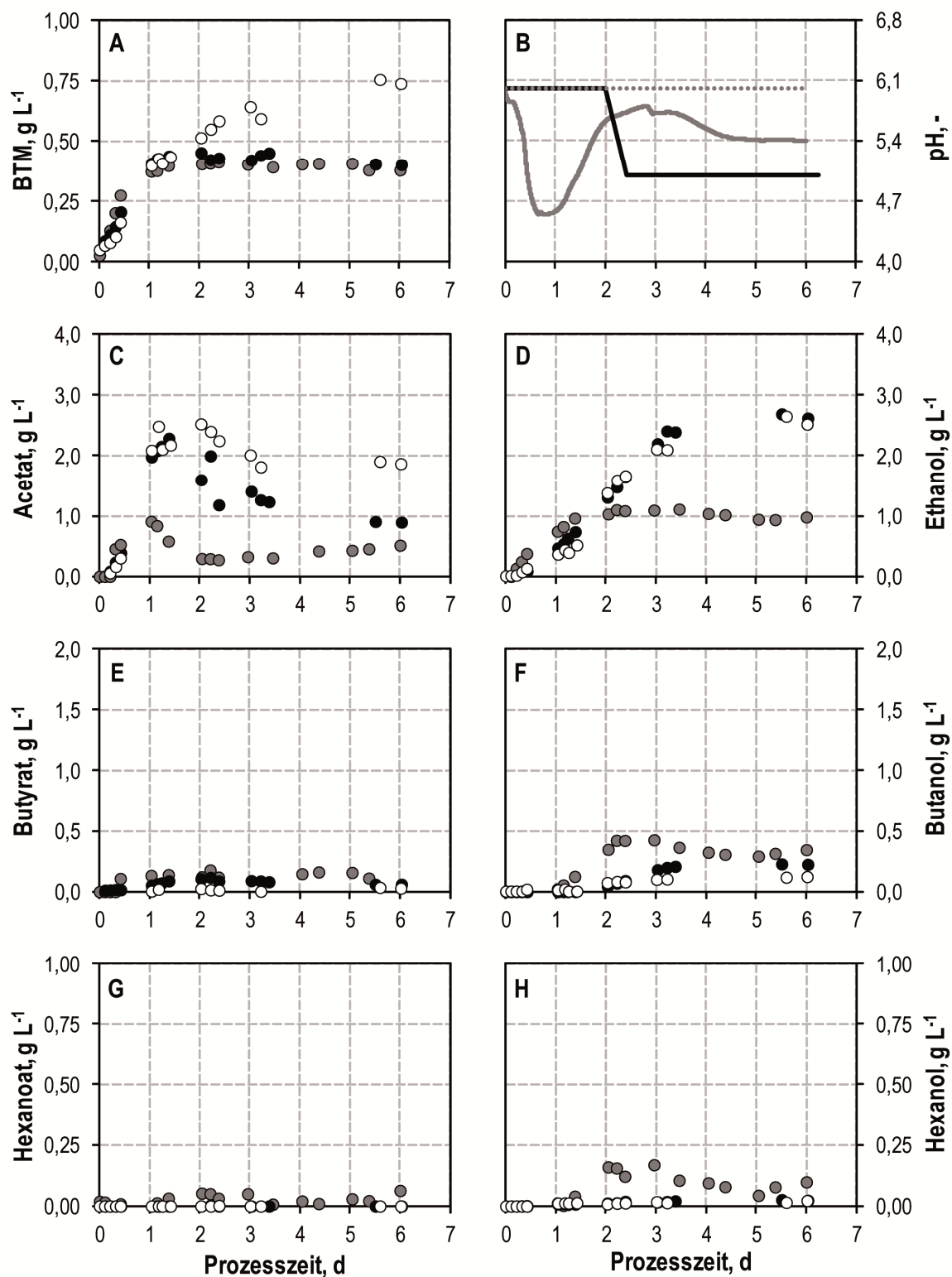


Abbildung 5.15: Autotrophe ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$) Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit pH-Profil (schwarz) und mit pH-Kontrolle (weiß, grau gepunktet) im Vergleich zum pH unkontrollierten Referenzprozess (grau). ($T = 37^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Das pH-Profil mit einer eintägigen pH-Kontrolle auf pH 6,0 mit anschließender manueller pH-Erniedrigung auf pH 5,0 und einer beidseitigen pH-Regelung in den Bereich zwischen pH 5,0 und pH 5,5 mit einer Gaszusammensetzung von $H_2/CO/CO_2 = 45:50:5$ zeigte analog zum pH-Profil mit CO/CO_2 -Begasung eine höhere maximale Acetatkonzentration ($1,98 \text{ g L}^{-1}$) sowie eine höhere Ethanolkonzentration ($2,57 \text{ g L}^{-1}$) verglichen mit dem Satzprozess bei pH unkontrollierten Bedingungen. Dabei wurde die gebildete Acetatmenge bis zum Prozessende vollständig abgebaut. Die Bildung des länger-kettigen Alkohols Butanol erfuhr unter Anwendung des pH-Profiles ebenfalls Einbußen gegenüber einem pH unkontrollierten Prozesses ($0,15 \text{ g L}^{-1}$; 60 % Einbuße).

In einem dritten Ansatz mit $H_2/CO/CO_2$ -Gaszusammensetzung wurde der pH für 1,0 d auf pH 6,0 geregelt und wurde im weiteren Verlauf nicht weiter geregelt, um zunächst hohe Säurekonzentrationen für die Umsetzung zu Alkoholen zur Verfügung zu stellen. Im Anschluss daran sollte ein natürlicher pH-Abfall nicht nur die Bildung des kurzkettigen Alkohols Ethanol, sondern auch die Bildung des C4-Alkohols Butanol vorantreiben. Dies führte bis 1,0 d nach Prozessbeginn ebenfalls zu erhöhter Acetatbildung vergleichbar mit dem pH-Profil, allerdings wurden nur geringe Mengen an Acetat nach Erreichen seines Maximums abgebaut, sodass zu Prozessende immer noch eine Konzentration von $1,66 \text{ g L}^{-1}$ vorlag. Entsprechend war auch die Ethanolbildung reduziert und erreichte nur einen maximalen Wert von $1,44 \text{ g L}^{-1}$. Die C4-Produktbildung fiel sehr gering aus ($0,09 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat; $0,09 \text{ g L}^{-1}$ Butanol). Der pH fiel nach 1 d auf pH 5,7 ab und stieg danach auf pH 6,6 an. Daneben wurde ein weiterer Prozess durchgeführt, bei dem mit 15 g L^{-1} MES als Puffer gearbeitet wurde, um den pH länger bei pH 6,0 halten zu können und im späteren Verlauf einen natürlichen Abfall des pH für die Alkoholbildung zu erzielen. Dieser zeigte ähnliche Ergebnisse wie mit pH-Kontrolle auf 6,0 (hohe Acetatbildung, geringe Ethanolbildung, keine C4-Produkte), da in diesem Fall die Pufferkapazität so hoch war, dass es kaum zu einem pH-Abfall kam (Daten nicht gezeigt).

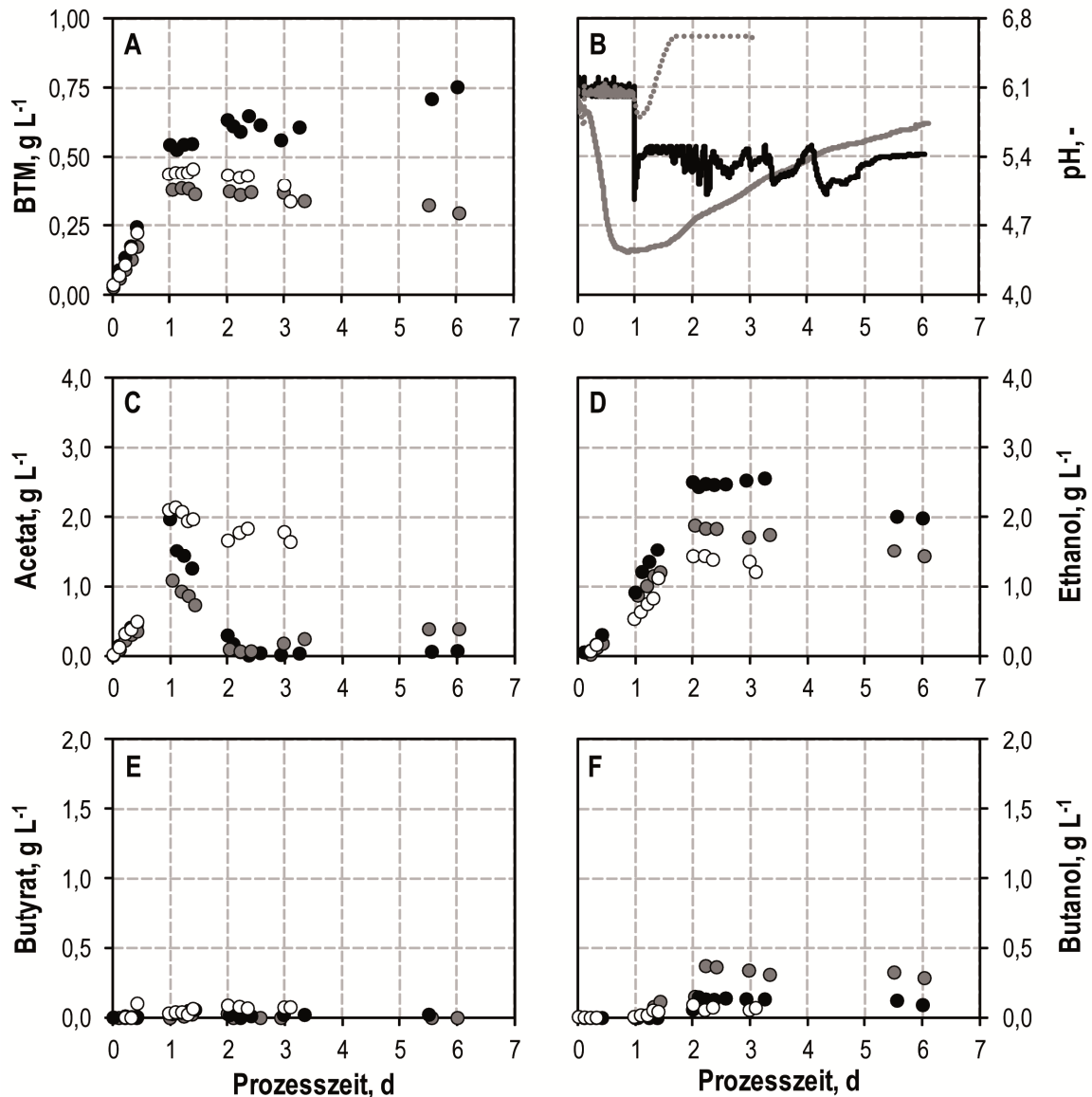


Abbildung 5.16: Autotrophe ($H_2:CO:CO_2 = 45:50:5$) Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im Rührkesselreaktor unter pH unkontrollierten Bedingungen mit 5 g L^{-1} MES (grau), mit pH-Profil (schwarz) und mit pH-Kontrolle (weiß, grau gepunktet). ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Diskussion

Die Anwendung vollständig definierter pH-Profile wurde für *C. carboxidivorans* bisher nicht beschrieben. Mithilfe der Anlegung eines pH-Profils wird bei $CO:CO_2 = 80:20$ zwar keine höhere Biotrockenmassekonzentration gegenüber pH unkontrollierten Prozessen erzielt, jedoch kann die Acetatbildung mit der Verlängerung der acidogenen Phase deutlich gesteigert werden. Dieses wird dann tatsächlich in der zweiten Phase des Prozesses bei erniedrigtem pH zu einem Großteil zu Ethanol umgesetzt, womit dessen Konzentration entsprechend erhöht werden kann. Die bevorzugte C2-Bildung mit diesem

pH-Profil wirkt sich allerdings negativ auf die Bildung der längeren Produkte, insbesondere der erwünschten langkettigen Alkoholbildung aus. Ein weiterer Satzprozess mit einem pH-Profil, bei dem der pH nicht auf pH 5,0 sondern auf pH 4,5 erniedrigt wurde, zeigte allerdings nach pH-Absenkung keinerlei metabolische Aktivität mehr, sodass der pH zur Einleitung der Solventogenese nicht allzu tief gewählt werden darf, um die Überlebensfähigkeit der Zellen weiterhin zu gewährleisten.

Der Minimal-pH scheint dabei stammabhängig zu sein. Mit *C. ljungdahlii* war in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor in einem pH-Bereich von 4,0 – 4,5 noch ausgeprägte Ethanolbildung mit einer Konzentration von etwa 3 g L^{-1} zu verzeichnen (Phillips et al. 1993). Für *Butyribacterium methylotrophicum* ergaben sich Verschiebungen zur Alkoholbildung mit Anwendung eines niedrigeren pH als pH 6,0, jedoch fand unter der kontinuierlichen Betriebsweise bei pH 5,0 bereits ein Auswaschen der Zellen statt (Grethlein et al. 1990). Mithilfe von zyklischen pH-Umschaltungen zwischen pH 5,75 und pH 4,75 konnten mit *C. autoethanogenum* Alkoholkonzentrationen von $7,1 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $1,6 \text{ g L}^{-1}$ 2,3-Butandiol erzielt werden (Abubackar et al. 2016b). Es sind aber auch gegenteilige Erkenntnisse in der Literatur beschrieben, bei denen ein geringer pH nicht zur vermehrten Ethanolbildung geführt hat. Mit *C. ragsdalei* wurde mit einem pH unter pH 6,0 keine vermehrte Ethanolproduktion beobachtet (Kundiya et al. 2011); mit *C. ljungdahlii* war die Ethanolbildung bei einem pH von pH 5,5 gegenüber einem pH von pH 6,8 nicht gesteigert (Cotter et al. 2009b). Mit *C. carboxidivorans* waren die Alkoholkonzentrationen bei pH 5,75 gegenüber pH 4,75 höher, auch wenn die Alkoholbildungsraten bei pH 4,75 als höher angegeben werden (Fernández-Naveira et al. 2017a).

Ansätze bei konstantem pH (pH 6,0) weisen eine vermehrte Acetatbildung bei verringerter Ethanolbildung auf und sind von minimaler C4-Körper-Bildung und fehlender C6-Körperbildung gekennzeichnet. Sowohl mit Gasmischungen bestehend aus CO/CO_2 als auch $\text{H}_2/\text{CO}/\text{CO}_2$ werden dieselben qualitativen Beobachtungen gemacht, auch wenn es dabei leichte Unterschiede in der Prozessführung zum Beispiel beim pH-Profil (Dauer für pH 6,0 und Art der pH-Absenkung) gab. Diese haben augenscheinlich keine Auswirkungen auf die Kernaussagen der einzelnen Versuchsansätze.

Eventuell könnte ein natürlicher Abfall des pH *C. carboxidivorans* dazu zwingen, die Menge an freigesetzten H^+ gering zu halten, um eine noch schnellere Acidifizierung des Mediums zu umgehen. Daher könnten pH unkontrollierte Prozessbedingungen wohl die Bildung der C2-, C4-, und C6-Säuren gefördert haben, da Hexanoat 1 H^+ , Butyrat $1,5 \text{ H}^+$ und Acetat 3 H^+ pro fixierter 6 Kohlenstoffatome freisetzen kann. Folglich könnten die

gebildeten Säuren zur Umsetzung in die korrespondierenden Alkohole zur Verfügung stehen und in entsprechend hohen Alkoholkonzentrationen resultieren, auch der längerkettigen Alkohole. Es könnten Einbußen im Gewinn von ATP bei der Bildung längerkettiger Säuren durch *C. carboxidivorans* in Kauf genommen werden (siehe Abbildung 3.4), um den energiekonservierenden Ionengradienten über die Membran möglichst lange aufrechterhalten zu können.

Auf der anderen Seite fördert ein kontrollierter pH von 6,0 die Bildung der kurzkettigen Säure Acetat und infolgedessen die des Ethanol. Nach der soeben aufgestellten Hypothese könnte hier kein großer Druck zur Bildung längerkettiger Alkohole bestehen. Bei pH 6,0 liegt das gebildete Acetat gemäß des Acetat-Essigsäure-Gleichgewichts nahezu ausschließlich in dissoziierter Form als Acetat vor (siehe Abbildung 3.5) während der Anteil der Essigsäure gering ist. Somit dringen nur geringe Mengen an undissoziierter Essigsäure über die Zellmembran in das Bakterium ein. Diese würden aufgrund des höheren intrazellulären pH dissoziieren und negative Auswirkungen auf den energiekonservierenden Ionengradienten haben (Dürre 2005). Die negativen Effekte fallen daher nicht so stark aus und resultieren in höheren Acetatkonzentrationen. Die Anwendung eines pH-Profiles mit zunächst höherem pH und anschließend geringerem pH scheint wohl ein Mittelweg zwischen diesen beiden Extremen zu sein mit vorhandener Bildung längerkettiger Alkohole (Butanol, Hexanol), die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie unter pH unkontrollierten Bedingungen.

Der pH unkontrollierte Prozess zeigte für die wasserstoffhaltige Gaszusammensetzung gegenüber einer CO/CO₂-Gasmischung (CO:CO₂ = 80:20; p_{CO} = 0,8 bar) eine höhere Ethanolbildung bei vollständigem Acetatabbau. Da zusätzlicher Wasserstoff jedoch nicht verwertet wird (siehe Abschnitt 5.3.1), kann die vermehrte Ethanolbildung vielmehr dem angewandten CO-Eingangspartialdruck von 0,5 bar in der wasserstoffhaltigen Gasmischung (H₂/CO/CO₂ = 45:50:5) zugeschrieben werden, da sich dieser im Bereich bevorzugter Ethanolbildung nahe des optimalen CO-Partialdrucks (p_{CO} = 0,6 bar, siehe Abschnitt 5.3.2) befindet.

5.5 Variation von Medienbestandteilen

Acetogene Mikroorganismen benutzen gasförmige Substrate zur Fixierung von Kohlenstoff über den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg. Die Bereitstellung zusätzlicher Medienbestandteile kann Wachstum und Produktbildung beeinflussen. Daher wird der Einfluss ausgesuchter Medienbestandteile im folgenden Abschnitt untersucht.

5.5.1 Hefeextrakt

Hefeextrakt wird oftmals zur Deckung des Nährstoffbedarfs den Kultivierungsmedien zugesetzt (siehe Abschnitt 3.1.6). Jedoch wäre gerade in der Gasfermentation die Vermeidung dieser undefinierten C- und N-Quellen wünschenswert. Hierzu wurden autotrophe Satzprozesse mit unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen unter pH unkontrollierten Bedingungen zur Kultivierung von *C. carboxidivorans* durchgeführt. Die Verläufe von Biomasse- und Produktkonzentrationen bei Hefeextraktkonzentrationen von, 0,1; 1,0 und 2,0 g L⁻¹ sind in Abbildung 5.17 dargestellt. Eine Reduzierung der Hefeextraktkonzentration auf 0,1 g L⁻¹ führte zu geringeren Biotrockenmassekonzentrationen in der stationären Phase (0,28 g L⁻¹), während eine Verdopplung der Hefeextraktkonzentration auf 2,0 g L⁻¹ zu einem deutlich höheren Wert führte (BTM_{max} = 0,81 g L⁻¹). Dabei war die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase mit Reduzierung der Hefeextraktkonzentration um 62 % geringer verglichen mit einer Hefeextraktkonzentration von 1,0 g L⁻¹. Eine Verdopplung auf 2,0 g L⁻¹ erhöhte diese um 23 %, mit Erhöhung auf 3,0 g L⁻¹ wurde sie um 47 % gesteigert, wobei jedoch keine weitere Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen war (Tabelle 5.3).

Die maximal erzielte Acetatkonzentration mit reduzierter Hefeextraktkonzentration war lediglich um 13 % geringer. Die maximale Acetatkonzentration mit Hefeextraktverdopplung war mit 1,38 g L⁻¹ um den Faktor 1,5 gesteigert. Sowohl mit Erhöhung der Hefeextraktkonzentration als auch mit Erniedrigung wurden höhere Ethanolkonzentrationen mit Faktoren von 1,6 beziehungsweise 1,3 erzielt. Im Gegensatz zu Ethanol wurden mit reduzierter Hefeextraktkonzentration keine höheren Butanolkonzentrationen gebildet (Reduktion um 34 %), während mit Verdopplung der Hefeextraktkonzentration auf 2,0 g L⁻¹ diese um 106 % höher war. Mit 3 g L⁻¹ Hefeextrakt konnten mit 0,12 g L⁻¹ Hexanoat und 0,38 g L⁻¹ Hexanol die höchsten C6-Produktkonzentrationen gebildet werden.

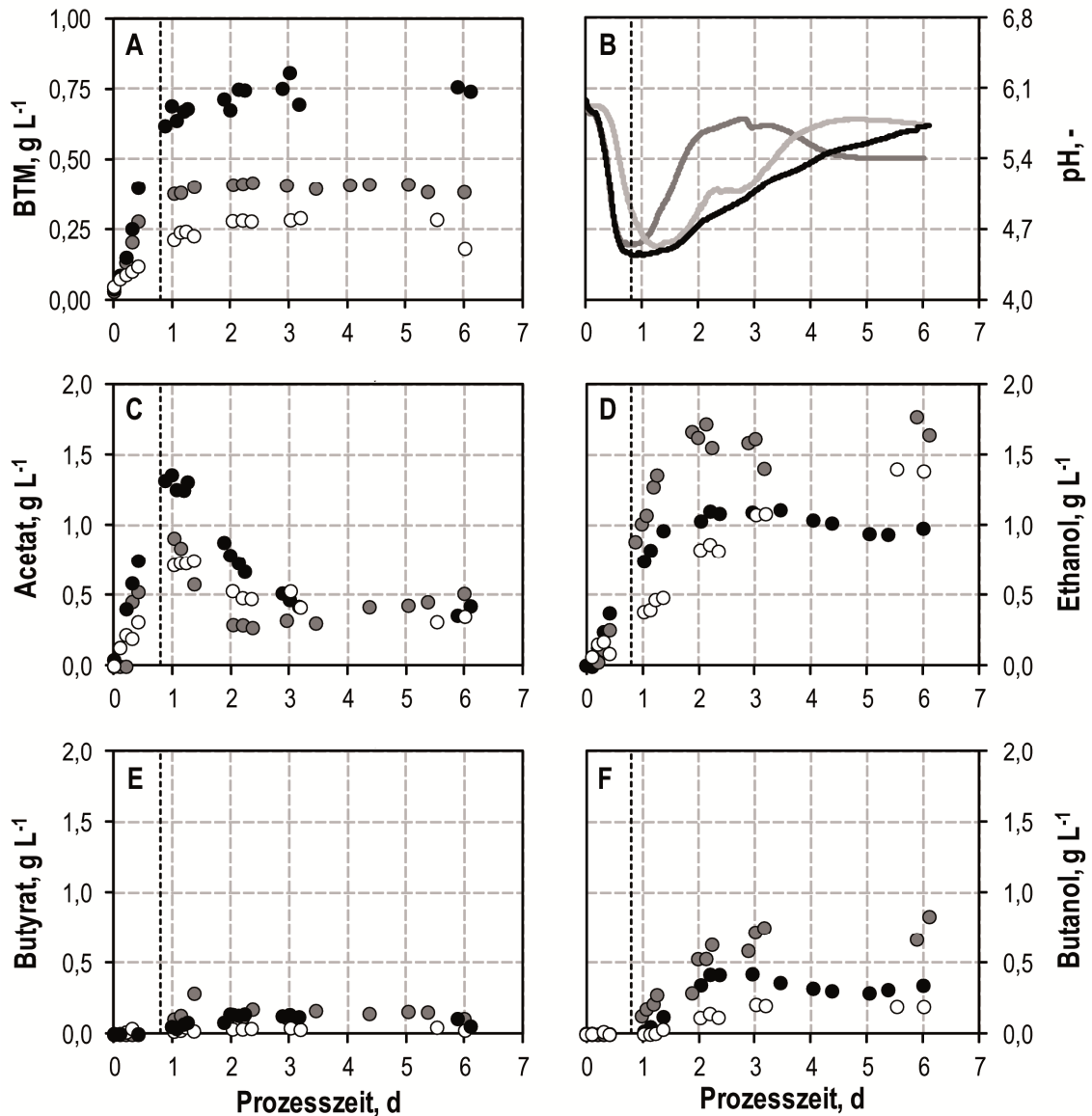


Abbildung 5.17: Autotrophe Satzkultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen unter pH unkontrollierten Bedingungen. 0,1 g L⁻¹ Hefeextrakt (weiß, hellgrau), 2,0 g L⁻¹ Hefeextrakt (schwarz) im Vergleich zum Referenzprozess mit 1,0 g L⁻¹ Hefeextrakt (dunkelgrau). (CO:CO₂ = 80:20, T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Tabelle 5.3: Maximalwerte für die Biotrockenmassekonzentration BTM, spezifische Wachstumsrate μ und erzielte Säure- und Alkoholkonzentrationen bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen. Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH₀ = 6,0; pH unkontrolliert beziehungsweise mit pH-Profil: pH 6,0 (0 – 2,0 d), danach Regulation auf pH 5,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Hefeextrakt, g L ⁻¹	0,1	1,0	1,0	2,0	3,0	3,0
	pH unk.	pH unk.	pH-Profil	pH unk.	pH unk.	pH-Profil
BTM, g L ⁻¹	0,29	0,45 ± 0,03	0,45	0,81	0,69	0,80
μ , h ⁻¹	0,06	0,17 ± 0,01	0,11	0,20	0,25	0,24
Acetat, g L ⁻¹	0,80	0,91 ± 0,06	2,29	1,38	1,77	4,60
Ethanol, g L ⁻¹	1,55	1,21 ± 0,05	2,69	2,01	1,80	2,36
Butyrat, g L ⁻¹	0,08	0,21 ± 0,06	0,12	0,19	0,38	0,32
Butanol, g L ⁻¹	0,29	0,44 ± 0,07	0,23	0,91	0,66	0,21
Hexanoat, g L ⁻¹	n.d.	0,07 ± 0,00	- ^{a)}	n.d.	0,12	- ^{a)}
Hexanol, g L ⁻¹	n.d.	0,15 ± 0,04	0,02	n.d.	0,38	0,05

^{a)}keine Hexanoatbildung; n.d.: nicht bestimmt; pH unk: pH unkontrolliert

Daneben wurden Prozesse mit höherer Hefeextraktkonzentration (3 g L⁻¹) unter Anwendung eines pH-Profiles analog zu den in Abschnitt 5.4 gezeigten Satzprozessen durchgeführt, um deren Auswirkung auf die Biotrockenmassekonzentration und insbesondere gesteigerte Alkoholkonzentrationen zu untersuchen und mit dem pH unkontrollierten Prozess bei gleich hoher Hefeextraktkonzentration verglichen. Das pH-Profil bestand aus einer zweitägigen Kontrolle des pH auf pH 6,0; im Anschluss daran wurde der pH innerhalb eines Zeitraums von 0,4 d linear auf pH 5,0 abgesenkt und auf diesen geregelt. Mit dieser Prozessführung wurde nach 2,0 d eine Biotrockenmassekonzentration von 0,80 g L⁻¹ erzielt, welche im weiteren Verlauf absank und bis zum Ende des Prozesses wieder leicht anstieg (siehe Abbildung 5.18). Während unter pH unkontrollierten Bedingungen eine maximale Acetatkonzentration von 1,57 g L⁻¹ zu verzeichnen war, war diese für das pH-Profil mit 4,60 g L⁻¹ um den Faktor 2,9 erhöht.

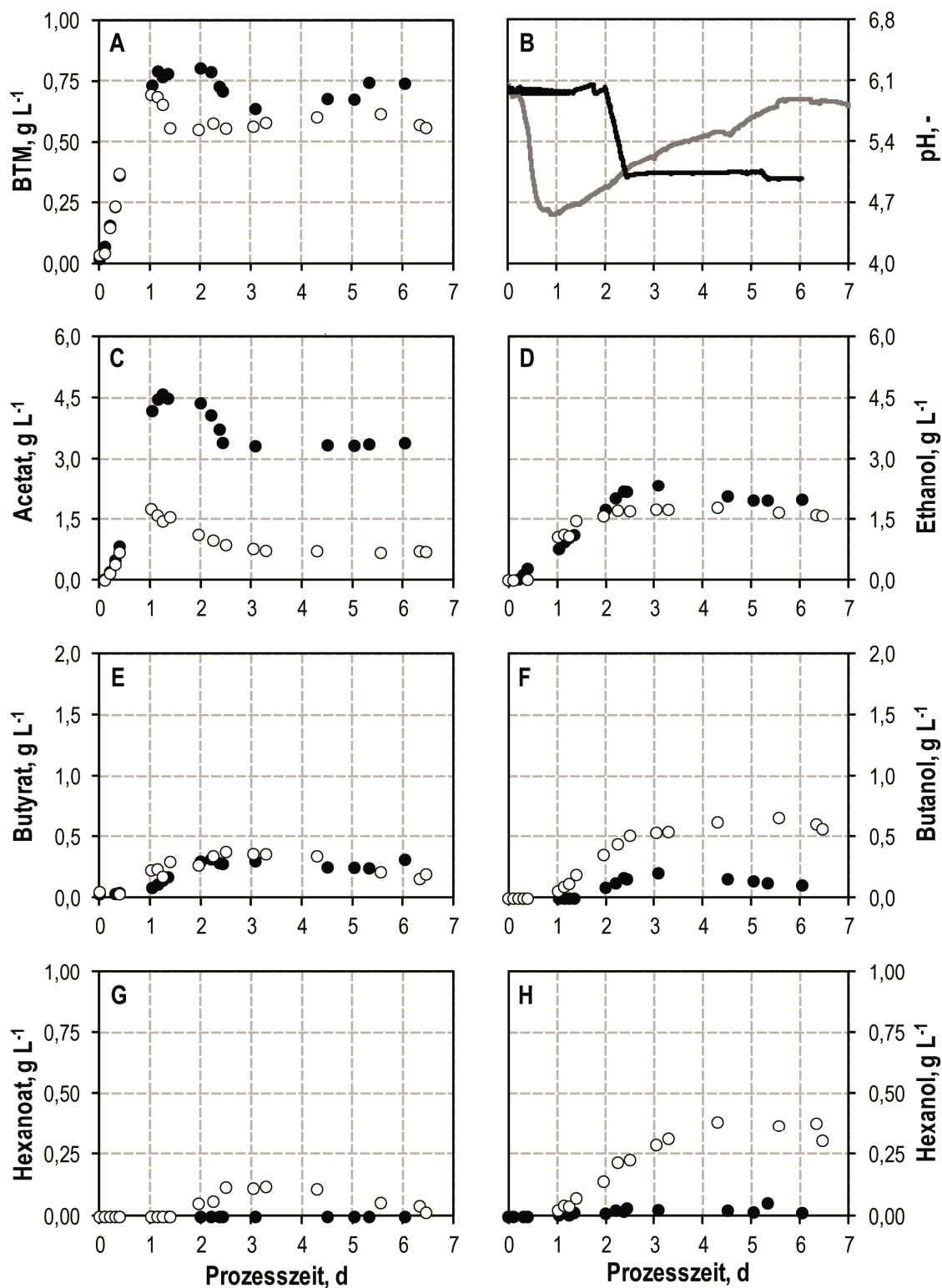


Abbildung 5.18: Autotrophe Satzkultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor unter pH unkontrollierten Bedingungen (weiß, grau) und mit pH-Profil (schwarz) mit 3 g L⁻¹ Hefeextrakt. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Unter pH unkontrollierten Bedingungen fiel die Acetatkonzentration auf $0,73 \text{ g L}^{-1}$ ab, mit pH-Profil lag bis Ende des Prozesses eine hohe Restacetatkonzentration von $3,35 \text{ g L}^{-1}$ vor. Die erzielten Ethanolkonzentrationen unterschieden sich hingegen in geringerem Maße ($1,80 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $2,36 \text{ g L}^{-1}$) verglichen mit den Acetatkonzentrationen. Während unter pH unkontrollierten Bedingungen maximal $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Hexanoat detektiert wurden, wurde mit dem pH-Profil keine C6-Säure gebildet. Die erzielten Alkoholkonzentrationen der längerkettigen Alkohole Butanol und Hexanol waren mit $0,66 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $0,38 \text{ g L}^{-1}$ unter pH unkontrollierten Bedingungen deutlich höher als mit pH-Profil. (Faktor 3,1 beziehungsweise 5,2).

Die Prozessleistung aller durchgeführten Satzprozesse mit unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen bei unterschiedlicher pH-Führung ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Eine Reduzierung der Hefeextraktkonzentration führte zur geringsten Prozessleistung. Eine Erhöhung der Hefeextraktkonzentration bis zu 2 g L^{-1} führte zu erhöhter Biomassebildung. Bei der Verwendung von pH-Profilen erhöhte sich insbesondere die Bildung der C2-Produkte, während bei einem natürlichen pH-Abfall vermehrt auch längerkettige Produkte gebildet wurden. Die höchste Gesamtalkoholbildung wurde mit 3 g L^{-1} Hefeextrakt unter pH unkontrollierten Bedingungen erreicht.

Zusätzlich wurden autotrophe Prozesse mit kompletter Eliminierung von Hefeextrakt durchgeführt unter Verwendung eines speziell für Clostridien entwickelten Minimalmediums (Phillips et al. 1993). Das Wachstum war in autotrophen Anaerobflaschen und im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit ausgeprägten Verzögerungszeiten (2,0 d und 6,0 d) und geringen maximalen Biotrockenmasskonzentrationen in Höhe von $0,14 \text{ g L}^{-1}$ – $0,20 \text{ g L}^{-1}$ verknüpft (Daten nicht gezeigt).

Neben Hefeextrakt stellt das Reduktionsmittel L-Cystein-Hydrochlorid (Cys-HCl) eine organische Kohlenstoffquelle dar. Daher wurde in autotrophen Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor untersucht, ob auf diese Substanz verzichtet werden könnte. Eine Eliminierung führte jedoch zu enormen Einbußen in der Biomassebildung ($\text{BTM}_{\text{max}} = 0,15 \text{ g L}^{-1}$) und entsprechend auch in der Produktbildung (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der Cys-HCl-Zufuhr durch zusätzliche Zugabe von weiteren $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Cys-HCl nach 1,0 d Prozesszeit hatte keine Änderungen von Biomasse- oder Produktkonzentration zur Folge, sodass die Konzentration von $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Cys-HCl für autotrophe Prozesse im Rührkesselreaktor beibehalten wurde.

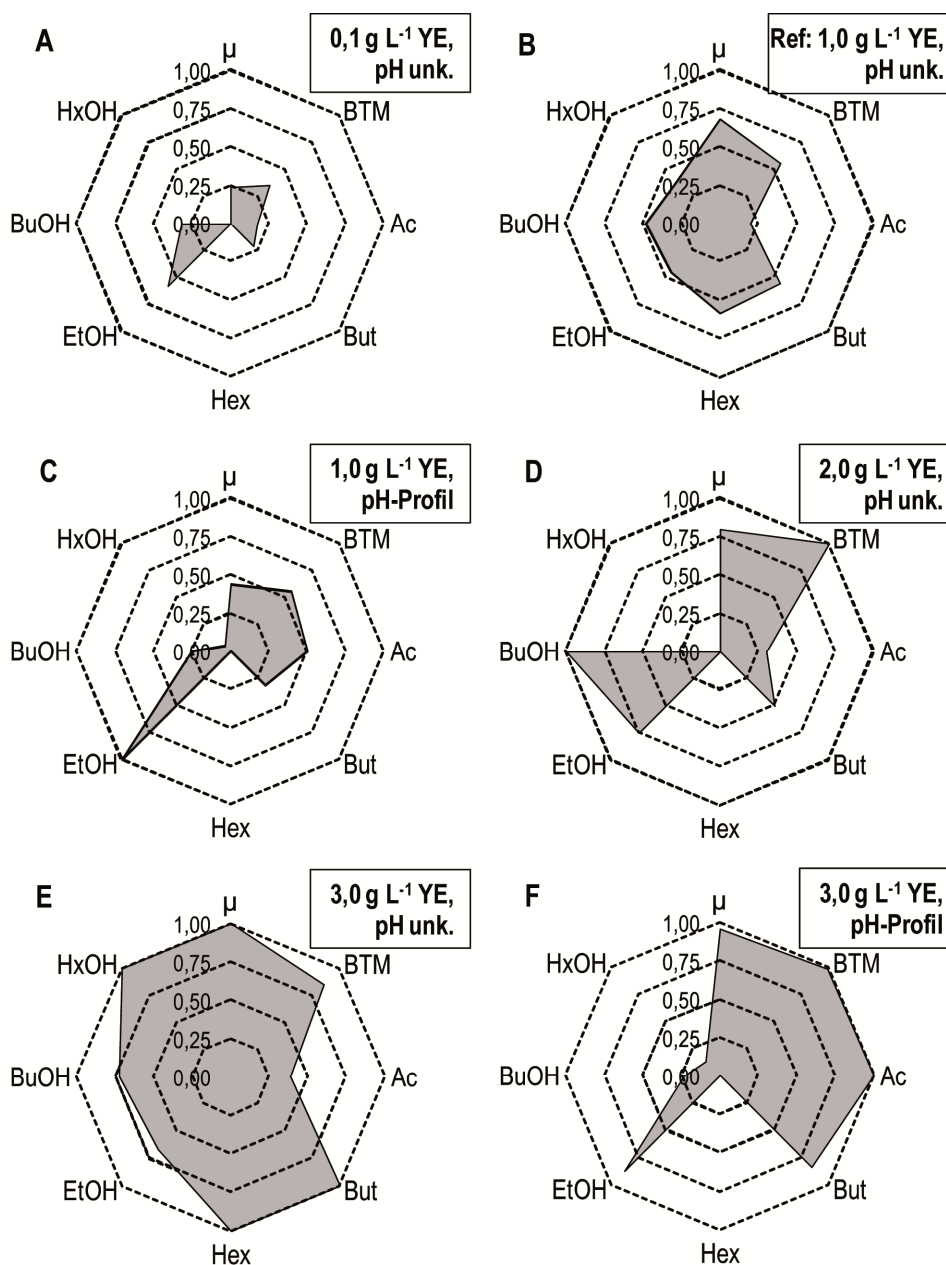


Abbildung 5.19: Graphische Darstellung der maximalen Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifischen Wachstumsrate (μ) und der erzielten Säure- und Alkoholkonzentrationen Acetat (Ac), Butyrat (But), Hexanoat (Hex), Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH) und Hexanol (HxOH) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen sowie pH-Führungsstrategien. Ref: Referenz. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden (C6-Produkte in A und D), wurden auf 0 gesetzt. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH₀ = 6,0; pH unkontrolliert beziehungsweise mit pH-Profil: pH 6,0 (0 – 2,0 d), danach Regulation auf pH 5,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Da Hefeextrakt unter anderem Vitamine enthält, wurden autotrophe Satzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor auch mit variiertes Vitaminzusammensetzung durchgeführt. Eine Eliminierung der Vitamine oder eine Erhöhung des Pantothenats als Vorläufer des Coenzym A in der Vitaminzusammensetzung führten nicht zu signifikanten Erhöhungen von Biotrockenmasse-, Säure- oder Alkoholkonzentrationen.

Diskussion

Eine Reduzierung der Hefeextraktkonzentration ist mit geringerer und verlangsamer Biomassebildung und höherer Ethanolbildung verknüpft, sodass die zellspezifische Ethanolausbeute mit $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt gegenüber dem Referenzprozess mit 1 g L^{-1} Hefeextrakt um den Faktor 1,7 gesteigert wird (Tabelle 5.4). Die zellspezifische Butanolausbeute ist hingegen nicht erhöht. Wenig Literatur ist zum Einfluss von Hefeextrakt vorhanden. Eine Bevorzugung zur Ethanolbildung mit Reduktion der eingesetzten Hefeextraktkonzentration wird für *C. ljungdahlii* beschrieben (Vega et al. 1989). Bei der Verwendung von unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen in parallelen autotrophen Anaerobflaschenprozessen wurde ein steigendes Ethanol zu Acetat-Verhältnis mit sinkenden Hefeextraktkonzentrationen beobachtet (Vega et al. 1989). Es existieren jedoch bisher keine Untersuchungen zu den Einflüssen von Hefeextrakt auf Wachstum und Produktbildung mit *C. carboxidivorans* und auch eine Kombination mit pH-Profilen zur Steigerung der Produktkonzentrationen, ist bisher nicht beschrieben.

Ohne die Verwendung von Hefeextrakt ist nur eine äußerst geringe Biomassebildung bei extrem langen Adaptionphasen zu verzeichnen. Damit scheint Hefeextrakt essentiell für das autotrophe Wachstum von *C. carboxidivorans* zu sein. Da höhere Biotrockenmassekonzentrationen mit der Erhöhung der Hefeextraktkonzentration auf 2 g L^{-1} erzielt wurden, deutet dies auf eine Limitierung einer oder mehrerer Komponenten aus dem Komplexmedienbestandteil Hefeextrakt hin, welche für das Biomassewachstum notwendig sind und nicht durch das Bakterium in ausreichender Menge hergestellt werden. Die Anwendung einer Hefeextraktkonzentration von 1 g L^{-1} ist jedoch unter Berücksichtigung nicht allzu hoher Mengen an Komplexmedienbestandteilen bei der Gasfermentation geeignet, um Biomasse- und Produktbildung zu erzielen.

Tabelle 5.4: Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse Ethanol/Acetat (EtOH/Ac), Butanol/Butyrat (BuOH/But), Hexanol/Hexanoat (HxOH/Hex) und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen. Die jeweils höchsten Werte bei den verschiedenen Parametergrößen sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20, T = 37 °C; pH₀ = 6,0; pH unkontrolliert beziehungsweise mit pH-Profil: pH 6,0 (0 – 2,0 d), danach Regulation auf pH 5,0; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Hefeextrakt, g L ⁻¹	0,1 pH unk.	1,0 pH unk.	1,0 pH-Profil	2,0 pH unk.	3,0 pH unk.	3,0 pH-Profil
EtOH/Ac, g g ⁻¹	4,46	3,59 ± 0,07	2,97	4,93	2,46	0,71
BuOH/But, g g ⁻¹	6,61	4,11 ± 0,15	3,85	6,11	3,78	0,68
HxOH/Hex, g g ⁻¹	n.d.	4,33 ± 1,67	- ^{a)}	n.d.	8,81	- ^{a)}
$Y_{\text{EtOH/X}}$, g g ⁻¹	4,96	2,87 ± 0,04	6,63	2,41	3,12	3,71
$Y_{\text{BuOH/X}}$, g g ⁻¹	0,75	1,10 ± 0,17	0,56	1,13	1,07	0,33
Y_{HxOH} , g g ⁻¹	n.d.	0,35 ± 0,03	0,06	n.d.	0,66	0,07

^{a)}keine Hexanoatbildung; n.d.: nicht bestimmt; pH unk.: pH unkontrolliert

Mit der weiteren Erhöhung der Hefeextraktkonzentration auf 3 g L⁻¹ wird im Vergleich zur Verwendung von 2 g L⁻¹ Hefeextrakt keine weitere Steigerung der maximal erzielten Biotrockenmassekonzentration erreicht, auch nicht unter Verwendung eines optimalen pH zur Aufrechterhaltung des Wachstums, sodass bei diesen Prozessen nicht von Medienlimitierungen seitens des Komplexmedienbestandteils ausgegangen wird. Die erzielten Alkoholkonzentrationen (3 g L⁻¹ Hefeextrakt) sind dabei mit pH-Profil sogar geringer als mit 1 g L⁻¹ eingesetztem Hefeextrakt und angewandtem pH-Profil. Nur unter pH unkontrollierten Bedingungen werden bei Erhöhung auf 3 g L⁻¹ Hefeextrakt die maximalen Konzentrationen der Alkohole um Faktoren von 1,5 (Ethanol), 1,5 (Butanol) und 2,5 (Hexanol) gegenüber dem Referenzprozess gesteigert werden (Tabelle 5.3). Hiermit wird gleichzeitig die Beobachtung der Bevorzugung der Bildung längererkettiger Alkohole bei pH unkontrollierten Prozessen bestätigt, wenn der Stamm einen natürlichen Abfall und Anstieg des pH widerfährt (siehe Abschnitt 5.4). Hingegen treibt eine Kombination aus erhöhter Hefeextraktkonzentration mit pH-Profil die Acetatbildung voran, zum Ende des Prozesses verbleiben hohe Restsäurekonzentrationen unter Vernachlässigung der Bildung längererkettiger Alkohole.

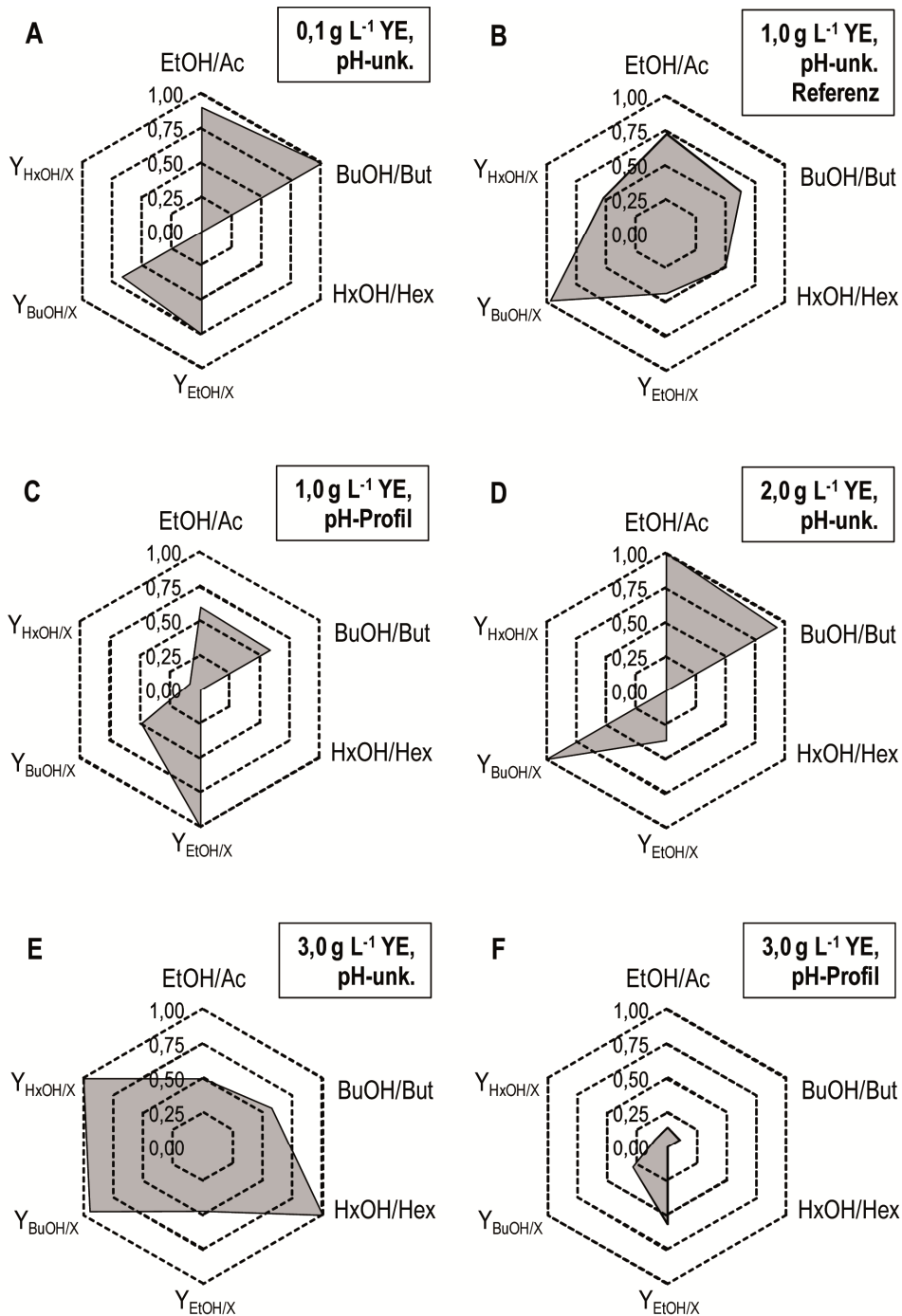


Abbildung 5.20: Graphische Darstellung der Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse Ethanol/Acetat (EtOH/Ac), Butanol/Butyrat (BuOH/But), Hexanol/Hexanoat (HxOH/Hex) und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ für Ethanol ($Y_{EtOH/X}$), Butanol ($Y_{BuOH/X}$) und Hexanol ($Y_{HxOH/X}$) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen sowie pH-Führungsstrategien. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden (C6-Produkte in A und D) oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH_{i0} = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P 1,01 bar; V = 1,0 L).

Die zellspezifischen Ausbeutekoeffizienten sind für die Erhöhung der Hefeextraktkonzentration auf 3 g L^{-1} ohne pH-Kontrolle gegenüber des Referenzprozesses um 9 % (Ethanol) erhöht, vergleichbar (Butanol) oder um 89 % (Hexanol) erhöht (Abbildung 5.20). Für das angewandte pH-Profil mit erhöhter Hefeextraktkonzentration ist nur die zellspezifische Ethanolausbeute um den Faktor 1,3 erhöht, während die zellspezifischen Ausbeuten von Butanol um 70 % und Hexanol um 80 % verringert sind. Die beste Prozessleistung hinsichtlich biomassespezifischer Ausbeuten liefert der Prozess mit 3 g L^{-1} Hefeextrakt unter pH unkontrollierten Bedingungen (Abbildung 5.20).

Die Eliminierung der Vitamine aus dem Medium sowie eine Erhöhung der Pantothenatkonzentration in der Vitaminlösung führten nicht zu gesteigerten Alkoholkonzentrationen. Aufgrund vergleichbarer Biotrockenmassekonzentrationen verglichen mit dem Referenzprozess (ohne Abänderung der Vitaminzusammensetzung) wird angenommen, dass die im Hefeextrakt enthaltenen Vitamine hierfür bereits ausreichend waren.

5.5.2 Spurenelemente

Spurenelemente spielen im autotrophen Stoffwechsel bei der Nutzung des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges eine wichtige Rolle, da sie als Cofaktoren von Metalloenzymen (zum Beispiel bifunktionelle CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase, Formiatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenasen, Hydrogenase) wichtig für deren Aktivität sein können (siehe Abschnitt 3.1.6). Daher wurde zunächst in Parallelansätzen in Anaerobflaschen und anschließend von ausgewählten Versuchsansätzen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor der Einfluss verschiedener Spurenelemente auf Wachstum und Alkoholbildung untersucht. Die Auswahl erfolgte dabei anhand der in *C. carboxidivorans* am Acetyl-CoA Stoffwechsel beteiligten Enzyme und deren Liganden siehe Tabelle 3.2 als auch in Anlehnung an einzelne Spurenelementuntersuchungen bezüglich Alkoholbildung in der Literatur. Die Ansätze sind in Tabelle 5.5 dargestellt.

Auf Ansätze, die keinen signifikanten Einfluss auf eine vermehrte Alkoholbildung hatten, soll im Folgenden nicht im Detail eingegangen werden. Dazu zählen das Experiment im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Eliminierung von Kupfer bei gleichzeitiger Verzehnfachung der Molybdänkonzentration, die Variation der Cobaltlimitierung ohne signifikante Unterschiede in der Alkoholbildung in begasten Parallelansätzen in Anaerobflaschen, sowie die Variation der Nickelkonzentration, welche weder durch Erhöhung, noch durch Elimination wesentliche Unterschiede bei der Alkoholbildung aufwies (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 5.5: Aufstellung der untersuchten Variationen ausgewählter Spurenelementzusammensetzungen für die autotrophen Prozesse mit *C. carboxidivorans* in Anaerobflaschen (FLA) beziehungsweise im Rührkesselreaktor (STR) in Anlehnung an Metalloenzyme des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs sowie Angaben aus der Literatur. –: nicht durchgeführt; ✓: im dargestellten Reaktionssystem durchgeführt.

Spurenelemente	FLA	STR	Quelle
0x Cu ²⁺ , 10x Mo ²⁺	–	✓	„Eliminierung von Kupfer bei gleichzeitiger Verzehnfachung von Molybdän erhöht die Ethanolproduktion von <i>C. carboxidivorans</i> , nicht aber die Butanol-, oder Hexanolbildung“: (Phillips et al. 2015)
0x Co ²⁺	✓	✓	„Cobaltlimitierung bei <i>C. ljungdahlii</i> erhöht die Ethanolproduktion“ (Gaddy et al. 2007)
0,05x Co ²⁺		(0x Co)	
0,1x Co ²⁺			
0,5x Co ²⁺			
1x Co ²⁺			
2x Co ²⁺			
5x Co ²⁺			
3x Zn ²⁺	–	✓	„Optimale Zn-Konzentration für die Ethanolbildung mit <i>C. ragsdalei</i> wurde zu 24,8 µM identifiziert“ (Saxena und Tanner 2011)
0x Fe ²⁺	✓	✓	„Verzehnfachung der Eisenkonzentration erhöht die Ethanolkonzentration bei der Kultivierung mit <i>C. carboxidivorans</i> “ (Lewis et al. 2006)
1x Fe ²⁺		(10x Fe ²⁺)	
10x Fe ²⁺			
0x Ni ²⁺	✓	–	„Verzehnfachung der Ni-Konzentration erhöht die Alkoholproduktion von <i>C. ragsdalei</i> “ (Saxena und Tanner 2011)
1x Ni ²⁺			
10x Ni ²⁺			

Untersuchungen zur Variation der Spurenelementkonzentrationen von Fe^{2+} sowie Zn^{2+} waren hingegen mit deutlichen Effekten bei der Alkoholbildung verbunden. Experimente in Anaerobflaschen mit Eliminierung von Fe^{2+} aus der Spurenelementlösung zeigten kein Wachstum, sodass dieses als essentiell für das Wachstum identifiziert wurde. Eine Verzehnfachung der Fe^{2+} -Konzentration zeigte in Anaerobflaschen nach einer Prozesszeit von 7,0 d eine Erhöhung der autotrophen Alkoholbildung für alle drei Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol im Vergleich zu einem Prozess mit Standardspurenelementzusammensetzung (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden diese vielversprechenden Ansätze ($10\times \text{Fe}^{2+}$, $3\times \text{Zn}^{2+}$) im Rührkesselreaktor genauer charakterisiert. Beide Prozessverläufe sind für die Produkte und den pH vergleichend zum Referenzprozess (ohne Abänderung der Spurenelementzusammensetzung) in Abbildung 5.21 aufgetragen. Für die beiden Erhöhungen der Spurenelemente Fe^{2+} oder Zn^{2+} wurde eine höhere maximale Biotrockenmassenkonzentration in der stationären Phase beobachtet im Vergleich zum Referenzprozess, welche bei Werten von $0,67 \text{ g L}^{-1}$ ($3\times \text{Zn}^{2+}$) beziehungsweise $0,59 \text{ g L}^{-1}$ ($10\times \text{Fe}^{2+}$) lagen. Insbesondere bei der Fe^{2+} -Erhöhung war dies begleitet von einer höheren spezifischen Wachstumsrate in der exponentiellen Phase (Tabelle 5.6). Hingegen war die maximale Acetatkonzentration in beiden Fällen geringer mit $0,76 \text{ g L}^{-1}$ ($3\times \text{Zn}^{2+}$) und $0,64 \text{ g L}^{-1}$ ($10\times \text{Fe}^{2+}$). Auffallend ist, dass der pH-Verlauf für die Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration zwei Minima aufweist, eines nach einer Prozesszeit von 0,7 d, das zweite nach einer Prozesszeit von 1,5 d, bevor dieser wieder zu steigen begann. Bis Prozessende stieg dieser im Vergleich zur Fe^{2+} -Erhöhung oder dem Referenzprozess auf einen hohen pH von pH 6,0 wieder an.

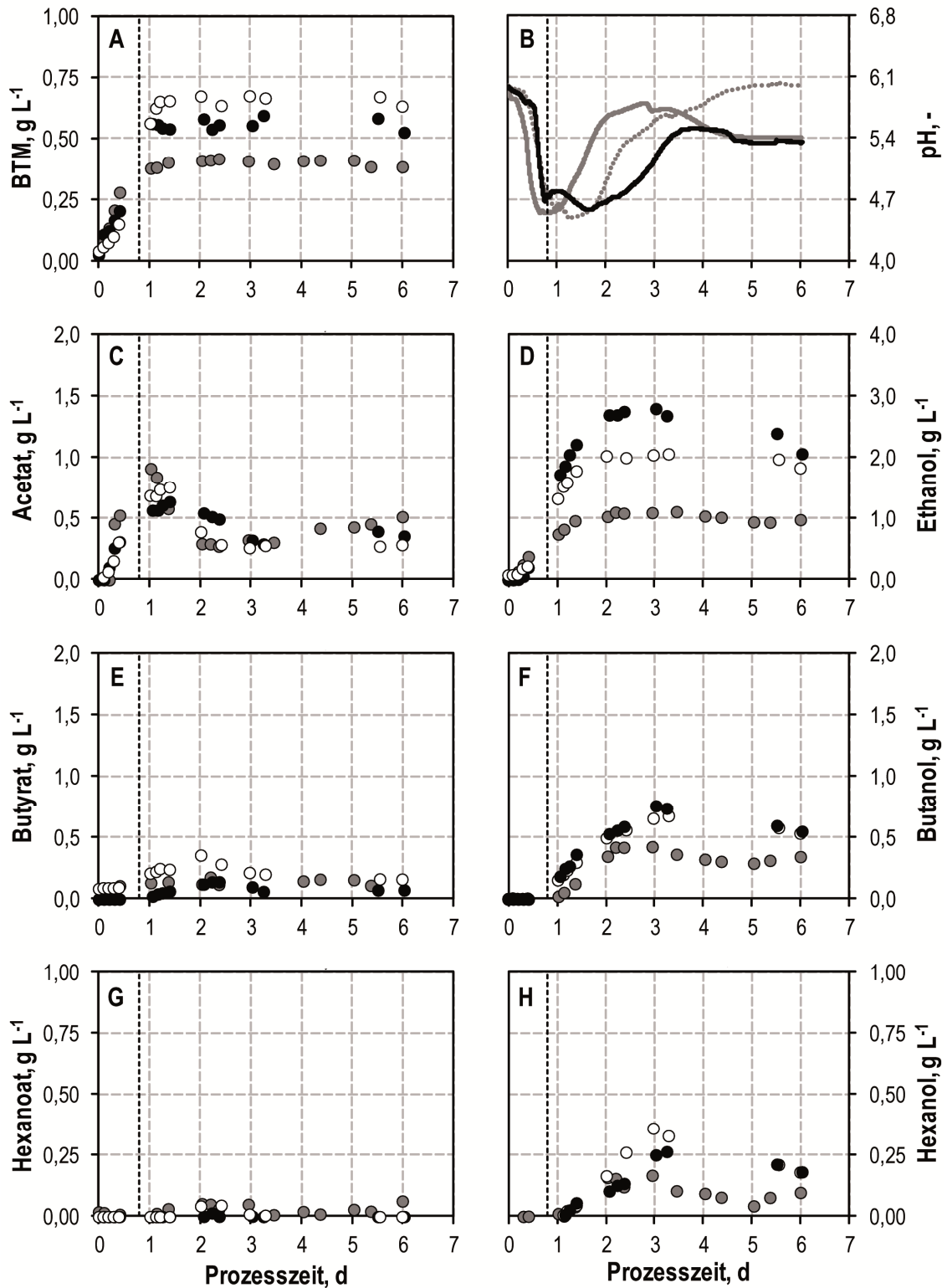


Abbildung 5.21: Autotrophe Satzkultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Variation unterschiedlicher Spurenelemente unter pH unkontrollierten Bedingungen. Verdreifachte Zn^{2+} -Konzentration (weiß, grau gepunktet), Referenzprozess (grau), verzehnfachte Fe^{2+} -Konzentration (schwarz). Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Wechsel von der acidogenen Phase zur solventogenen Phase. ($CO:CO_2 = 80:20$; $T = 37\text{ }^{\circ}C$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{Gas} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

Tabelle 5.6: Maximalwerte für die Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifische Wachstumsrate μ und erzielte Säure- und Alkoholkonzentrationen bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* des Referenzprozesses ohne Abänderung der Spurenelementzusammensetzung, bei Verzehnfachung der Fe²⁺-Konzentration (10x Fe²⁺) und Verdreifachung der Zn²⁺-Konzentration (3x Zn²⁺). Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

	Referenz	3x Zn ²⁺	10x Fe ²⁺
BTM, g L ⁻¹	0,45 ± 0,03	0,67	0,59
μ , h ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,14	0,22
Acetat, g L ⁻¹	0,91 ± 0,06	0,76	0,64
Ethanol, g L ⁻¹	1,21 ± 0,05	2,06	2,80
Butyrat, g L ⁻¹	0,21 ± 0,06	0,36	0,14
Butanol, g L ⁻¹	0,44 ± 0,07	0,68	0,76
Hexanoat, g L ⁻¹	0,07 ± 0,00	0,05	0,01
Hexanol, g L ⁻¹	0,15 ± 0,04	0,36	0,27

Während der Anstiegsphase des pH wurde Ethanol gebildet. Dabei wurde mit einer Erhöhung der Zn²⁺-Konzentration maximal 2,06 g L⁻¹ Ethanol gebildet, was einer Erhöhung um den Faktor 1,7 entspricht. Bei Erhöhung von Fe²⁺ erhöhte sich die Ethanolkonzentration um den Faktor 2,3 mit einer erzielten Ethanolkonzentration von 2,80 g L⁻¹. Insbesondere bei der Erhöhung der Zn²⁺-Konzentration war eine vermehrte Butyratbildung zu sehen (0,36 g L⁻¹) im Vergleich zum Referenzprozess (0,15 g L⁻¹), während unter diesen Versuchsbedingungen kaum Hexanoat gebildet wurde. Neben der Erhöhung der Ethanolkonzentration war auch die Butanolkonzentration sowohl mit Erhöhung von Fe²⁺, als auch mit Zn²⁺ (0,76 g L⁻¹ beziehungsweise 0,68 g L⁻¹, Faktor 1,7 beziehungsweise 1,5) gegenüber einer Referenzbutanolkonzentration erhöht. Auch für den Alkohol Hexanol konnten die Maximalkonzentrationen bei der Erhöhung der beiden Metallionen erhöht werden (0,27 g L⁻¹; 0,36 g L⁻¹ Hexanol).

Die aufgespannte Fläche des Netzdiagramms mit den Produktkonzentrationen zeigt eine verbesserte Prozessleistung beider Spurenelementerhöhung gegenüber dem Referenzprozess (Abbildung 5.22). Dabei ist bei 10x Fe²⁺-Konzentration die Ethanol- und Butanolbildung maximal, während mit 3x Zn²⁺-Konzentration die Hexanolkonzentration sowie die Butyratkonzentration maximal ist.

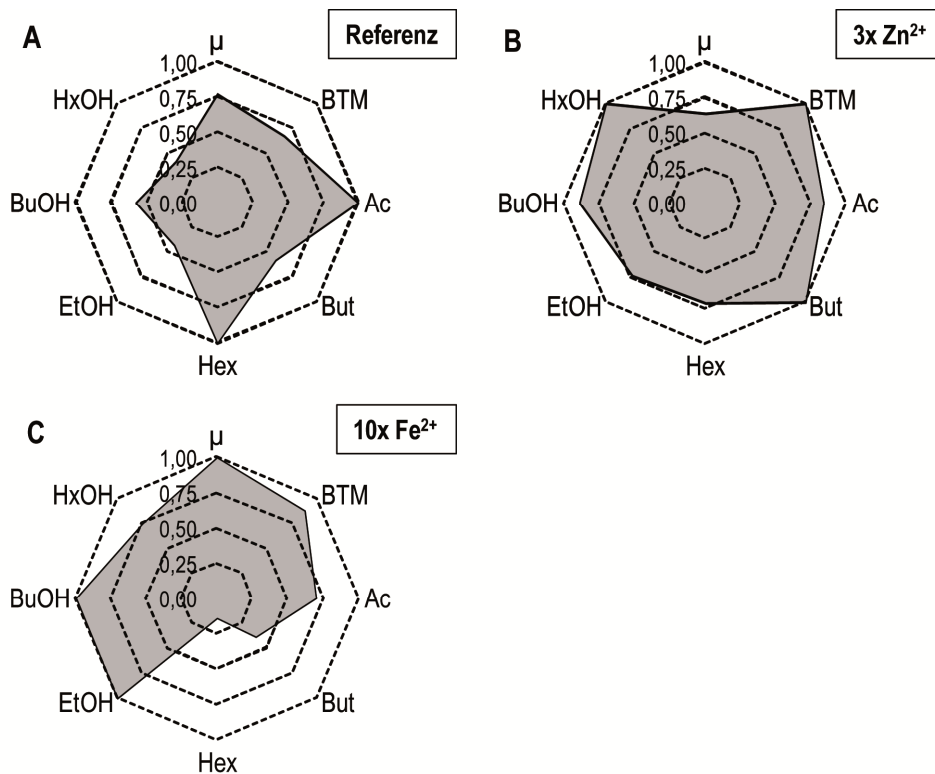


Abbildung 5.22: Graphische Darstellung der maximalen Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifischen Wachstumsrate (μ) und der erzielten Säure- und Alkoholkonzentrationen Acetat (Ac), Butyrat (But), Hexanoat (Hex), Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH) und Hexanol (HxOH) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO_2 im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* mit unterschiedlicher Spurenelementzusammensetzung. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $T = 37^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

In Abbildung 5.23 sind die Abgasdaten dieser drei durchgeführten Rührkesselreaktorprozesse zu sehen. Dabei fiel der CO -Partialdruck sowohl mit Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration als auch mit Erhöhung der Zn^{2+} -Konzentration auf niedrigere Werte im Bereich von 725 – 735 mbar verglichen mit dem Referenzprozess ab. Entsprechend stieg der CO_2 -Partialdruck mit Erhöhung der Zn^{2+} - oder Fe^{2+} -Konzentration auf Werte von 270 – 280 mbar an (Referenzprozess: 250 mbar). Daher waren die maximalen volumetrischen CO -Gasauflahmeraten (jeweils $25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und die CO_2 -Bildungsraten (jeweils $16 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) gegenüber dem Referenzprozess gesteigert, bevor diese bis zu einer Prozesszeit von etwa 4,0 d zum Erliegen kamen.

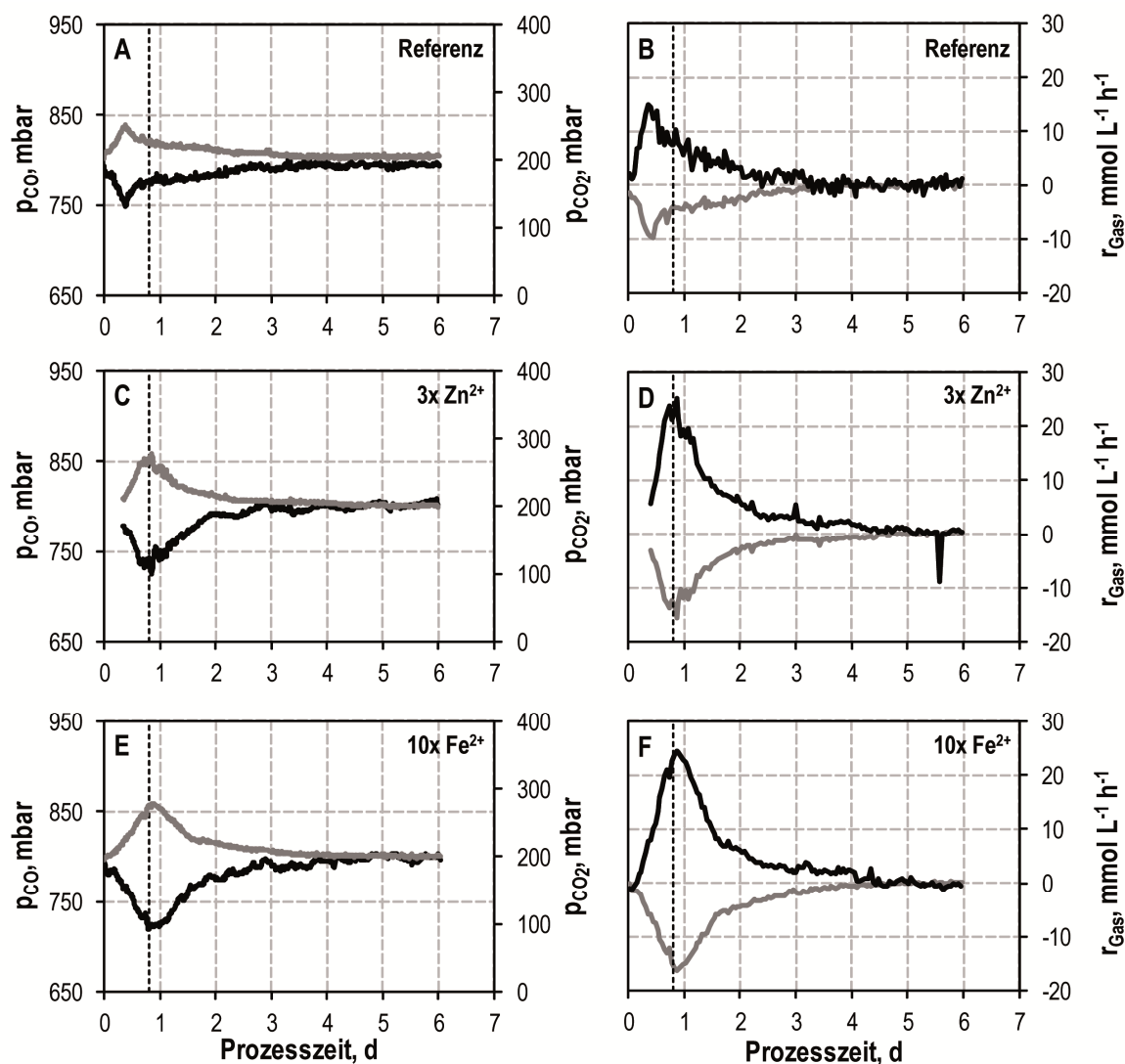


Abbildung 5.23: Partialdrücke p_{CO} (schwarz) und p_{CO_2} (grau) sowie volumetrische Gasaufnahmeleistungen r_{CO} (schwarz) und r_{CO_2} (grau) der Satz kultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit unterschiedlicher Spurenelementzusammensetzung unter pH unkontrollierten Bedingungen. ($CO:CO_2 = 80:20$; $T = 37\text{ °C}$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{Gas} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

Diskussion

Voruntersuchungen in Parallelansätzen mit unterschiedlichen Spurenelementzusammensetzungen sollten einer Vorauswahl geeigneter Prozessbedingungen für nachfolgende Prozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor darstellen. Dabei zeigte eine Erhöhung der Nickelkonzentration keine erhöhte Alkoholbildung. Zwar ist Nickel ein Teil des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase (CODH) (Ragsdale 2006; Drake 1994), welche für die Fixierung von CO verantwortlich ist und die Aktivität der

CODH bei ausreichend hoher Nickelkonzentration erhöhen könnte, allerdings hat diese Reaktion keinen direkten Einfluss auf Reaktionen, die an der Alkoholbildung beteiligt sind, womit das Ausbleiben der Steigerung der Alkoholbildung erklärt werden könnte. Entgegen der beobachteten Erhöhung der Ethanolkonzentration bei Eliminierung von Kupfer bei gleichzeitiger Verzehnfachung von Molybdän in autotrophen Flaschenansätzen in der Literatur mit *C. carboxidivorans* (Phillips et al. 2015), zeigte ein analog dazu durchgeführter Prozess im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor keine erhöhte Ethanolbildung. Es ist unklar, warum die Elimination von Kupfer als Inhibitor der Acetyl-CoA-Synthetase (Bramlett et al. 2003) und die Erhöhung von Molybdän als Analogon zu Wolfram in den aktiven Zentren der Formiat-Dehydrogenase sowie einiger Aldehyd-Oxidoreduktasen (Phillips et al. 2015) zu keiner erhöhten Alkoholbildung führte. Eine Cobaltlimitierung führte bei *C. ljungdahlii* zu einer Erhöhung der Ethanolbildung (Gaddy et al. 2007), was in der hier durchgeführten Versuchsreihe nicht beobachtet wird. Cobalt spielt dabei eine Rolle bei der Übertragung der Methylgruppe auf das Tetrahydrofolat (THF). Ist Cobalt limitierend, soll seine Umsetzung in verringertem Maße stattfinden und zu einem erhöhten NAD(P)H zu NAD(P)⁺ Verhältnis führen, wobei die Reduktionsäquivalente für eine vermehrte Ethanolbildung herangezogen werden (Gaddy et al. 2007).

Tabelle 5.7: Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* des Referenzprozesses ohne Abänderung der Spurenelementzusammensetzung, bei Verzehnfachung der Fe²⁺-Konzentration (10x Fe²⁺) und Verdreifachung der Zn²⁺-Konzentration (3x Zn²⁺). Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

	Referenz	3x Zn ²⁺	10x Fe ²⁺
EtOH/Acetat, g g ⁻¹	3,59 ± 0,07	7,84	9,19
BuOH/Butyrat, g g ⁻¹	4,11 ± 0,15	3,57	12,05
HxOH/Hexanoat, g g ⁻¹	4,33 ± 1,67	5,71	- ^{a)}
Y _{EtOH/X} , g g ⁻¹	2,87 ± 0,04	3,16	5,07
Y _{BuOH/X} , g g ⁻¹	1,10 ± 0,17	1,02	1,38
Y _{HxOH/X} , g g ⁻¹	0,35 ± 0,03	0,54	0,46

^{a)}keine Hexanoatbildung

Eine Erhöhung der Eisenkonzentration ebenso wie der Zinkkonzentration führt hingegen zu vermehrter Alkoholbildung. Dabei sind alle von *C. carboxidivorans* hergestellten Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol hiervon betroffen mit gesteigerten zellspezifischen Alkoholausbeuten (Tabelle 5.7). Die spezifische Ethanol- und Butanol-ausbeute sind um den Faktor 1,8 beziehungsweise 1,3 bei Verzehnfachung der Fe^{2+} -Konzentration gegenüber einem Prozess mit unveränderter Spurenelementzusammensetzung erhöht. Die zellspezifische Hexanolausbeute ist bei Verdreifachung der Zn^{2+} -Konzentration am höchsten.

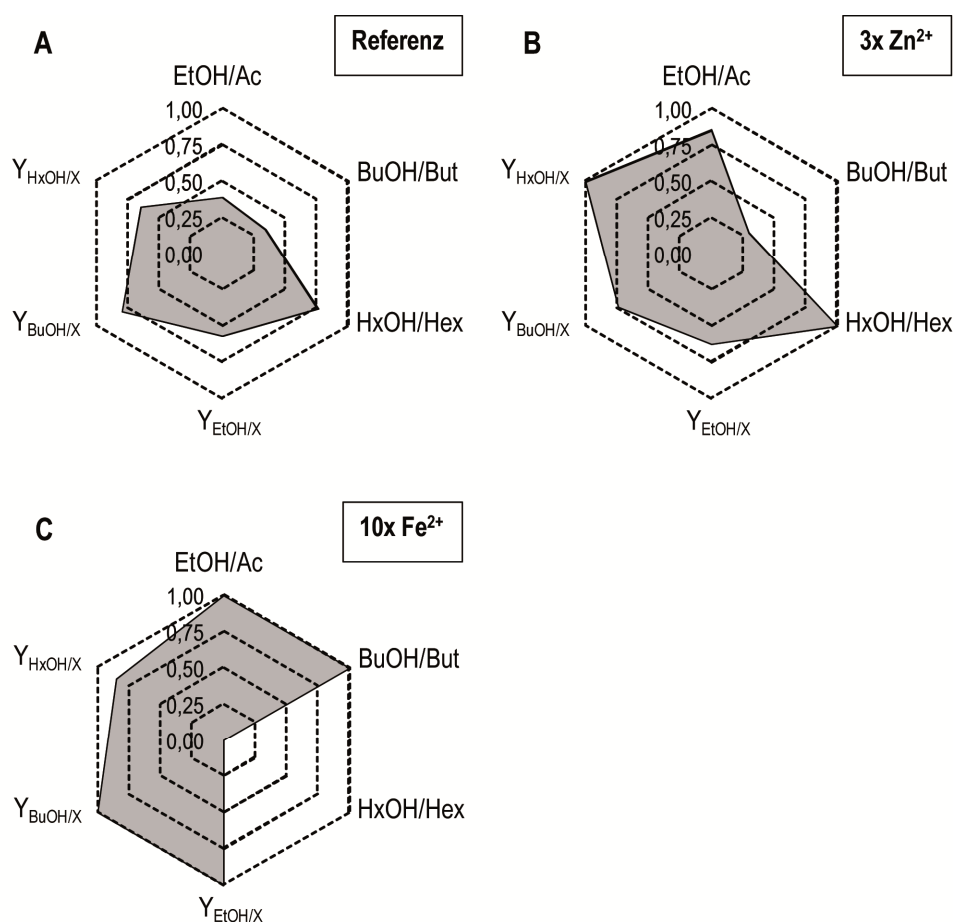


Abbildung 5.24: Graphische Darstellung der Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse Ethanol/Acetat (EtOH/Ac), Butanol/Butyrat (BuOH/But), Hexanol/Hexanoat (HxOH/Hex) und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ für Ethanol ($Y_{\text{EtOH}/X}$), Butanol ($Y_{\text{BuOH}/X}$) und Hexanol ($Y_{\text{HxOH}/X}$) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO_2 im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* mit unterschiedlicher Spurenelementzusammensetzung. Der jeweils höchste Wert meters wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $T = 37\text{ °C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P\text{ V}^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5\text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01\text{ bar}$; $V = 1,0\text{ L}$).

Das maximale Ethanol zu Acetat-Verhältnis bei $10\times \text{Fe}^{2+}$ erhöht sich um den Faktor 2,6 und bei $3\times \text{Zn}^{2+}$ um den Faktor 2,2 gegenüber dem Referenzprozess (Tabelle 5.7). Für das Butanol zu Butyrat-Verhältnis liegt für $10\times \text{Fe}^{2+}$ eine Erhöhung um den Faktor 2,9 vor. Das höchste Hexanol zu Hexanoat-Verhältnis konnte bei dem Prozess mit verdreifachter Zn^{2+} -Konzentration erzielt werden (Erhöhung um Faktor 1,3). Die Ausbeuten und Alkohol zu Säure-Verhältnisse zeigen die beste Prozessleistung für eine verzehnfachte Fe^{2+} -Konzentration (Abbildung 5.24).

Die vermehrte Alkoholbildung leitet sich nicht ausschließlich aus einer vermehrten Säurebildung bei anschließender Umsetzung in Alkohole ab. Die zeitlichen Verläufe der Molmengen an Kohlenstoff der C2-, C4- und C6 Produkte bei den unterschiedlichen Prozessbedingungen zeigen dies (Abbildung 5.25). Für die Erhöhung der Zn^{2+} -Konzentration als auch der Fe^{2+} -Konzentration übersteigen die Kohlenstoffmengen von Ethanol, Butanol und Hexanol ab dem Erreichen des Maximums der jeweiligen Säure die abgebaute Kohlenstoffmenge der Säure, sodass neben der Umsetzung aus der Säure ein Teil des jeweiligen Alkohols über direkte Bildung entstanden ist (*de novo*). Dies wurde bisher nicht beschrieben. Die direkte Umsetzung des jeweiligen CoA-Intermediats zum Alkohol könnte hier erfolgt sein, siehe auch Abbildung 3.4 (Daniell et al. 2012; Fernández-Naveira et al. 2017b).

Fe-Schwefel-Proteine sind in allen Schlüsselmetalloenzymen des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges mit 2 – 8 Fe-Atomen pro Enzym enthalten und daher der Bedarf als Spurenelement gegenüber anderen Metallen höher (Ragsdale 2008; Phillips et al. 2015). Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration den Kohlenstofffluss zur Fixierung der Gase CO und CO_2 erhöht, was unter anderem an höheren volumetrischen CO-Gasaufnahmeraten zu sehen ist und in einer höheren Biotrockenmassekonzentration bei höherer spezifischer Wachstumsrate resultiert. Des Weiteren ist eine Vielzahl an Alkoholdehydrogenasen (ADH) in Clostridien Eisen-abhängig oder Zink-abhängig (Korkhin et al. 1998). Bei den in UniProt für *C. carboxidivorans* hinterlegten Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen und Aldehyd:Ferreodoxin-Oxidoreduktasen besitzt ein Großteil hiervon Eisen als Liganden. Für einige Alkoholdehydrogenasen (CcarbDRAFT_5253, CcarbDRAFT_3442, CcarbDRAFT_2090, CcarbDRAFT_0048) ist Zn^{2+} als Cofaktor angegeben. Durch die zusätzliche Bereitstellung von Fe^{2+} beziehungsweise Zn^{2+} wurde dem Stamm genügend dieser Spurenelemente zur Verfügung gestellt, welches zur Funktionalität und wohl auch gesteigerten Aktivität der an der Umsetzung zu Alkoholen beteiligten Enzyme beigetragen hat und den Kohlenstofffluss in Richtung Alkoholbildung treibt.

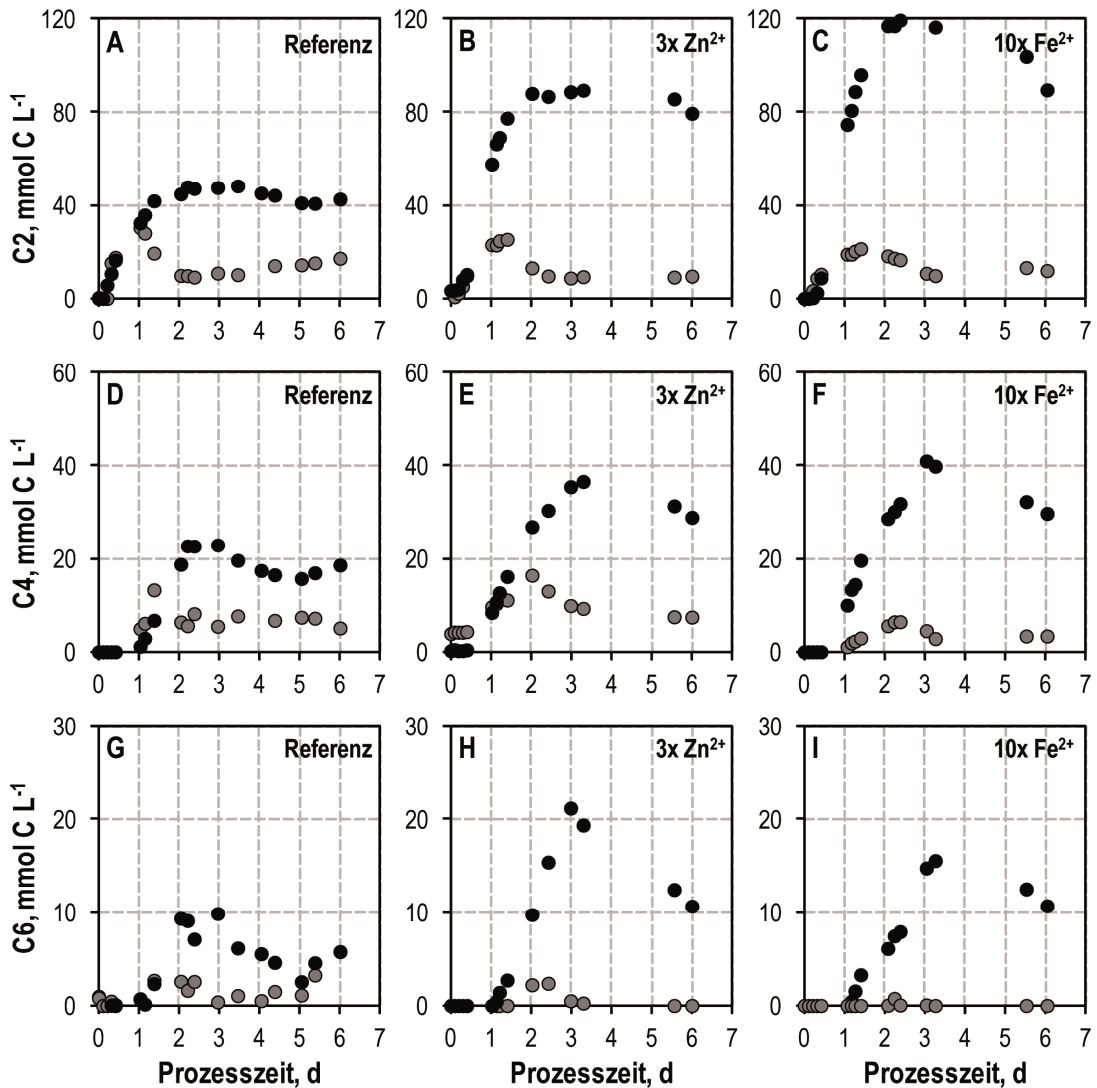


Abbildung 5.25: Kohlenstoffmenge mmol C L⁻¹ in den C2-, C4-, und C6-Produkten bei autotrophen Satz kultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Variation unterschiedlicher Spurenelemente unter pH unkontrollierten Bedingungen. Verdreifachte Zn²⁺-Konzentration (3x Zn²⁺), und verzehnfachte Fe²⁺-Konzentration (10x Fe²⁺) im Vergleich zum Referenzprozess. Die Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol sind in schwarz, die Säuren Acetat, Butyrat und Hexanoat sind in grau dargestellt. (CO:CO₂ = 80:20; T = 37 °C; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Gesteigerte Alkoholbildung mit erhöhter Zn²⁺-Konzentration ist in der Literatur mit *C. ragsdalei* in autotrophen Anaerobflaschenprozessen beschrieben (Saxena und Tanner 2011). Eine andere Forschungsgruppe beschäftigte sich erst kürzlich mit dem Einfluss von Zn²⁺ auf die Alkoholbildung von *C. carboxidivorans* (Li et al. 2018). Sie beobachteten Erhöhungen der Alkoholkonzentrationen bei der Anwendung hoher Zn²⁺-Konzentrationen (280 µM anstelle von 7 µM) in nachbegasten Serumflaschen. Ethanolkonzentrationen wurden im kontinuierlich betriebenen Blasensäulenreaktor durch

Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration mit *C. carboxidivorans* erhöht (Lewis et al. 2006). Eine zusätzliche *de novo* Synthese der Alkohole direkt aus den CoA-Intermediaten anstelle der Reduktion wiederaufgenommener Säuren wurde jedoch in beiden Quellen nicht beschrieben.

5.6 Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf die Produktverteilung von *C. carboxidivorans* wurde anhand unterschiedlich eingestellter Prozesstemperaturen untersucht. Die Prozesstemperatur wurde in sequentiell durchgeführten Satzprozessen auf 30 °C, 25 °C, und 20 °C eingestellt und mit Referenzprozess (37 °C) verglichen. Die Verläufe von Biomasse und der Produkte für Temperaturen von 37 °C, 30 °C und 25 °C sind Abbildung 5.26 zu entnehmen.

Bei allen drei Temperaturen setzte das Wachstum sofort ein. Die stationäre Phase wurde beim Referenzprozess mit 37 °C nach 1,0 d erreicht, während dies bei einer Prozesstemperatur von 30 °C nach 1,4 d der Fall war und bei einer Prozesstemperatur von 25 °C nach 2,0 d eintrat. Die maximal erzielten Biotrockenmassekonzentrationen sind für alle angewandten abgesenkten Temperaturen um den Faktor 1,2 – 1,3 höher (Tabelle 5.8), die zellspezifischen Wachstumsraten jedoch umso geringer, je geringer die Temperatur abweichend von der optimalen Kultivierungstemperatur gewählt wurde ($\mu_{30\text{ °C}}$ um 39 % geringer, $\mu_{25\text{ °C}}$ um 49 % geringer). Gemäß dem verlangsamten Wachstum fiel bei reduzierten Prozesstemperaturen der pH langsamer ab und erreichte sein Minimum jeweils erst mit Erreichen der stationären Phase, bevor dieser wiederum gegenüber dem pH-Verlauf von 37 °C deutlich verlangsamer anstieg. Die maximal erzielten Acetatkonzentrationen wurden jeweils mit dem Erreichen des pH-Minimums erreicht und fielen mit sinkender Temperatur geringer aus (13 % geringer bei 25 °C, 44 % geringer bei 20 °C verglichen zu 37 °C). Die gebildete Konzentration von Ethanol war mit 0,95 g L⁻¹ beziehungsweise 0,92 g L⁻¹ für Temperaturen von 30 °C und 25 °C identisch und im Vergleich zur Ethanolkonzentration bei 37 °C leicht geringer. Die maximale Butyratkonzentration war umso höher, je geringer die Kultivierungstemperatur gewählt wurde (Faktor 2,1 bei 25 °C). Ähnlich zur Butyratkonzentration war die maximale Hexanoatkonzentration bei verringerter Temperatur höher, bevor diese wiederum (nahezu) komplett auf null abfielen. Die Konzentration an Hexanol wurde durch Absenkung der Prozesstemperatur ebenfalls gesteigert (Faktor 2,9 – 3,1 bei 30 °C beziehungsweise 25 °C gegenüber 37 °C).

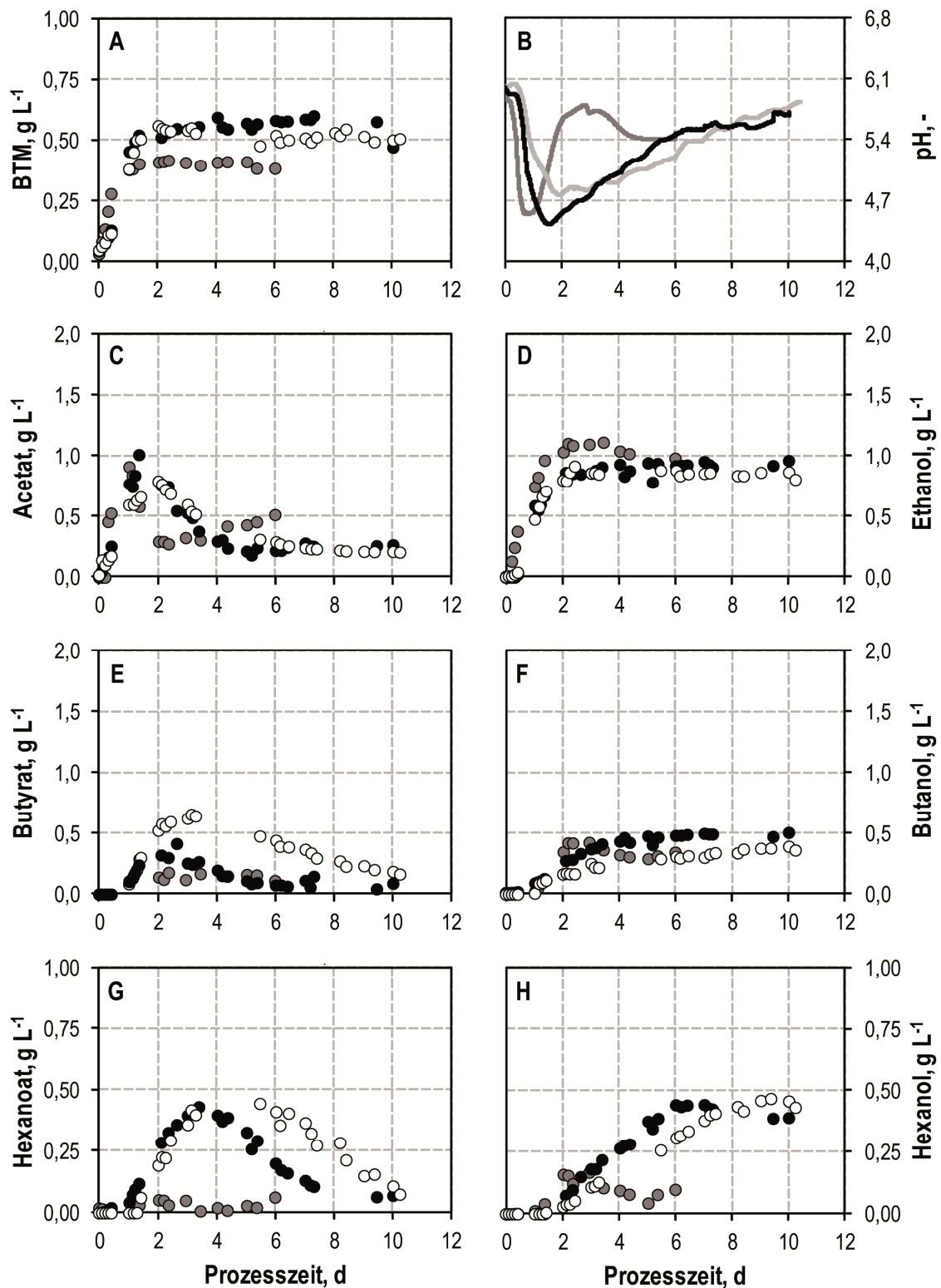


Abbildung 5.26: Autotrophe Satzkultivierungen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Temperaturen unter pH unkontrollierten Bedingungen. 25 °C (weiß, hellgrau), 30 °C (schwarz) und Referenzprozess bei 37 °C (dunkelgrau). ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Tabelle 5.8: Maximalwerte für die Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifische Wachstumsrate μ , und Produktkonzentrationen bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Prozesstemperaturen. Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Temperatur	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
BTM, g L ⁻¹	0,58	0,55	0,60	0,45 ± 0,03
μ , h ⁻¹	0,03	0,08	0,10	0,17 ± 0,01
Acetat, g L ⁻¹	0,51	0,79	1,01	0,91 ± 0,06
Ethanol, g L ⁻¹	0,88	0,92	0,95	1,21 ± 0,05
Butyrat, g L ⁻¹	0,33	0,45	0,32	0,21 ± 0,06
Butanol, g L ⁻¹	0,33	0,38	0,50	0,44 ± 0,07
Hexanoat, g L ⁻¹	0,31	0,24	0,24	0,07 ± 0,00
Hexanol, g L ⁻¹	0,26	0,47	0,44	0,15 ± 0,04

Das Wachstum war bei 20 °C (Prozessverlauf nicht dargestellt) extrem verlangsamt (82 % Einbußen in der spezifischen Wachstumsrate) bei einer vergleichbaren erzielten Biotrockenmassekonzentration in der stationären Phase. Daneben wurden die maximal erreichten Säurekonzentrationen von Acetat (0,51 g L⁻¹), Butyrat (0,33 g L⁻¹) und Hexanoat (0,31 g L⁻¹) im Anschluss daran nicht mehr wie gewöhnlich reduziert, sondern verblieben bis Prozessende bei diesen Werten (Verläufe nicht gezeigt) bei erzielten Alkoholkonzentrationen von 0,88 g L⁻¹ Ethanol, 0,33 g L⁻¹ Butanol und 0,26 g L⁻¹ Hexanol.

Mit Reduzierung der Prozesstemperatur auf 30 °C konnten die Konzentrationen der Alkohole Butanol und Hexanol gesteigert werden, mit Reduzierung auf 25 °C die Bildung der länger-kettigen Säuren Butyrat und Hexanoat sowie des Hexanol erhöht werden (Abbildung 5.27).

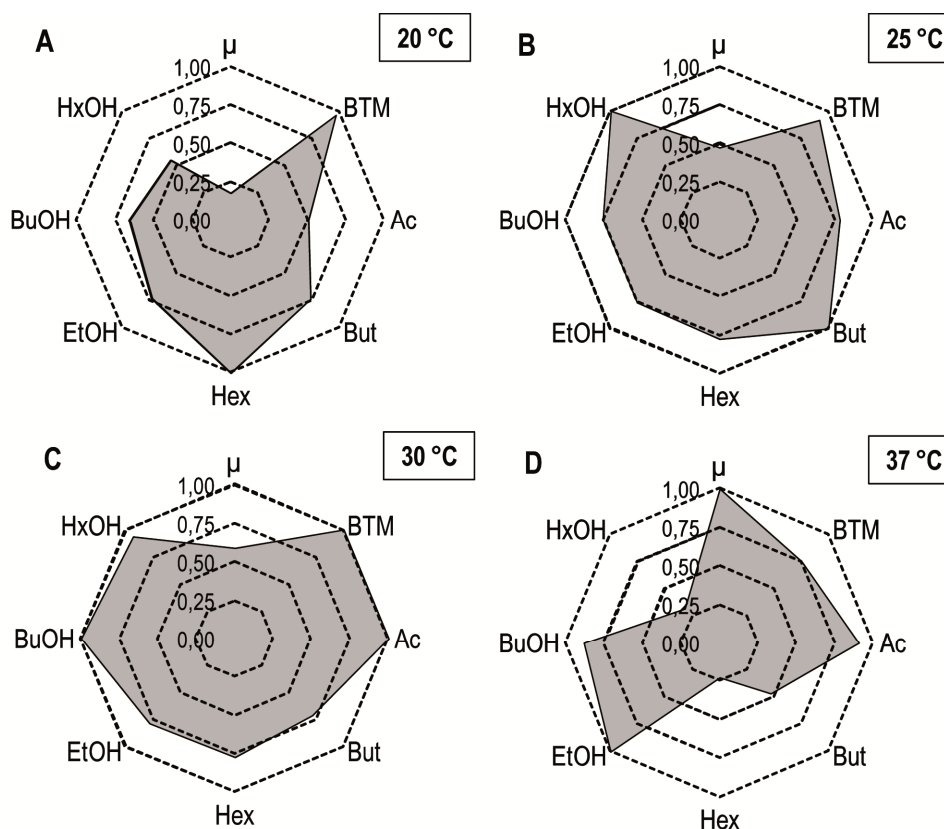


Abbildung 5.27: Graphische Darstellung der maximalen Biotrockenmassekonzentration (BTM), spezifischen Wachstumsrate (μ) und der erzielten Säure- und Alkoholkonzentrationen Acetat (Ac), Butyrat (But), Hexanoat (Hex), Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH) und Hexanol (HxOH) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Temperaturen. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. (CO:CO₂ = 80:20; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Diskussion

Unter allen angewandten Prozesstemperaturen kann Wachstum sowie Produktbildung verzeichnet werden. Die unterschiedlichen Temperaturen haben dabei großen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Metabolismus sowie auf die Produktverteilung. Je niedriger die Temperatur ist, desto geringer ist die spezifische Wachstumsrate.

Für die volumetrischen Produktbildungsraten (Abbildung 5.28) kann diese Aussage nicht pauschal getroffen werden, da dies für die einzelnen Produkte betrachtet werden muss: Die volumetrische Acetatbildungsrate fällt von einem Maximalwert von 1,72 g L⁻¹ d⁻¹ bis auf 0,45 g L⁻¹ d⁻¹ mit sinkender Temperatur ab. Dabei verschiebt sich das Erreichen des Maximalwertes der volumetrischen Acetatbildungsrate mit sinkender Temperatur zu

höheren Prozesszeiten. Die volumetrische Ethanolbildungsrate ist für eine Prozesstemperatur von 30 °C am höchsten, zeitlich gesehen liegen diese in einem engen Zeitraum für Temperaturen von 37 °C – 25 °C.

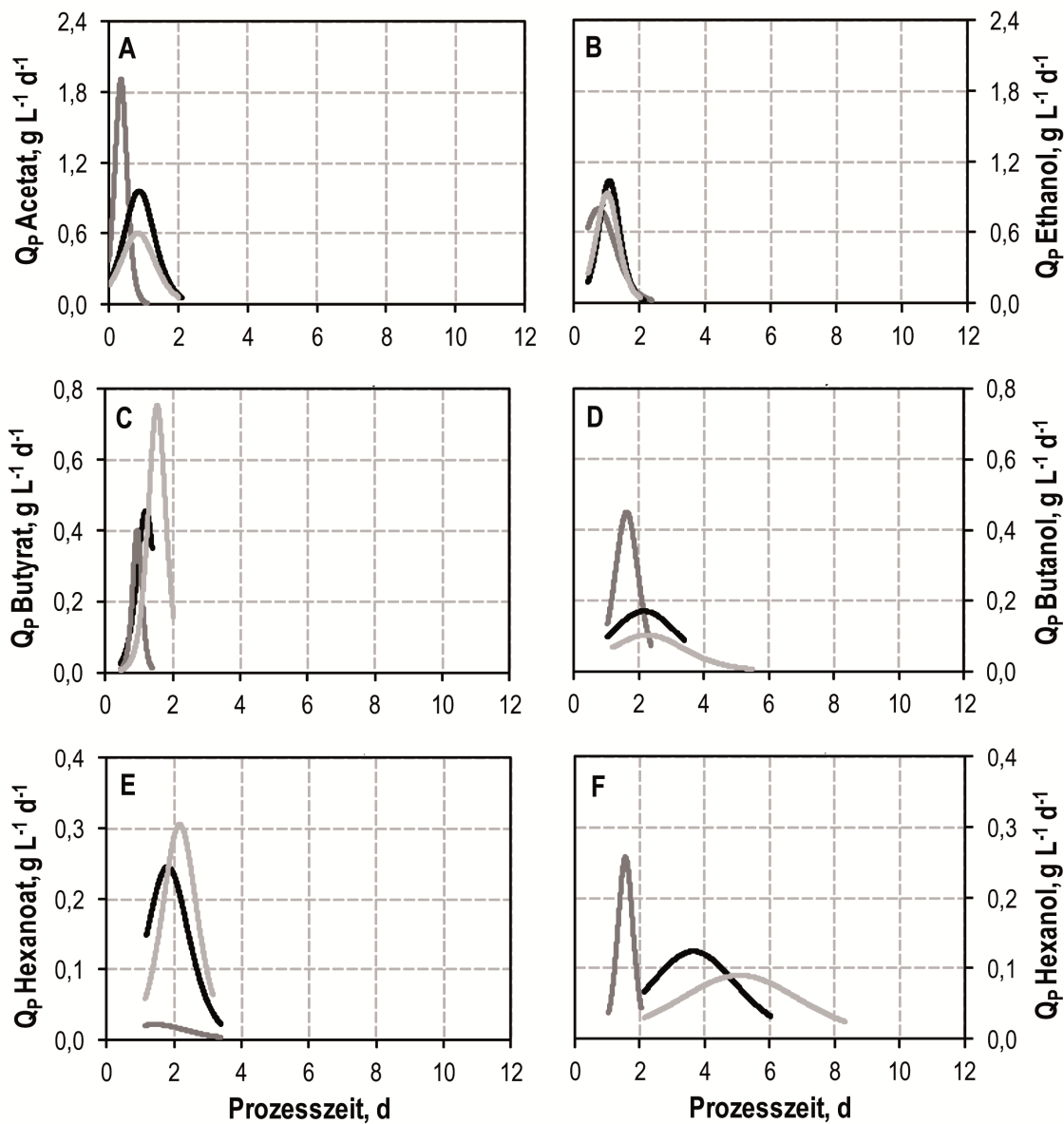


Abbildung 5.28: Volumetrische Produktbildungsraten Q_p von *C. carboxidivorans* in autotrophen Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor bei Temperaturen von 25 °C (hellgrau), 30 °C (schwarz) und dem Referenzprozess bei 37 °C (dunkelgrau) unter pH unkontrollierten Bedingungen. Die Raten wurden anhand nichtlinearer Interpolationen der offline gemessenen Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen bestimmt. ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Entgegen den Beobachtungen für die Säure Acetat steigen die maximalen volumetrischen Butyratbildungsraten mit sinkender Prozesstemperatur bis 25 °C von 0,38 g L⁻¹ d⁻¹ auf 0,75 g L⁻¹ d⁻¹ an und macht es zu einem bevorzugteren, gebildeten Produkt mit sinkender Prozesstemperatur. Dies ist auch für Hexanoat zu beobachten mit Werten von 0,25 g L⁻¹ d⁻¹ und 0,31 g L⁻¹ d⁻¹. Gleichzeitig werden diese erhöhten Raten bereits zu früheren Zeitpunkten im Prozess erzielt. Die maximalen volumetrischen Produktbildungsraten für Butanol sowie Hexanol nehmen mit sinkender Temperatur ab. Auch die Zeitpunkte zur Erreichung dieser Raten verschieben sich nach hinten.

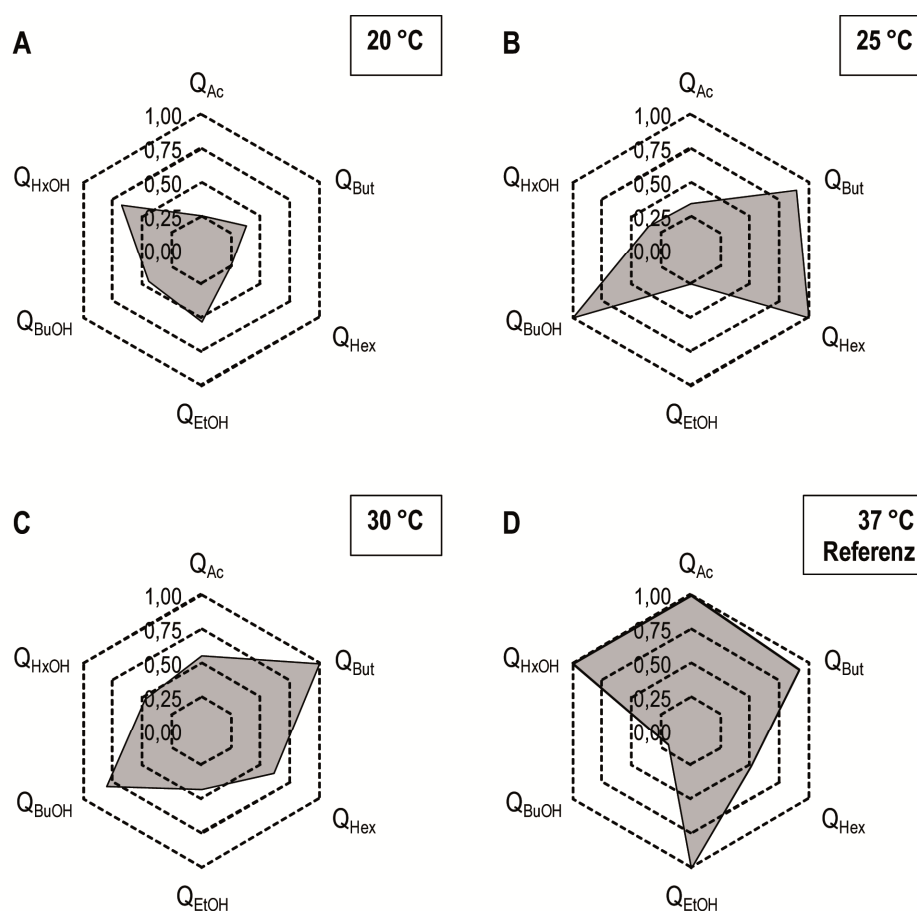


Abbildung 5.29: Graphische Darstellung der maximalen volumetrischen Produktbildungsraten Q_p für Acetat (Ac), Butyrat (But), Hexanoat (Hex), Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH) und Hexanol (HxOH) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Temperaturen. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. (CO:CO₂ = 80:20; pH₀ = 6,0; P V⁻¹ = 15,1 W L⁻¹; F_{Gas} = 5 L h⁻¹; P = 1,01 bar; V = 1,0 L).

Die normierte Darstellung der volumetrischen Produktbildungsraten in Netzdiagrammen macht die bevorzugte Bildung der C4-Produkte und des Hexanoats mit Absenken der Temperatur auf 25 °C deutlich (Abbildung 5.29). Der schnellste Metabolismus liegt aber bei einer Temperatur von 37 °C vor, da die aufgespannte Fläche am größten ist.

Die maximalen Alkohol zu Säure-Verhältnisse wurden bei unterschiedlichen Prozesstemperaturen bestimmt (Tabelle 5.9). Diese zeigen mit Werten von 4,41 $\text{g}_{\text{Ethanol}} \text{g}_{\text{Acetat}}^{-1}$ bei einer Prozesstemperatur von 30 °C ein um den Faktor 1,3 im Vergleich zu 37 °C erhöhtes Alkohol zu Säure-Verhältnis auf. Ebenso weist der Prozess mit einer Temperatur von 30 °C für die C4-Produkte das höchste Butanol zu Butyrat-Verhältnis auf. Die Erhöhung liegt dabei gegenüber einer Prozesstemperatur von 37 °C bei einem Faktor von 2,1. Das höchste Hexanol zu Hexanoat-Verhältnis liegt mit 19,64 $\text{g}_{\text{Hexanol}} \text{g}_{\text{Hexanoat}}^{-1}$ bei einer Temperatur von 25 °C vor.

Tabelle 5.9: Maximalwerte der Alkohol/Säure-Verhältnisse, biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO₂ im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Prozesstemperaturen. Die jeweils höchsten Werte sind optisch hervorgehoben. Standardabweichungen, sofern angegeben, resultieren aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzprozessen. (CO:CO₂ = 80:20, pH₀ = 6,0; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

Temperatur, °C	37 °C	30 °C	25 °C	20 °C
EtOH/Acetat, g g^{-1}	3,59 ± 0,07	4,41	4,12	2,06
BuOH/Butyrat, g g^{-1}	4,11 ± 0,15	8,71	3,56	1,00
HxOH/Hexanoat, g g^{-1}	4,33 ± 1,67	11,19	19,64	1,39
$Y_{\text{EtOH}/X}$, g g^{-1}	2,87 ± 0,04	1,69	1,76	1,62
$Y_{\text{BuOH}/X}$, g g^{-1}	1,10 ± 0,17	0,86	0,77	0,56
$Y_{\text{HxOH}/X}$, g g^{-1}	0,35 ± 0,03	0,76	0,95	0,48
RZA_{EtOH} , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,79 ± 0,09	0,41	0,39	0,19
RZA_{BuOH} , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,24 ± 0,07	0,11	0,07	0,06
RZA_{HxOH} , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,08 ± 0,01	0,07	0,05	0,05

Damit zeigen Satzprozesse mit abgesenkter Temperatur auf 30 °C gegenüber dem Wachstumsoptimum bei 37 °C Tendenzen zur bevorzugten Alkoholbildung beziehungsweise einen ausgeprägteren Abbau von Säuren zugunsten der Alkoholbildung trotz Einbußen bei den metabolischen Raten. Die zellspezifischen Alkoholausbeuten für Ethanol und Butanol sind dabei für eine Prozesstemperatur von 30 °C am höchsten und

zeigen dabei Erhöhungen um Faktoren von 1,6 – 1,7 für Ethanol beziehungsweise 1,2 – 1,3 für Butanol gegenüber reduzierteren Temperaturen. Die zellspezifische Hexanol- ausbeute ist hingegen für eine Temperatur von 25 °C am höchsten. Gemäß dem schnelleren Metabolismus sind die Raum-Zeit-Ausbeuten bis zum Erliegen der Alkoholbildung bei einer Temperatur von 37 °C am höchsten (Abbildung 5.30). Bezüglich der höheren Alkohol zu Säure-Verhältnisse stellt eine Temperatur von 30 °C eine geeignete Prozesstemperatur zur Alkoholbildung in angemessenem Zeitraum dar (Abbildung 5.30).

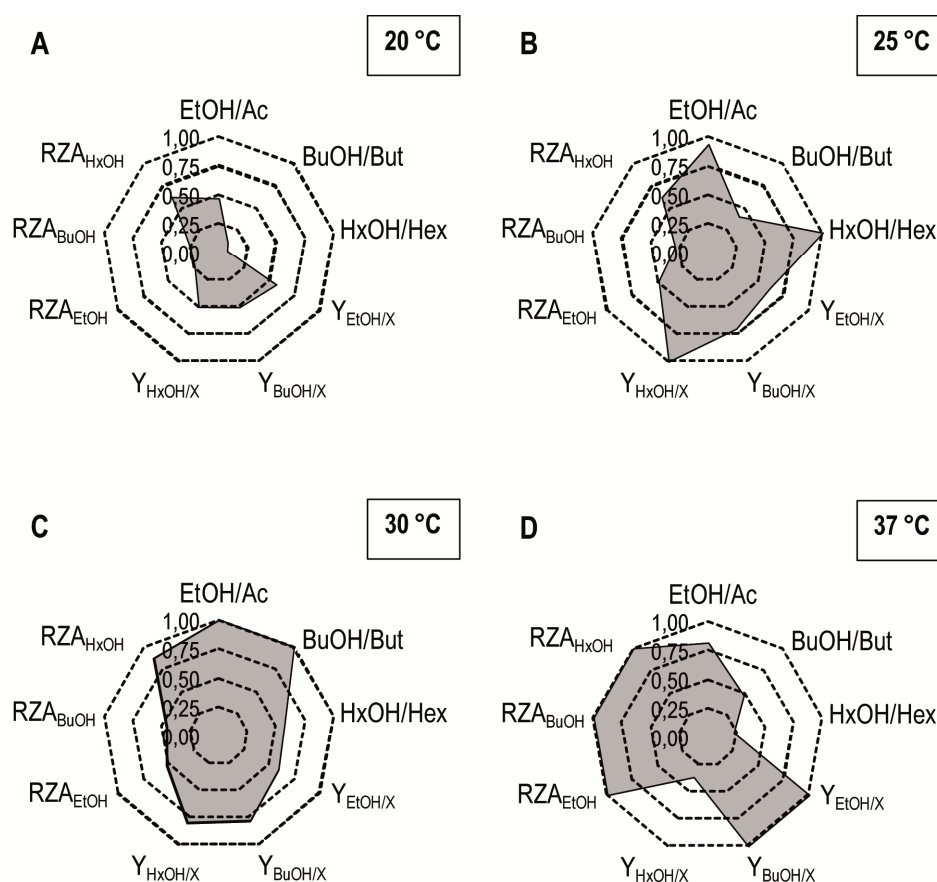


Abbildung 5.30: Graphische Darstellung der Maximalwerte für Alkohol/Säure-Verhältnisse Ethanol/Acetat (EtOH/Ac), Butanol/Butyrat (BuOH/But), Hexanol/Hexanoat (HxOH/Hex) und biomassespezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ für Ethanol ($Y_{EtOH/X}$), Butanol ($Y_{BuOH/X}$) und Hexanol ($Y_{HxOH/X}$) bei der autotrophen Umsetzung von CO/CO_2 im pH unkontrollierten Satzverfahren eines kontinuierlich begasten Rührkesselreaktors mit *C. carboxidivorans* bei unterschiedlichen Prozesstemperaturen. Der jeweils höchste Wert wurde zu 1 normiert und hieraus die Werte für die anderen Prozessbedingungen bestimmt. Werte, die nicht bestimmt wurden oder werden konnten, wurden auf 0 gesetzt. ($CO:CO_2 = 80:20$; $pH_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 W L^{-1}$; $F_{Gas} = 5 L h^{-1}$; $P = 1,01 bar$; $V = 1,0 L$).

Eine Reduzierung der Kultivierungstemperatur ist zwar verbunden mit geringeren metabolischen Raten, jedoch sind die Konzentrationen der längerkettigen Produkte Butyrat, Hexanoat, Butanol und Hexanol höher, was zu einer Bevorzugung längerkettiger Produkte gegenüber kurzkettigen Produkten führt. Dies ist anhand des Anteils des jeweiligen Produkts zu sehen (Abbildung 5.31). Dabei steigen insbesondere der Anteil von Butyrat und Hexanol. Dieser Trend könnte einer geringeren Membranfluidität bei verringerter Temperatur geschuldet sein, die eine verringerte Membranpermeabilität zur Folge hat (Jones und Woods 1986) und damit den Eintritt undissoziierter Säuren über die Zellmembran in die Zelle erschwert, welche innerhalb der Zelle durch Dissoziation negative Effekte auf den Zellmetabolismus hätte. Längerkettige Säuren könnten damit geringere inhibierende Effekte haben. Gleichzeitig wird die Integration längerkettiger Alkohole in die Zellmembran aufgrund ihrer hydrophoben Natur bei verringerter Membranpermeabilität erschwert (Jones und Woods 1986; Sikkema et al. 1995).

Eine Reduzierung der Temperatur zur Erhöhung der Ausbeute an Lösemitteln durch Clostridien über Temperaturniedrigung wurde beschrieben (Carnarius 1940). Die Bildung von Butanol wurde bei der heterotrophen ABE-Fermentation durch Erniedrigung der Temperatur von 30 °C auf 24 °C in der solventogenen Phase erhöht. Dabei wird von einer gesteigerten Toleranz gegenüber Butanol unter diesen Bedingungen gesprochen. Es sind in der Literatur Fermentationsprozesse mit *C. carboxidivorans* beschrieben, die mit Temperaturen außerhalb des Temperaturoptimums für das Wachstum (37 °C) durchgeführt wurden. Autotrophe Kultivierungen in täglich nachbegasteten Kulturröhrchen zeigten bei einer Temperatur von 25 °C höhere Alkoholkonzentrationen mit 1,48 g L⁻¹ Ethanol und 1,07 g L⁻¹ Butanol verbunden mit der Bildung der C6-Produkte Hexanoat und Hexanol gegenüber einer angewandten Temperatur von 37 °C, bei der lediglich 0,07 g L⁻¹ Ethanol gebildet wurden (Ramió-Pujol et al. 2015). Sie führten das Ausbleiben der Alkoholbildung bei 37 °C auf den sogenannten Säurekollaps zurück, der insbesondere dann auftritt, wenn im Satzverfahren zu schnell zu viel Acetat während der exponentiellen Phase gebildet werde. Die bevorzugte Bildung längerkettiger Produkte mit *C. carboxidivorans* mit verringerter Temperatur wurde hingegen noch nicht beschrieben.

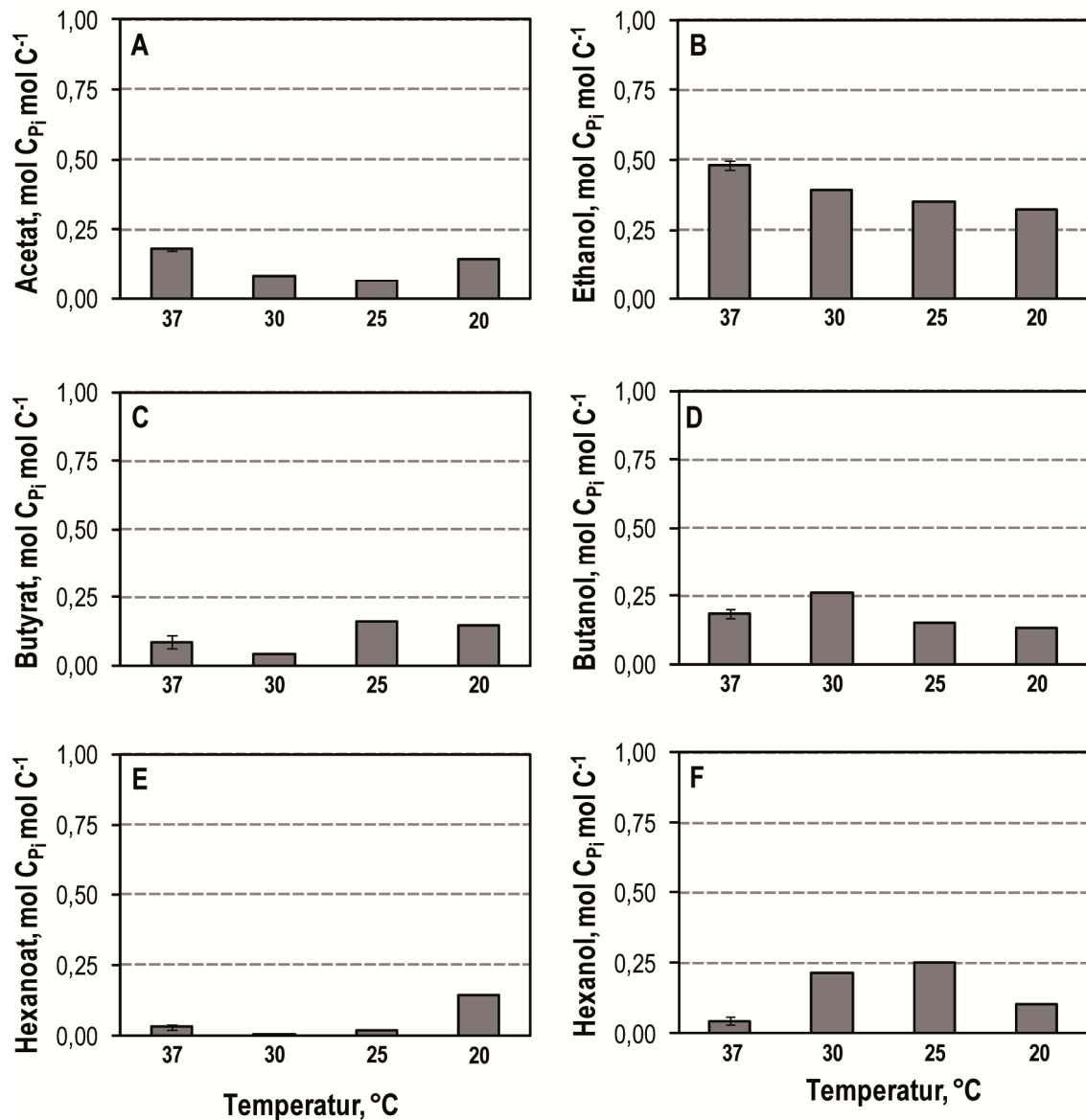


Abbildung 5.31: Produktanteile bei autotrophen Satzprozessen im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Prozesstemperaturen von 37 °C, 30 °C, 25 °C und 20 °C unter pH unkontrollierten Bedingungen. ($\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$).

6 Kontinuierliche Gasfermentation in Rührkesselreaktoren

Satzprozesse sind von geringer Raum-Zeit-Ausbeute gekennzeichnet. Um diese zu erhöhen, ist die Abänderung der Prozessführung zur kontinuierlichen Betriebsweise geeignet. Neben höheren Raum-Zeit-Ausbeuten zeichnet sich eine kontinuierliche Prozessführung durch kontinuierlichen Produktabzug aus. Aufgrund der beobachteten Einteilung eines Satzprozesses im kontrollierten Rührkesselreaktor in zwei Phasen (acidogen, solventogen) erschien jedoch eine schlichte Abänderung der Betriebsführung im kontrollierten Rührkesselreaktor von einem Satzverfahren in die kontinuierliche Betriebsweise nicht als zielführend, da zwar ein hoher pH von pH 6,0 die Biomassebildung und Säurebildung vorantreibt, jedoch ein niedriger pH zur Umsetzung gebildeter Säuren in Alkohole notwendig ist. Beides gleichzeitig lässt sich in kontinuierlicher Betriebsweise bei gleichzeitiger Zufuhr von Zulaufmedium jedoch nicht realisieren. Eine nahezu räumliche Trennung der beiden Phasen war somit angestrebt.

6.1 Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren

Es wurde ein Kaskadenprozess gestaltet. Der erste kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktor in der Kaskade wurde dabei auf pH 6,0 geregelt, um Biomasse zu bilden bei gleichzeitiger Säurebildung. Der zweite Reaktor wurde auf pH 5,0 geregelt, um die Reduktion der im ersten Reaktor gebildeten Säuren in Alkohole zu gewährleisten. Um den Zellen eine möglichst lange Reaktionszeit zur Umwandlung von Säuren in Alkohole im zweiten Rührkesselreaktor zu ermöglichen, wurde die mittlere hydraulische Verweilzeit im zweiten Reaktor erhöht. Während der erste Reaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,0 L betrieben wurde, wurde das Arbeitsvolumen des zweiten Reaktors auf 1,5 L erhöht und damit die mittlere hydraulische Verweilzeit um den Faktor 1,5 erhöht.

Die Prozesstemperatur wurde in beiden Reaktoren weiterhin auf 37 °C eingestellt, um hohe metabolische Raten zu erzielen (siehe Abschnitt 5.6). Der CO-Eingangspartialdruck wurde auf 0,6 bar eingestellt bei einer Gaszusammensetzung von CO:CO₂ = 60:40, da hier hohe Alkohol zu Säure-Verhältnisse erhalten wurden und in diesem Bereich das tatsächliche Optimum für die Wachstumsrate gemäß der CO-Substratüberschussinhibierungskinetik vorliegt (siehe Abschnitt 5.3.2). Die Konzentration der Komplexmedienbestandteile wurde bei 1 g L⁻¹ Hefeextrakt beibehalten, um ausreichend Nährstoffe für das Wachstum bereitzustellen und akzeptable Alkohol-

ausbeuten sicherzustellen (Abschnitt 5.5.1). Die Verdünnungsrate D des ersten Reaktors wurde in Anlehnung an die zellspezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase von Satzprozessen zu $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ gewählt. Dies entspricht $2/3$ der spezifischen Wachstumsrate des Satzprozesses und sollte ein Auswaschen der Zellen im ersten Reaktor vermeiden. Zudem wurde der Prozess mit einer 10-stündigen Satzphase nach Inokulation des ersten Reaktors begonnen, um wachsende Zellen zum Start des kontinuierlichen Prozesses zu haben.

Die Konzentrationsverläufe bei kontinuierlicher Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Dieser kontinuierliche Prozess wurde reproduziert. Bei einer der beiden Kaskadenprozesse trat ein Ausfall der Zufuhr des Zulaufmediums auf, weswegen es in diesem Bereich (3,0 – 3,5 d) zu größeren Standardabweichungen kam.

Gemäß den Beobachtungen aus den Satzprozessen erfolgte sofortiges Anwachsen der Zellen in der Satzphase im ersten Reaktor zu Beginn des Versuchs. Nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten (114 h) lag im ersten Reaktor eine Biotrockenmassekonzentration von $1,55 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ und im zweiten Reaktor eine von $1,82 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ vor. Diese überstiegen die stationäre Biotrockenmassekonzentration in Satzprozessen um den Faktor 3,2 beziehungsweise 3,7. Dabei erhielt der zweite Reaktor kontinuierlich Zellen aus dem ersten Reaktor, weswegen der Anstieg der Biotrockenmassekonzentration im zweiten Reaktor leicht verzögert stattfand. Während des Zellwachstums stieg die Acetatkonzentration im ersten Reaktor bis nach 2,0 d Prozesszeit an und erreichte im Gleichgewicht eine Konzentration von $3,03 \text{ g L}^{-1} \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$. Leicht zeitverzögert stieg auch im zweiten Reaktor die Acetatkonzentration an. Im Gleichgewicht war diese gegenüber dem ersten Reaktor geringer mit einem Wert von $1,70 \pm 0,59 \text{ g L}^{-1}$. Die Ethanolbildung im ersten Reaktor hatte bereits nach 1,0 d eingesetzt und wurde damit nicht mit dem eingestellten pH von pH 6,0 unterbunden. Nach 2,0 d stieg diese kaum noch an, im Gleichgewicht lagen dann $3,29 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ vor. Die Gleichgewichtskonzentration von Ethanol im zweiten Reaktor überstieg die des ersten Reaktors um den Faktor 1,8 und lag bei $6,07 \pm 1,17 \text{ g L}^{-1}$ lag. Die längerkettige Säure Butyrat wurde im Vergleich zum Acetat im ersten Reaktor in nur geringem Maße gebildet ($0,08 \text{ g L}^{-1} \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$), die Bildung von Butyrat fiel im zweiten Reaktor nur geringfügig höher aus. Butanol wurde im ersten Reaktor kaum gebildet, während dessen Bildung im zweiten Reaktor mit einer Gleichgewichtskonzentration von $0,73 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ die des ersten Reaktors um den Faktor 6,1 deutlich überstieg. Die Bildung von Hexanoat und Hexanol wurde im ersten Reaktor nicht beobachtet. Im zweiten Reaktor wurde nahezu kein Hexanoat gebildet, jedoch war eine Gleichgewichtskonzentration von $0,07 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol zu verzeichnen.

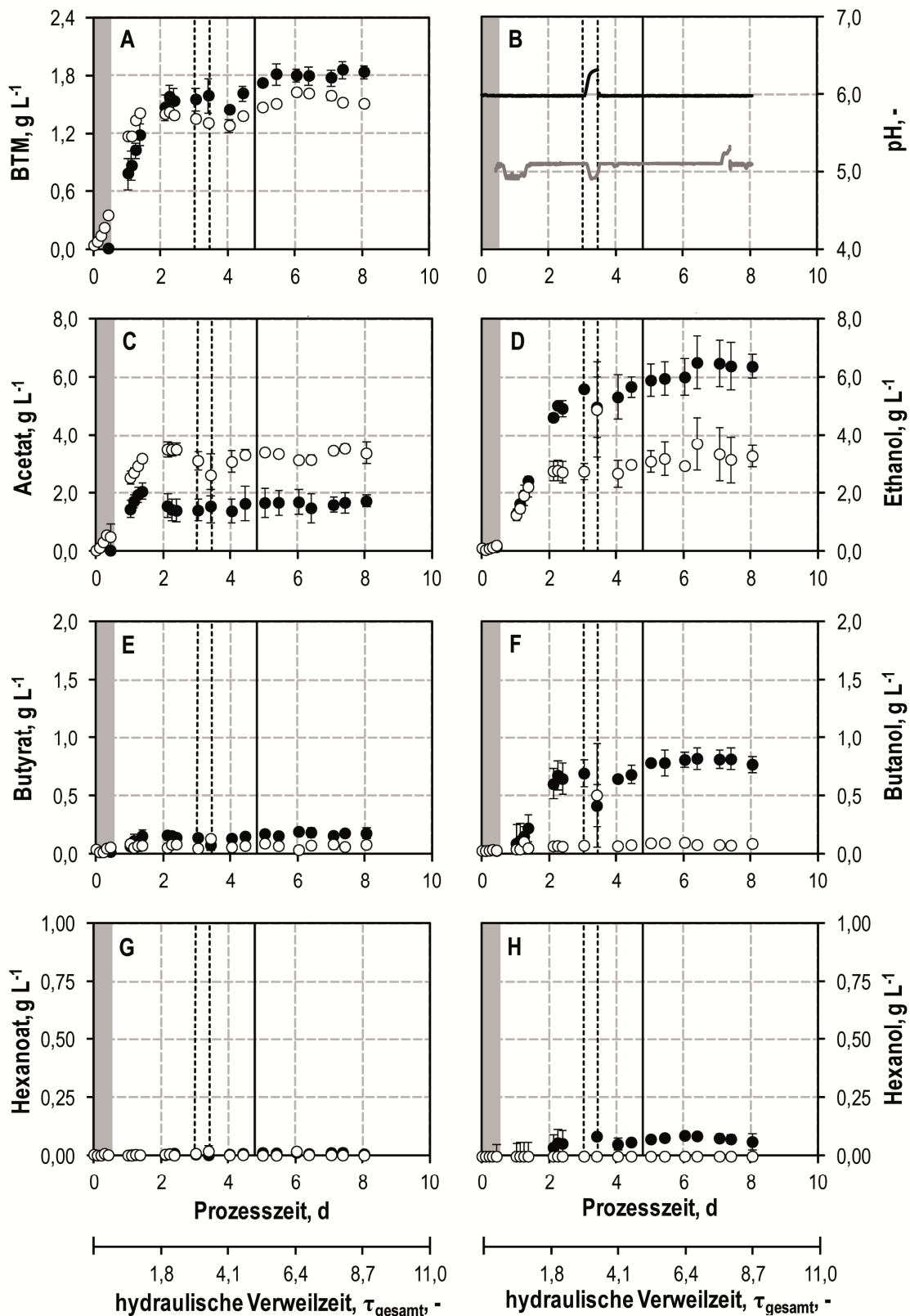


Abbildung 6.1: Kontinuierliche Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L (weiß, grau); zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L (schwarz). Standardabweichungen von zwei Experimenten. Der graue Bereich zeigt die Satzphase vor Beginn des kontinuierlichen Prozesses. Die gestrichelten, vertikalen Linien markieren den Ausfall des Zulauf-

mediums in einer der beiden Experimente. Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das Gesamtsystem (τ_{gesamt}). (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$, $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$).

Der Ausfall der Zufuhr des Zulaufmediums zwischen einer Prozesszeit von 3,0 d – 3,5 d führte im ersten Reaktor zunächst zu einer Verringerung des Arbeitsvolumens, bevor die Regelung zur Volumenkonstanz vom ersten Reaktor nach einiger Zeit den Transfer von Fermentationsbrühe in den zweiten Reaktor einstellte. Dadurch entstanden in diesem Zeitraum zwei Satzprozesse, da die Förderung von Fermentationsbrühe vom ersten Reaktor in den zweiten Reaktor aufgrund der Gewichtskonstanzregelung mit der Zeit automatisch zum Erliegen kam.

Während dieses Zeitraums kam es zum Abfall der Acetatkonzentration bei Erhöhung der Ethanolkonzentration im ersten Reaktor. Auch die Butanolkonzentration im ersten Reaktor wies einen deutlichen Sprung nach oben auf. Entsprechend waren die Konzentrationen für Ethanol und Butanol im zweiten Reaktor während dieses Zeitraums geringer, da zunächst geringere Mengen dieser Produkte vom ersten Reaktor in den zweiten Reaktor eingetragen wurden bis der Zulauf schließlich versiegte. Das notwendige Auffüllen des ersten Reaktors auf das ursprüngliche Arbeitsvolumen zum Weiterbetreiben des kontinuierlichen Prozesses und dem damit verbundenen Verdünnungseffekt für Biomasse und Produkte hatte sich bis zum nächsten Probenahmezeitpunkt bereits wieder nivelliert.

Bei einem der beiden Kaskadenprozesse konnte eine Abgasanalytik verwendet werden, die die Partialdrücke aufzeichnete und die Bestimmung von Gasaufnahmeleistungen ermöglichte (Abbildung 6.2). Der CO-Partialdruck sank in beiden Reaktoren während der kontinuierlichen Phase auf etwa 350 mbar ab, während der CO_2 -Partialdruck auf 650 mbar anstieg, womit wiederum CO aufgenommen wurde, während CO_2 gebildet wurde. Die Werte der Gasaufnahmeleistungen für CO (circa $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und die Bildungsleistungen für CO_2 (circa $40 - 50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) überstiegen dabei die eines Satzprozesses mit gleichem CO-Eingangspartialdruck von 600 mbar um ein Vielfaches (vergleiche CO: $21 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; CO_2 : $14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, siehe Abschnitt 5.3.2). Die Erhöhung der Raten entsprach dabei in etwa der Erhöhung der Biotrockenmassenkonzentration. Während des Ausfalls der Zulaufmedienzufuhr fielen die Gasaufnahmeleistungen ab, mit Einstellen dieser Zufuhr erholte sich die Gasaufnahme jedoch wieder auf die Werte vor der Unterbrechung der Medienzufuhr. Der CO-Umsatz lag beim ersten

Reaktor bei 48,7 %, in zweiten Reaktor nur noch bei 27,2 %, weswegen nur geringe Kohlenstoffanteile in die Produktbildung gehen.

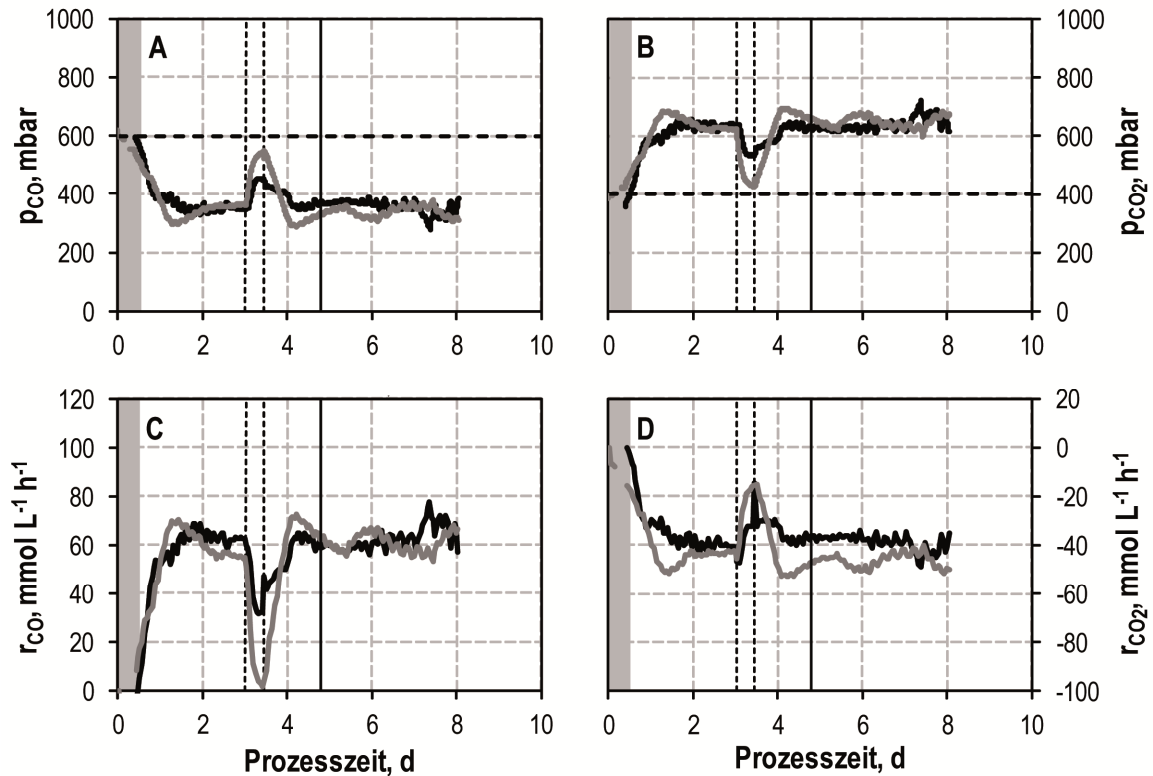


Abbildung 6.2: Partialdrücke (p_{CO} und p_{CO_2}) sowie volumetrische Gasaufnahmeleistungen (r_{CO} und r_{CO_2}) der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L (grau); zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L (schwarz). Der graue Bereich zeigt die Satzphase vor Beginn des kontinuierlichen Prozesses. Die gestrichelten, vertikalen Linien markieren den Ausfall des Zulaufmediums in einer der beiden Experimente. Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das Gesamtsystem (τ_{gesamt}). (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$, $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$).

Diskussion

Durch kontinuierliche Medienzufuhr sowie pH-Regelung auf pH 6,0 im ersten Rührkesselreaktor wurden deutlich höhere Biomassekonzentrationen verglichen mit Satzprozessen erzielt. Mit der Erhöhung der Biomassekonzentration wurden auch deutlich höhere Gasaufnahmeleistungen im kontinuierlichen Verfahren beobachtet.

Im ersten Reaktor findet Biomassebildung statt, gleichzeitig ist diese verknüpft mit einer ausgeprägten Acetatbildung. Ethanol wird auch schon während der Acetatbildung im

ersten Reaktor gebildet, was somit eine strikte räumliche Trennung von Säurebildung und Umsetzung zu Alkohol nicht zulässt, wohl aber stellt der zweite Reaktor günstige Bedingungen für die Alkoholbildung bereit, da die Konzentrationen aller drei Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol im Gleichgewicht gegenüber denen im ersten Reaktor erhöht werden können.

Dies zeigt sich ebenfalls anhand der volumetrischen Produktbildungsraten, die den Raum-Zeit-Ausbeuten entsprechen (siehe Tabelle 6.1). Während im ersten Reaktor mit $8,73 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Acetat gebildet wird, wies dessen Produktbildungsrate im zweiten Reaktor mit $-2,56 \pm 1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ einen negativen Wert auf und bedeutet einen Verbrauch an Acetat. Bereits im ersten Reaktor wird Ethanol gebildet. Durch die Wahl günstiger Alkoholbildungsbedingungen im zweiten Reaktor wird diese dort weitergeführt. Dabei ist die Raum-Zeit-Ausbeute für Ethanol mit $5,33 \pm 1,98 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gegenüber dem ersten Reaktor geringer ($9,49 \pm 0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Butyrat wird in beiden Reaktoren in geringem Maße gebildet, was zu geringeren Produktbildungsraten führt. Entsprechend der höheren Gleichgewichtskonzentration von Butanol im zweiten Reaktor ist auch seine Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem ersten Reaktor deutlich höher ($1,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Vergleich zu $0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Während im ersten Reaktor keine C6-Produkte gebildet werden, liegen für den zweiten Reaktor volumetrische Produktbildungsraten von $0,01 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Hexanoat und $0,14 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Hexanol vor. Wird die Rate zur Biomassebildung im Gleichgewicht betrachtet, so ist diese für den ersten Reaktor um den Faktor 8,6 höher.

Tabelle 6.1: Gleichgewichtskonzentrationen (c_{SS}) im stationären Betriebspunkt und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Standardabweichungen von zwei Experimenten. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L; zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L. (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$; $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$).

	erster Reaktor (pH 6,0)		zweiter Reaktor (pH 5,0)		Kaskade
	$c_{SS}, \text{ g L}^{-1}$	RZA, $\text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$c_{SS}, \text{ g L}^{-1}$	RZA, $\text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	RZA, $\text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Acetat	$3,03 \pm 0,06$	$8,73 \pm 0,17$	$1,70 \pm 0,59$	$-2,56 \pm 1,02$	$1,95 \pm 0,68$
Ethanol	$3,29 \pm 0,14$	$9,49 \pm 0,40$	$6,07 \pm 1,17$	$5,33 \pm 1,98$	$7,00 \pm 1,35$
Butyrat	$0,08 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,11$	$0,16 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,05$
Butanol	$0,12 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,20$	$0,73 \pm 0,14$	$1,16 \pm 0,41$	$0,84 \pm 0,16$
Hexanoat	-	-	$0,01 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$
Hexanol	-	-	$0,07 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,04$
BTM	$1,55 \pm 0,12$	$4,46 \pm 0,33$	$1,82 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,34$	$2,10 \pm 0,15$

Für eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge in den einzelnen Reaktoren wird auf Abbildung 6.3 verwiesen. Diese stellt die über die Zeit hinweg akkumulierten Biotrockenmasse- und Produktmengen in den einzelnen Reaktoren dar. Es ist ersichtlich, dass der erste Reaktor bei pH 6,0 hauptsächlich zur Bildung von Biomasse verantwortlich ist, während der zweite Reaktor nur eine geringfügige, eigenständige Biomassebildung vorweist. Demzufolge wird der größte Anteil der im zweiten Reaktor befindlichen Biomasse über den kontinuierlichen Eintrag aus dem ersten Reaktor bereitgestellt. Acetat wird in hohem Maße im ersten Reaktor gebildet. Gleichzeitig setzt hier auch bereits die Ethanolbildung ein, eine Beobachtung, die analog zu Satzprozessen mit pH unkontrollierten Bedingungen bereits gemacht wurde. Ethanol erreicht nahezu dieselben Mengen wie Acetat. Im zweiten Reaktor wird durch den niedrigen pH von pH 5,0 die Bildung von Ethanol gefördert. Dieses wird hauptsächlich durch die Reduktion wiederaufgenommenen Acetats gebildet, was an dem Nettoverbrauch dieser Säure erkenntlich ist. Jedoch zeigt der zusätzlich eingetragene Verlauf der theoretisch umsetzbaren Menge aus Acetat zu Ethanol eine hinzukommende *de novo* Synthese von Ethanol, da die tatsächlich akkumulierte Menge an Ethanol die theoretisch mögliche Menge aus Acetat übersteigt (Abbildung 6.3 D). In einer kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade konnte somit der Anteil an Restacetat zugunsten erhöhter Ethanolkonzentration gegenüber einem einzelnen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor gesenkt werden.

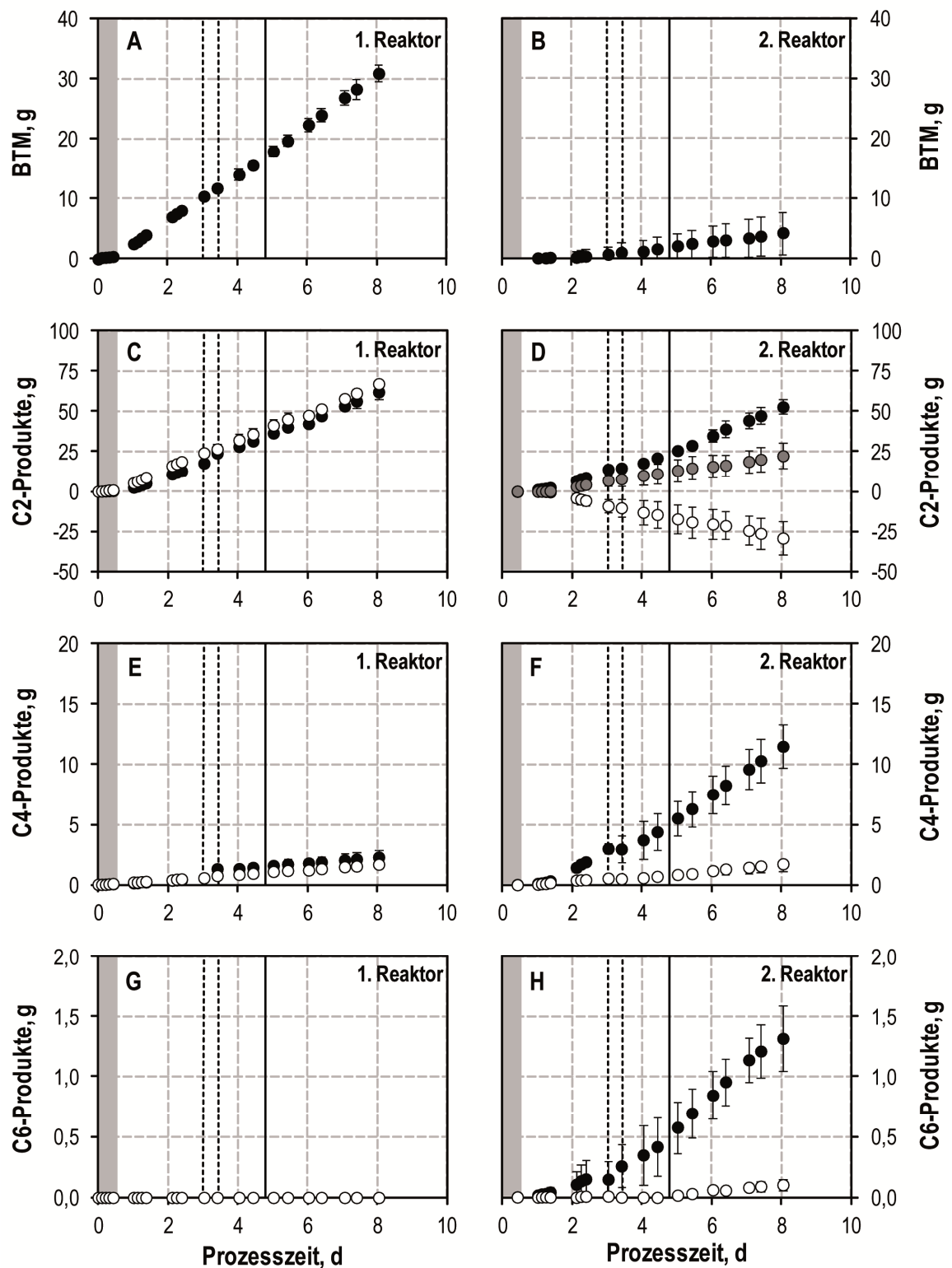


Abbildung 6.3: Kumulative Mengen der Produkte der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L; zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L. Standardabweichungen resultieren aus zwei durchgeführten Kaskadenprozessen. Die Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol sind in schwarz, die Säuren Acetat, Butyrat und Hexanoat sind in weiß dargestellt. Der graue Bereich zeigt die Satzphase vor Beginn des kontinuierlichen Prozesses. Die theoretisch mögliche, gebildete Menge von Ethanol aus Acetat im

zweiten Reaktor ist mit grauen Symbolen dargestellt. Die gestrichelten, vertikalen Linien markieren den Ausfall des Zulaufmediums in einer der beiden Experimente. Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das Gesamtsystem (τ_{gesamt}). (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$; $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$).

Im ersten Reaktor wird neben der Butyrat- auch bereits eine gleich hohe Butanolbildung beobachtet. Diese C4-Produktbildung im ersten Reaktor ist gegenüber der C2-Körperbildung deutlich herabgesetzt, was sich sowohl an den Produktkonzentrationen, als auch an den kumulierten Mengen ableiten lässt; die C6-Produkte Hexanoat und Hexanol werden unter diesen Prozessbedingungen nicht gebildet. Ergebnisse aus Satzprozessen (siehe Abschnitt 5.4) unter pH Kontrolle auf pH 6,0 ließen dies bereits vermuten. Diese in kontinuierlicher Betriebsweise gemachte Beobachtung ist damit mit den Erkenntnissen aus den Satzprozessen konsistent. Mit einer pH-Kontrolle auf pH 6,0 sind im ersten Reaktor die C2-Produkte Acetat und Ethanol die Hauptstoffwechselprodukte.

Im zweiten Reaktor bei pH 5,0 sind die Konzentrationen sowie die akkumulierten Mengen der längerkettigen Säuren Butyrat und Hexanoat ebenfalls im Vergleich zur C2-Säure deutlich geringer. Dabei ist anzumerken, dass im Gegensatz zum Acetat die beiden Säuren Butyrat und Hexanoat im zweiten Reaktor nicht netto abgebaut werden, sondern in geringem Ausmaß gebildet werden, was anhand der positiven volumetrischen Produktbildungsraten (Raum-Zeit-Ausbeuten) abgeleitet werden kann.

Die entsprechenden Konzentrationen beziehungsweise akkumulierten Mengen der korrespondierenden Alkohole Butanol und Hexanol im zweiten Reaktor sind gegenüber den Säuren deutlich höher. Ein Vergleich der Gleichgewichtskonzentrationen von Butyrat und Butanol sowie Hexanoat und Hexanol im zweiten Reaktor legt die hauptsächliche Bildung dieser Alkohole über die Coenzym A Intermediate Butyryl-CoA und Hexanoyl-CoA direkt zu den Aldehyden Butyraldehyd und Hexaldehyd und der anschließenden Reduktion zu Butanol beziehungsweise Hexanol nahe (*de novo* Bildung). Die Wiederaufnahme von Butyrat und Hexanoat aus dem Fermentationsmedium spielt somit gegenüber der direkten Bildung der längerkettigen Alkohole im zweiten Reaktor eine untergeordnete Rolle.

Diese genaue Betrachtung der Vorgänge mit Biomassebildung und Acetatbildung im ersten Reaktor und Alkoholbildung im zweiten Reaktor bei Stagnation des Wachstums lassen die Bezeichnung als acidogenen Reaktor und solventogenen Reaktor bei

Kontrolle auf unterschiedliche pH-Werte zu und bestätigen prinzipiell eine räumliche Trennung der Säurebildung von der Lösemittelbildung, auch wenn die Ethanol- und Butanolbildung schon bereits im ersten Reaktor einsetzt. Der pH erweist sich somit als geeignet, um die Produktverteilung hin zur Alkoholbildung zu erreichen. Die dabei erzielten Produktkonzentrationen der Alkohole übersteigen dabei die in Satzprozessen erhaltenen Alkoholkonzentrationen und machen die kontinuierliche Prozessführung in kaskadierten Rührkesselreaktoren zu einem geeigneten Mittel für die kontinuierliche Alkoholbildung bei erhöhten Konzentrationen.

Gegenüber einem kontinuierlichen Prozess bestehend aus einem einzelnen Rührkesselreaktor können die Alkohol zu Säure-Verhältnisse mit einer Rührkesselkaskade aus zwei Reaktoren mit unterschiedlich eingestelltem pH nochmals gesteigert werden. Während das Verhältnis von Ethanol zu Acetat im ersten Reaktor bei $1,1 \text{ g g}^{-1}$ liegt, ist dieser Wert für den zweiten Reaktor auf $3,6 \text{ g g}^{-1}$ angestiegen. Das Butanol zu Butyrat-Verhältnis ist von $1,5 \text{ g g}^{-1}$ auf $4,6 \text{ g g}^{-1}$ gestiegen. Das Hexanol zu Hexanoat-Verhältnis liegt bei $7,0 \text{ g g}^{-1}$. Das Verhältnis des gebildeten Gesamtalkohols (Ethanol, Butanol, Hexanol) zu Restsäure (Acetat, Butyrat, Hexanoat) gemessen an der Molmenge an gebundenem Kohlenstoff in den Produkten wird mithilfe der Kaskadierung von $1,29 \text{ mol } C_{\text{Alkohol}} \text{ mol } C_{\text{Säure}}^{-1}$ im ersten Reaktor auf $5,18 \text{ mol } C_{\text{Alkohol}} \text{ mol } C_{\text{Säure}}^{-1}$ im zweiten Reaktor im Gleichgewicht erhöht. Während im ersten Reaktor noch 44 % des in Stoffwechselprodukten fixierten Kohlenstoffs in die Säurebildung gehen, wird im zweiten Reaktor dieser Restsäuregehalt auf 16 % gesenkt, sodass 84 % des in Produkten fixierten Kohlenstoffs in der Alkoholbildung fixiert sind. Die Kohlenstoffbilanz des Gesamtprozesses lässt sich dabei zu 85,2 % schließen. Fehlender Kohlenstoff lässt sich über Verluste durch Verdunstung erklären.

Die bisher in der Literatur berichteten höchsten Alkoholkonzentrationen für *C. carboxidivorans* liegen bei $5,55 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $2,66 \text{ g L}^{-1}$ Butanol und wurden in einem satzbetriebenen Rührkesselreaktor bei pH 5,75 nach 10 Tagen erreicht (Fernández-Naveira et al. 2016b). Die hier betriebene Kaskade aus zwei Rührkesselreaktoren zeigt eine Erhöhung der Ethanolkonzentration um 9 % ($6,07 \text{ g L}^{-1}$) im Gleichgewicht, die Butanolkonzentration ist jedoch mit einer Gleichgewichtskonzentration von $0,73 \text{ g L}^{-1}$ um 73 % geringer. Die im Kaskadenprozess erzielten biomassespezifischen Produktivitäten für Ethanol mit $6,13 \text{ g g d}^{-1}$ im ersten Reaktor übersteigt die in dem Satzprozess von Fernández-Naveira et al. (2016b) angegebenen spezifischen Bildungsraten für Ethanol um 112 % ($2,88 \text{ g g d}^{-1}$), während diese für den zweiten Reaktor ähnlich sind. Hingegen ist die biomassespezifische Produktivität für Butanol des Kaskadenprozesses um 84 % (erster Reaktor) beziehungsweise um 55 %

geringer. Ein weiterer, im kontinuierlich begaster Rührkesselreaktorprozess im Satzverfahren bei pH 4,75 ist beschrieben (Fernández-Naveira et al. 2017a). Mit angegebenen zellspezifischen Produktivitäten von $1,15 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Ethanol, $0,89 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butanol und $0,62 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Hexanol übersteigen die hier im Gesamtkaskadenprozess erzielte spezifische Produktivität von Ethanol die von Fernández-Naveira et al. (2017a).

Kontinuierliche Synthesegasprozesse mit *C. carboxidivorans* wurden bisher in Blasensäulenreaktoren durchgeführt (Datar et al. 2004; Rajagopalan et al. 2002). Verglichen mit diesen in der Literatur beschriebenen kontinuierlichen Synthesegasprozessen wird die Gleichgewichtskonzentration von Ethanol um 282 % (vergleiche $1,6 \text{ g L}^{-1}$) gesteigert; die des Butanol um 82 % beziehungsweise um 22 % (vergleiche $0,4 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $0,6 \text{ g L}^{-1}$). Vergleichen mit diesen kontinuierlichen Prozessen in Blasensäulenreaktoren sind auch die Raum-Zeit-Ausbeuten um ein Vielfaches gesteigert (vergleiche circa $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Ethanol beziehungsweise $0,2 - 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butanol).

Tabelle 6.2: Biomassespezifische Produktivitäten RZA_{BTM} der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Standardabweichungen von zwei Experimenten. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L; zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L. (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$; $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$.)

	erster Reaktor (pH 6,0)	zweiter Reaktor, (pH 5,0)
	$RZA_{\text{BTM}}, \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$RZA_{\text{BTM}}, \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Acetat	$5,65 \pm 0,53$	$-1,43 \pm 0,66$
Ethanol	$6,13 \pm 0,20$	$2,97 \pm 1,30$
Butyrat	$0,14 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,01$
Butanol	$0,23 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,27$
Hexanoat	-	$0,01 \pm 0,01$
Hexanol	-	$0,08 \pm 0,04$

Die hier gemessene Gesamtalkoholkonzentration im Gleichgewicht von $6,87 \text{ g L}^{-1}$ übersteigt die Alkoholbildung einer erst kürzlich erschienenen Publikation mit *C. carboxidivorans* in einem zweistufigen Synthesegasfermentationsprozess mit Zellrückhaltung bei unterschiedlichem pH (pH 6,0; pH 5,0) mit Zellrückhaltung um den Faktor 4,6 (Abubackar et al. 2018). Auch sämtliche hier gemessenen Alkohol zu Säure-Verhältnisse ($3,6 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{Acetat}}^{-1}$; $4,6 \text{ g}_{\text{BuOH}} \text{ g}_{\text{Butyrat}}^{-1}$) sind dem von Abubackar et al. (2018)

berichteten maximalen Alkohol zu Säure-Verhältnis von 0,32 überlegen. Die hier für die Rührkesselkaskade gewählten Prozessbedingungen (zum Beispiel Gaszusammensetzung, Verdünnungsrate, unterschiedliches Arbeitsvolumen für längere hydraulische Verweilzeiten im zweiten Reaktor gegenüber dem ersten Reaktor) begünstigen die Alkoholbildung, da die Gesamtalkoholkonzentration bei einer etwa 3,5 fachen erhöhten Biotrockenmassekonzentrationen im System verglichen mit Ergebnissen von Abuackar et al. (2018) um mehr als das 3,5-fache erhöht ist (4,6-fache).

Die Raum-Zeit-Ausbeuten des Gesamtprozesses verdeutlichen, dass Ethanol mit einer Bildung von $7,00 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ das Hauptprodukt des Kaskadierungsprozesses ist. Für Acetat liegt unter Berücksichtigung seines Abbaus in Reaktor 2 eine Raum-Zeit-Ausbeute von $1,95 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ vor. Die Raum-Zeit-Ausbeuten für die C4-Produkte sind gegenüber den C2-Produkten mit $0,84 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butanol und $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butyrat geringer, zeigen aber eine bevorzugte Bildung des Alkohols gegenüber der Säure. Die Raum-Zeit-Ausbeute des Hexanol liegt bei $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Da bei den von Abubackar et al. (2018) veröffentlichten Ergebnisse einer zweistufigen Kaskade kein Gleichgewichtszustand erreicht wird, ist die Angabe von Raum-Zeit-Ausbeuten schwierig. Unter der Verwendung der Endkonzentrationen bei einer Verdünnungsrate des Gesamtprozesses von $0,018 \text{ h}^{-1}$ lässt sich eine Raum-Zeit-Ausbeute des Gesamtprozesses von $0,76 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Acetat und $0,93 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Ethanol grob abschätzen, welche weit unter den in dieser Arbeit bestimmten Raum-Zeit-Ausbeuten liegen (Faktor 7,5 für Ethanol bzw. Faktor 2,6 für Acetat). Die in dieser Arbeit erzielte Raum-Zeit-Ausbeute des Gesamtprozesses für Butanol liegt 95 % über der abgeschätzten Raum-Zeit-Ausbeute der Literaturquelle, wobei der entsprechende Wert für Butyrat nur 23 % entspricht.

Gaddy und Clausen (1992) setzen zwei hintereinander geschaltete Rührkesselreaktoren mit *C. ljungdahlii* ein. Dabei wandten sie im ersten Reaktor pH 5,0 an und im zweiten Reaktor pH 4,0 – 4,5 an. Sie erreichten damit knapp 3 g L^{-1} Ethanol im zweiten Reaktor. Durch zusätzliche Zufuhr unverbrauchten Gases aus dem zweiten Reaktor in den ersten Reaktor, einer zellrückhaltenden Einheit nach dem zweiten Reaktor in den zweiten Reaktor zurück sowie einer zusätzlichen Frischmediumzufuhr mit limitierter Pantothenatkonzentration für den zweiten Reaktor konnte im Gleichgewicht mit dem Stamm *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) eine Ethanolkonzentration von $25 - 30 \text{ g L}^{-1}$ bei einer verbleibenden Restacetatkonzentration von etwa 3 g L^{-1} erzielt werden (Gaddy et al. 2012). Die Raum-Zeit-Ausbeute für Ethanol lag dabei bei $31,6 - 37,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

6.2 Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren mit erhöhter hydraulischer Verweilzeit

Um die Alkoholbildung im zweiten Reaktor gegenüber dem ersten Reaktor nochmals zu steigern und die Restsäurekonzentrationen im Gleichgewicht zu minimieren, wurden die mittleren hydraulischen Verweilzeiten (Verweilzeiten) erhöht. Hierzu wurde die Verdünnungsrate im ersten Reaktor von $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ auf $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ gesenkt. Dadurch ergab sich für den zweiten Reaktor eine Verdünnungsrate von $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$ bei ansonsten gleich bleibenden Bedingungen. Die Verweilzeit wurden dadurch erhöht und betrug 1,7 d für den Gesamtprozess.

In Abbildung 6.4 sind die Verläufe einer kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit verringerten Verdünnungsraten von $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$ dargestellt. Im ersten Reaktor begann das Zellwachstum direkt nach Prozessbeginn. Nach 0,6 Verweilzeiten des Gesamtprozesses lag eine Biotrockenmassekonzentration von $1,86 \text{ g L}^{-1}$ vor, was einer Steigerung um den Faktor 1,2 im Vergleich zum Kaskadenprozess mit einer Verdünnungsrate von $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ zur gleichen Prozesszeit entsprach. Diese hohe Biotrockenmassekonzentration konnte jedoch nicht konstant aufrecht erhalten werden, sodass sie nach 2,3 Verweilzeiten auf eine Biotrockenmassekonzentration von $1,06 \text{ g L}^{-1}$ abfiel und im weiteren Verlauf einen oszillierenden Verlauf aufwies, der auch nach 5 Verweilzeiten zu beobachten war, jedoch in geringerem Maße ($1,54 \text{ g L}^{-1} - 1,66 \text{ g L}^{-1}$). Die Acetatbildung setzte im ersten Reaktor ebenfalls sofort mit Prozessbeginn ein. Nach 3,8 Verweilzeiten erreichte sie eine Konzentration von $5,86 \text{ g L}^{-1}$. Im weiteren Verlauf befand sich diese in einem Bereich zwischen auf $4,86 \text{ g L}^{-1}$ und $5,89 \text{ g L}^{-1}$. Für Ethanol ist ein ebenso schwankendes Verhalten im ersten Reaktor zu beobachten. Nach Erreichen von 5 Verweilzeiten lagen zwischen $2,62 \text{ g L}^{-1}$ und $4,28 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol vor. Für Butyrat und Butanol sind im ersten Reaktor steigende Trends statt oszillierende Verläufe zu beobachten. Zu Prozessende lagen $0,45 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat und $0,47 \text{ g L}^{-1}$ Butanol vor. Es wurden geringe Mengen an Hexanoat im ersten Reaktor gebildet. Die Konzentrationen wurden jeweils zu unter $0,05 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Neben einer Hexanoatbildung im ersten Reaktor wurde ebenfalls Hexanolbildung von maximal $0,07 \text{ g L}^{-1}$ beobachtet.

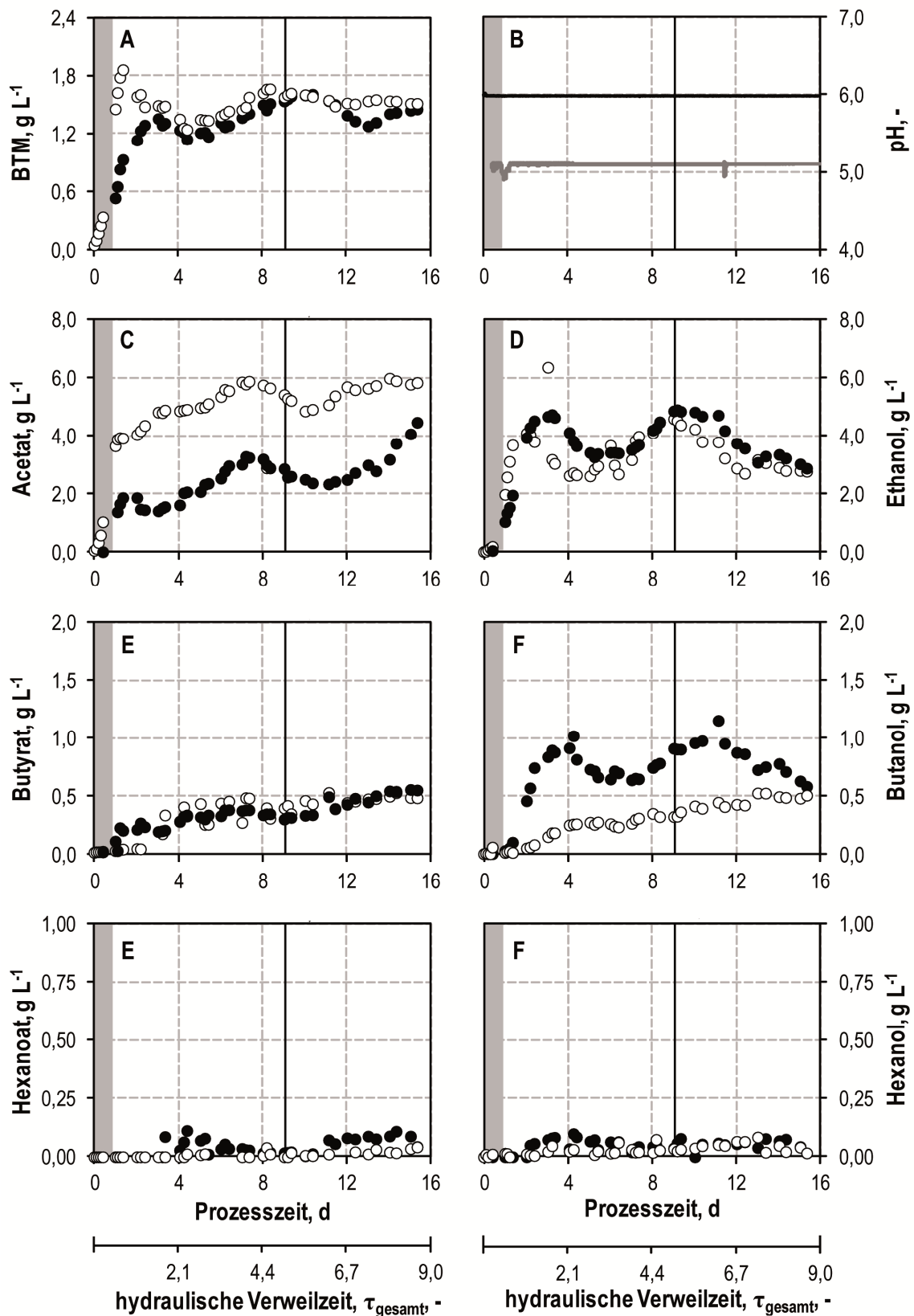


Abbildung 6.4: Kontinuierliche Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $D_2 = 0,04 \text{ h}^{-1}$. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L (weiß, grau); zweiter Reaktor: pH 5,0; 1,5 L (schwarz). Der graue Bereich zeigt die Satzphase vor Beginn des kontinuierlichen Prozesses. Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das

Gesamtsystem (τ_{gesamt}). (Für beide Reaktoren gleich: CO:CO₂ = 60:40, $n = 1200$ rpm; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01$ bar).

Im zweiten Reaktor stieg wie erwartet zeitversetzt die Biotrockenmassekonzentration an. Nach 1,5 Verweilzeiten lag eine Biotrockenmassekonzentration von $1,35 \text{ g L}^{-1}$ und wies anschließend ebenfalls einen oszillierenden Verlauf auf, der nach Ablauf von 5 Verweilzeiten keinen Zustand eines Fließgleichgewichts aufwies ($1,27 \text{ g L}^{-1} - 1,60 \text{ g L}^{-1}$). Die Konzentration von Acetat im zweiten Reaktor stieg auf $1,88 \text{ g L}^{-1}$ an, fiel anschließend leicht ab und stieg über einen längeren Zeitraum auf $3,29 \text{ g L}^{-1}$ ($3,9 \tau_{\text{gesamt}}$) an, wobei sich nach 5 Verweilzeiten keine konstante Konzentration einstellte. Dieses oszillierende Verhalten trat für den Verlauf von Ethanol im zweiten Reaktor ebenso auf ($2,79 \text{ g L}^{-1} - 4,91 \text{ g L}^{-1}$). Analog zum ersten Reaktor stieg die Konzentration von Butyrat im zweiten Reaktor stetig an bis auf $0,52 \text{ g L}^{-1}$. Entgegen des Verlaufs einer stets steigenden Butanolkonzentration im ersten Reaktor waren im zweiten Reaktor analog zu Ethanol Phasen, in denen die Konzentration anstieg, gefolgt von Phasen mit fallender Konzentration zu sehen. Hexanoat wurde im zweiten Reaktor bis zu einer Konzentration von $0,10 \text{ g L}^{-1}$ gebildet. Geringe Hexanolkonzentrationen waren für den zweiten Reaktor zu verzeichnen. Die Maximalwerte betragen dabei nicht mehr als $0,07 \text{ g L}^{-1}$.

Die Abgasdaten der durchgeführten Kaskade wurden online aufgezeichnet und sind in Abbildung 6.5 aufgetragen. Im ersten Reaktor sank der Partialdruck für CO bis nach 0,3 Verweilzeiten auf 319 mbar ab. Entsprechend dazu stieg der Partialdruck für CO₂ im zweiten Reaktor auf einen Wert von 681 mbar an. Im weiteren Verlauf konnten diese Ausgangspartialdrücke für CO und CO₂ nicht konstant aufrecht erhalten werden. Der Partialdruck für CO stieg an, der Partialdruck für CO₂ fiel ab und wiesen anschließend bis zum Prozessende leicht schwankendes Verhalten auf, erreichten jedoch nicht mehr die zuvor erzielten minimalen beziehungsweise maximalen Partialdruckwerte.

Die Verläufe der Partialdrücke von CO und CO₂ für den ersten Reaktor spiegelten sich in den volumetrischen Gasaufnahmeleistungen wider. Nach einer Prozesszeit von 1,0 d wies die volumetrische Gasaufnahmeleistung für CO einen maximalen Wert von $76 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf, die entsprechende volumetrische CO₂-Bildungsrate für CO₂ betrug $46 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Im Anschluss daran fiel die volumetrische CO-Gasaufnahmeleistung stark ab und pendelte sich auf niedrigerem Wert ein. Auch die CO₂-Bildungsrate nahm stark ab.

Für den zweiten Reaktor fiel der CO-Partialdruck nach Prozessbeginn ebenfalls ab, jedoch bei weitem nicht so tief (487 mbar) wie im ersten Reaktor, stieg dann wieder an, und wies bis zu Prozessende einen CO-Ausgangspartialdruck nahe des CO-

Eingangspartialdruckes (600 mbar) auf. Gespiegelt, qualitatives Bild war für den CO_2 -Partialdruck zu sehen.

Dementsprechend fielen auch die volumetrische CO-Gasaufnahmerate und die volumetrische CO_2 -Bildungsrate (negative CO_2 -Gasaufnahmerate) für den zweiten Reaktor geringer aus. Ihre maximalen Werte wiesen sie mit $34 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ CO und $21 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ CO_2 nach 0,8 Verweilzeiten auf. Nach Durchschreiten von minimalen Werten nahmen diese wieder leicht zu und fielen bis Prozessende über einen langen Zeitraum wiederum nahezu auf null ab.

Der Prozess der Rührkesselkaskade mit verringerter Durchflussrate ($D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$, $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$) wurde mehrmals durchgeführt, ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Tendenziell waren aber auch hier überschwingende Verläufe zu beobachten.

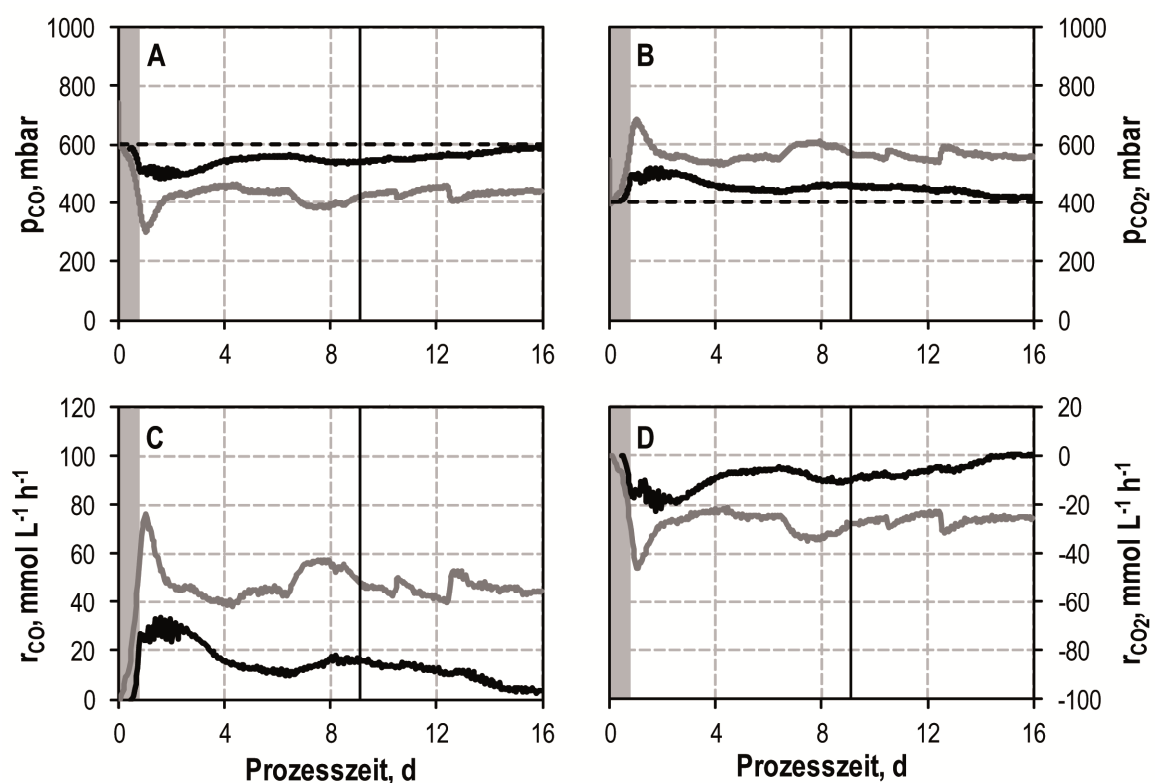


Abbildung 6.5: Partialdrücke (p_{CO} und p_{CO_2}) sowie volumetrische Gasaufnahmeraten (r_{CO} und r_{CO_2}) der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$. Erster Reaktor: pH 6,0; 1,0 L (grau); zweiter Reaktor: pH 5, 1,5 L (schwarz). Der graue Bereich zeigt die Satzphase vor Beginn des kontinuierlichen Prozesses. Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das Gesamtsystem (τ_{gesamt}). (Für beide Reaktoren gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$; $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$).

Diskussion

Nachdem sich der Rührkesselkaskadenprozess mit räumlicher Trennung von acidogener und solventogener Phase als geeignetes Instrument zur Alkoholbildung erwies, wurden in einem weiteren Ansatz die Verdünnungsraten reduziert ($D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$, $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$), um über Verweilzeiterhöhung die Gleichgewichtskonzentrationen der gebildeten Alkohole nochmals zu steigern. Dabei wurden teils oszillierende Verläufe von BTM und einer Vielzahl von Produkten beobachtet, weswegen sich kein stabiler Gleichgewichtszustand einstellt. Es können keine festen Gleichgewichtskonzentrationen angegeben werden und daher wurden mittlere Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen nach Ablauf von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für einen 99,9 %-igen Austausch des Reaktorvolumens als Basis zum Vergleich mit dem Prozess mit höherer Verdünnungsrate ($D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$) bestimmt.

Zunächst steigt die Biotrockenmassekonzentration in Reaktor 1 auf einen im Vergleich zum Referenzkaskadenprozess (bei höherer Verdünnungsrate von $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$) höheren Wert an, pendelt sich durch oszillierendes Verhalten bei einer mittleren Biotrockenmassekonzentration von $1,49 \text{ g L}^{-1}$ ein und ist damit vergleichbar mit dem des Referenzkaskadenprozesses. Analog weist der Verlauf von Acetat im ersten Reaktor oszillierendes Verhalten bei einer mittleren Acetatkonzentration von $5,37 \text{ g L}^{-1}$ auf, einem Wert der um den Faktor 1,7 gegenüber der Gleichgewichtskonzentration für Acetat in der Referenzkaskade höher ist. Die mittlere Ethanolkonzentration im ersten Reaktor ist nahezu identisch mit der Referenzkaskade ($3,36 \text{ g L}^{-1}$). Die mittlere Butyratkonzentration ist gegenüber der Referenzkaskade um den Faktor 5,3 ($0,43 \text{ g L}^{-1}$) erheblich gesteigert. Nach Ablauf von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten ist die Butanolkonzentration um den Faktor 3,1 ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) gegenüber der Referenzkaskade erhöht. Während in der Referenzkaskade im ersten Reaktor keine C6-Körper gebildet werden, sind im Prozess mit verringerter Verdünnungsrate geringe Mengen an Hexanoat und Hexanol zu verzeichnen.

Im zweiten Reaktor sind ebenfalls oszillierende Verläufe für Biotrockenmasse und Produkte zu beobachten. Die mittlere Biotrockenmassekonzentration ist trotz geringerer Verdünnungsrate im Vergleich zur Referenzkaskade (bei höherer Verdünnungsrate: $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$) um 13 % geringer. Die mittlere Acetatkonzentration im zweiten Reaktor ist gegenüber dem Referenzprozess um den Faktor 1,8 gestiegen. Die mittlere Ethanolkonzentration ist im zweiten Reaktor gegenüber dem ersten kaum angestiegen. Sein Verlauf zeigt dabei einen zeitlichen Versatz zum Verlauf der Ethanolkonzentration im ersten Reaktor und lässt lediglich Einstrom von Ethanol aus diesem in den zweiten

Reaktor ohne eigene Ethanolbildung erahnen. Der Verlauf der Butyratkonzentration im zweiten Reaktor weist gegenüber der Referenzkaskade Steigerungen um den Faktor 2,8 auf. Der Verlauf der Butanolkonzentration weist ausgeprägtes Oszillieren (mittlere Konzentration $0,78 \text{ g L}^{-1}$) auf und entspricht einer Erhöhung der Butanolkonzentration um 10 % gegenüber der Referenzkaskade. Gegenüber dem ersten Reaktor liegt im zweiten Reaktor eine um das Fünffache höhere, mittlere Hexanoatkonzentration vor. Die mittlere Hexanolkonzentration im zweiten Reaktor ist nur leicht erhöht gegenüber dem ersten Reaktor und fällt gegenüber der Referenzkaskade minimal geringer aus.

Wie zunächst für die Anwendung einer verringerten Verdünnungsrate ($D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$) erwartet, sind die mittleren Konzentrationen der gebildeten Säuren Acetat und Butyrat im ersten Reaktor bei pH 6,0 gegenüber der Anwendung einer höheren Verdünnungsrate in der Referenzkaskade ($D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$) aufgrund verlängerter Verweilzeit im Reaktor höher. Damit wird der erste Reaktor wiederum zur Säurebildung herangezogen. Auch die C6-Säure Hexanoat wird dabei in geringem Maße gebildet. Parallel dazu findet auch die Bildung der Alkohole Ethanol und Butanol statt und kann somit im ersten Reaktor durch die Anlegung eines pH von pH 6,0 nicht komplett unterbunden werden. Es scheint, dass die Höhe der gebildeten Konzentrationen an Säuren *C. carboxidivorans* wohl auch unter optimalem pH für Wachstum und Säurebildung (pH 6,0) zur vermehrten Alkoholbildung im ersten Reaktor zwingt. Die Alkoholbildung an dieser Stelle ist als Detoxifikationsreaktion auf die gebildeten Säuren zu verstehen. Mit mittleren Konzentrationen von $5,35 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und $0,42 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat im ersten Reaktor liegen diese in einem Konzentrationsbereich, in dem bereits inhibierende Effekte auf *C. carboxidivorans* auftreten, insbesondere bei gleichzeitiger Existenz. Hierbei sei auf Abschnitt 5.2 zu Untersuchungen zur Produktinhibierung verwiesen, in dem inhibierende Auswirkungen durch Vorlage von $6,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat oder $2,0 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat auf den Stamm bereits vorlagen. Insbesondere das gleichzeitige Vorliegen der Acetatkonzentration in Kombination mit Butyrat- sowie Hexanoatkonzentrationen könnten den Stamm zur vermehrten Alkoholbildung gedrängt haben.

Die Alkohol zu Säure-Verhältnissen sind gegenüber der Referenzkaskade mit erhöhter Verweilzeit ausnahmslos für beide Reaktoren geringer sind (Daten nicht gezeigt). Es ist keine räumliche Trennung von Säurebildung und Lösemittelbildung unter diesen Prozessbedingungen möglich.

Das Auftreten von oszillierendem Verhalten anstelle der Einstellung eines Fließgleichgewichtszustandes wurde für die Rührkesselkaskade nur unter verringerten Verdünnungsraten beobachtet. In der Literatur ist ein solches Verhalten für eine

kontinuierliche Kultivierung von *C. acetobutylicum* zur Herstellung von Lösemitteln (Aceton, Butanol, Ethanol) beschrieben (Clarke et al. 1988). Sie beobachteten die gleichzeitige Bildung von Säuren und Lösemitteln in einem Chemostaten. Periodische Oszillationen charakterisierten dabei die Verläufe von Biomasse und Produkten (Säure und Lösemittel) und resultierten in oszillierenden Verläufen für Produktausbeuten und zellspezifische Wachstumsraten. Eine erhöhte spezifische Wachstumsrate war dabei verknüpft mit einer erhöhten Säureausbeute. Eine geringere spezifische Wachstumsrate war verknüpft mit der Erhöhung der Lösemittelausbeute. Sie schlossen daraus, dass die Kultur eine Mischung aus säurebildenden Zellen und lösemittelbildenden Zellen enthielt, deren Anteil im kontinuierlichen Prozess variierte und bestätigten dies über mikroskopische Morphologieanalyse. Dieses oszillierende Verhalten sei eine inhärente Charakteristik, welche durch eine Umschaltung von einem primärem zu einem sekundärem Metabolismus ausgelöst werde (Feedback-Regulation) und verhindere dabei die Ausbildung eines tatsächlichen Gleichgewichtszustands. Bei der Anwendung höherer Verdünnungsraten beobachtete diese Forschungsgruppe ein vermindertes oszillierendes Verhalten von Biomasse-, Säure- und Lösemittelkonzentrationen, sodass sie einem Fließgleichgewichtszustand deutlich näher kamen.

Ein derartiges Verhalten mit variierendem Anteil säurebildender Zellen und alkoholbildender Zellen in der hier durchgeführten Rührkesselkaskade mit verringerter Verdünnungsrate könnte hier ebenfalls vorliegen, da die Verläufe der Säure- und Alkoholkonzentrationen sich stets in oszillierendem Zustand befanden. Ebenso wird in dieser Arbeit ein stabiles Gleichgewicht erreicht, wenn die eingestellten Verdünnungsraten höher waren (Referenzkaskade). Die Zellpopulation könnte sich in einen Teil säurebildender Zellen und einen Teil Solventogenese betreibender Zellen aufgeteilt haben. Dabei wird ein gleichzeitiges Auftreten von säurebildenden und alkoholbildenden Stoffwechselwegen innerhalb einer Zelle in der Literatur aus biochemischen Aspekten nahezu ausgeschlossen, da innerhalb einer Zelle eine Verschiebung zur Solventogenese über veränderte Genregulation erfolgt (Hartmanis et al. 1984; Andersch et al. 1983; Ukpong et al. 2012). Die Einstellung des pH auf 5,0 im zweiten Reaktor könnte eine unzureichende Bedingung dargestellt haben, die aus dem ersten Reaktor zugeführte Population aus säurebildenden und alkoholbildenden Zellen zur bevorzugten Solventogene zu bringen. Sofern die Beobachtungen von Clarke et al. (1988) auf diese Arbeit übertragen werden können, ist das Bewusstsein eines solchen Verhaltens unter bestimmten Prozessbedingungen bedeutend für Untersuchungen zur kontinuierlichen Alkoholproduktion in kaskadierten Reaktoren.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Fossile Rohstoffe werden zur Herstellung von Kraftstoffen und Chemikalien verwendet. Aufgrund der Endlichkeit der fossilen Rohstoffe und der Freisetzung hoher Mengen an Treibhausgasen durch die Nutzung von fossilen Rohstoffen besteht jedoch ein großes Interesse an der Produktion von Kraftstoffen und Chemikalien aus alternativen Rohstoffquellen. Synthesegas wird in der Gasfermentation zur mikrobiellen Herstellung von Grundchemikalien und Kraftstoffen genutzt, da unter anderem Acetat, 2,3-Butandiol, Ethanol und Butanol natürlicherweise von acetogenen Mikroorganismen gebildet werden können. Eine Kommerzialisierung befindet sich aber aufgrund einer Vielzahl an Herausforderungen noch im Anfangsstadium.

Clostridium carboxidivorans stellt aufgrund seines breiten Produktspektrums einen interessanten Produktionsorganismus für die Synthesegasfermentation dar. Im Fokus für eine industrielle Anwendung stehen dabei die Produkte Ethanol, Butanol und Hexanol als Biokraftstoff, Lösemittel, Grundchemikalie und für die Pharma-, Textil- und Kosmetikindustrie. Bisher sind die erzielten Produktkonzentrationen bei autotrophen Prozessen mit acetogenen Mikroorganismen in der Gasfermentation noch relativ gering. Die Bildung von Alkoholen mit Acetogenen findet zudem nur in der solventogenen Phase aus den zuvor in der acidogenen Phase gebildeten Säuren statt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die finalen Produktkonzentrationen der Alkohole mit *C. carboxidivorans* zu erhöhen und die Restsäurekonzentrationen gering zu halten. Hierzu wurden im vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Satzverfahren Reaktionsbedingungen zur selektiven Alkoholbildung identifiziert.

Ein pH-unkontrollierter Prozess mit CO/CO₂-Begasung diente als Referenzprozess. Er führte nach Durchschreiten der acidogenen und solventogenen Phase, welche anhand eines fallenden pH-Verlaufs (acidogen) und eines wiederum ansteigenden pH-Verlaufs (solventogen) gekennzeichnet sind, zur Bildung von 1,21 g L⁻¹ Ethanol, 0,44 g L⁻¹ Butanol und 0,15 g L⁻¹ Hexanol bei einer Biotrockenmassekonzentration von 0,45 g L⁻¹ in der stationären Phase.

Im Vergleich hierzu konnte über eine pH-Kontrolle auf pH 6,0 die maximale Acetatkonzentration um 152 % gesteigert werden, die des Ethanols um 119 %. Jedoch war die C4-Produkt-Bildung stark reduziert und es wurden keine C6-Produkte gebildet. Ein pH-Profil mit pH 6,0 während der ersten 1,0 d Prozesszeit gefolgt von einer pH-Absenkung auf pH 5,0 führte ebenfalls zu Steigerungen in der Acetat- und Ethanolbildung (2,29 g L⁻¹ beziehungsweise 2,69 g L⁻¹). Einbußen beim Butanol fielen

nicht so hoch aus. Der pH hat damit nicht nur Einfluss auf das Einsetzen der Alkoholbildung, sondern auch auf die jeweils gebildeten Alkohole. Der natürliche Abfall des pH erlaubt dabei eine ausgeprägtere Bildung längerer Produkte, während pH-Kontrollen zu kürzerkettigen Produkten führten.

Auch Medienbestandteile selbst können Einfluss auf die autotrophe Alkoholbildung haben. Zwar ist es wünschenswert Komplexbestandteile gering zu halten, jedoch waren Prozesse ohne Hefeextrakt mit *C. carboxidivorans* mit langen Verzögerungszeiten und kaum Biomassebildung verbunden. Der Einsatz von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt hatte Einbußen von 49 % in der Biomasse, verglichen mit 1 g L^{-1} eingesetztem Hefeextrakt, die Ethanolbildung konnte damit jedoch auf $1,55 \text{ g L}^{-1}$ und damit die maximale zellspezifische Ethanolausbeute um den Faktor 1,7 erhöht werden. Bei der Erhöhung der Hefeextraktkonzentration auf 3 g L^{-1} konnten aufgrund höherer maximaler Biotrockenmassekonzentration die Alkoholkonzentrationen auf $1,80 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol, $0,66 \text{ g L}^{-1}$ Butanol und $0,38 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol erhöht werden, was Steigerungen um 50 % (Ethanol, Butanol) und 150 % (Hexanol) entsprach. Spurenelemente spielen als Cofaktoren in Schlüsselenzymen des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges eine wichtige Rolle (Ragsdale und Pierce 2008). Basierend auf Voruntersuchungen in parallelen Anaerobflaschen mit Variation der Spurenelemente Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} und Mo^{2+} zeigten eine Verzehnfachung der Fe^{2+} -Konzentration oder eine Verdreifachung der Zn^{2+} -Konzentration im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor deutliche Steigerungen in den erzielten Alkoholkonzentrationen von $2,80 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol, $0,76 \text{ g L}^{-1}$ Butanol ($10 \times \text{Fe}^{2+}$) und $0,36 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol ($3 \times \text{Zn}^{2+}$) bei gesteigerten Alkohol zu Säure-Verhältnissen. Unter der Reduktion von Säuren als auch mit *de novo* Synthese konnten die Alkoholkonzentration im Satzprozess um 131 %, 73 % und 140 % gegenüber einem Prozess ohne Abänderung der Spurenelementzusammensetzung gesteigert werden.

Eine Verringerung der Prozesstemperatur auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ führte im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor zu verlangsamtem Wachstum (Einbußen um 49 % bei Reduzierung auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$), jedoch konnten Maximalkonzentrationen der längerkettigen Produkte mit Werten von $0,45 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat und $0,24 \text{ g L}^{-1}$ Hexanoat um 114 % beziehungsweise 242 % bei erhöhten Produktbildungsraten gesteigert werden. Dies schlug sich wiederum auf die Bildung von Hexanol nieder, welche mit $0,47 \text{ g L}^{-1}$ die höchste in der Arbeit erzielte Hexanolkonzentration darstellt (Steigerung um 213 % gegenüber einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Die geringe Wasserlöslichkeiten der Gase CO und H_2 können zu Stofftransportlimitierungen von der Gas- in die Flüssigphase führen und limitierend auf

die Umsetzung zur Produktbildung sein, weswegen die Bereitstellung von ausreichend gasförmigen Substraten eine wichtige Rolle in der Gasfermentation spielt. Erhöhungen der Partialdrücke können die Löslichkeit der Gaskomponenten verbessern, aber auch das Produktspektrum verändern und inhibierende Effekte auf Wachstum und Produktbildung des Mikroorganismus haben. Ziel war daher die Gasverwertung durch *C. carboxidivorans* zu untersuchen und insbesondere für CO eine potentielle CO-Substratüberschussinhibierungskinetik quantitativ zu erfassen.

Satzprozesse mit einer Gaszusammensetzung von CO/CO₂ zeigten CO-Aufnahme mit der Bildung von CO₂ als Nebenprodukt. Damit diente CO als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die zusätzliche Bereitstellung von H₂ in H₂/CO/CO₂-Prozessen als zusätzliche Energiequelle zeigte weder einen Verbrauch, noch eine Bildung von H₂. Demnach kann auf H₂ in autotrophen Prozessen mit *C. carboxidivorans* verzichtet werden, da keine gleichzeitige Verwertung von H₂/CO₂ und CO/CO₂ zu beobachten war. Reine CO-Prozesse (H₂/CO oder CO) zeigten im Rührkesselreaktor kein Wachstum, was die Notwendigkeit von CO₂ in der Gaszusammensetzung trotz seiner Nettobildung verdeutlichte. Prozesse ohne Zufuhr von CO in der Gasphase (H₂/CO₂) zeigten kein Wachstum. *C. carboxidivorans* zeigte sich gegenüber erhöhten CO Partialdrücken wenig sensitiv, was anhand einer Substratüberschussinhibierungskinetik abzuleiten war. Die Sättigungskonstante K_S ist mit 180 mbar CO relativ hoch. Die Inhibierungskonstante K_I von 1259 mbar CO lässt auf eine schwach ausgeprägte CO-Überschussinhibierung schließen. Der optimale CO-Partialdruck wurde zu 565 mbar CO bestimmt, bei dem eine optimale spezifische Wachstumsrate von 0,171 h⁻¹ erreicht wird. Höchste Alkoholkonzentrationen sowie Alkohol zu Säure-Verhältnisse wurden nahe des Optimums bei einem CO-Eingangspartialdruck von 0,6 bar im Satzverfahren erzielt (1,81 g L⁻¹ Ethanol, 0,56 g L⁻¹ Butanol und 0,30 g L⁻¹ Hexanol). Die Identifikation der hohen Toleranz gegenüber CO macht *C. carboxidivorans* zu einem auch unter diesem Aspekt für die Industrie interessanten Acetogen.

Die Bildung von Alkoholen mit acetogenen Mikroorganismen findet bei Satzprozessen nur in der solventogenen Phase statt und reduziert die tatsächliche Produktionsphase enorm. Gerade für Massenprodukte stellt dies eine ungünstige Ausgangssituation dar und führt zu geringen Raum-Zeit-Ausbeuten. Steigerungen der Raum-Zeit-Ausbeuten können durch den Wechsel vom Satzbetrieb in den kontinuierlichen Betrieb erzielt werden, weswegen ein kontinuierlicher Prozess zur effektiven Alkoholbildung im vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor gestaltet wurde unter der Verwendung identifizierter Reaktionsbedingungen für die Alkoholbildung aus Satzprozessen. Um dem biphasischen Fermentationsprozess mit Acidogenese und

Solventogenese gerecht zu werden, wurde ein kontinuierlicher Prozess in Form einer Rührkesselkaskade aus zwei hintereinander geschalteten Bioreaktoren gestaltet. Der erste Reaktor wurde bei pH 6,0 betrieben, der zweite Reaktor bei pH 5,0. Das Reaktionsmedium mit gebildeter Biomasse und organischen Säuren wurde kontinuierlich vom ersten in den zweiten Reaktor transferiert. Zur Erhöhung der mittleren hydraulischen Verweilzeit im zweiten Reaktor wurde das Arbeitsvolumen von 1,0 L auf 1,5 L erhöht, was bei dem gewählten Volumenstrom zu Verdünnungsraten von $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ führte. Zur Erzielung hoher metabolischer Raten wurde die Temperatur auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt und die Gasmischung mit $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$ und einem CO-Eingangspartialdruck von 600 mbar nahe des optimalen CO-Partialdrucks eingestellt.

Mit diesem zweistufigen kontinuierlichen Prozess konnten im zweiten Reaktor bei $1,82 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse $6,07 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol, $0,73 \text{ g L}^{-1}$ Butanol und $0,07 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol im Fließgleichgewicht gebildet werden und die Alkoholkonzentrationen gegenüber Satzprozessen bei kontinuierlichem Produktabzug deutlich steigert werden (Abbildung 7.1). Ebenso wurden die Raum-Zeit-Ausbeuten von $5,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Ethanol und $1,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butanol im zweiten Reaktor deutlich gesteigert (Steigerungen um 561 % beziehungsweise 190 % gegenüber Satzprozessen). Die Alkohol zu Säure-Verhältnisse des ersten Reaktors konnten von $1,1 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ g}_{\text{Acetat}}^{-1}$ und $1,1 \text{ g}_{\text{Butanol}} \text{ g}_{\text{Butyrat}}^{-1}$ durch die pH-Absenkung im zweiten Reaktor auf $3,9 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ g}_{\text{Acetat}}^{-1}$ und $4,4 \text{ g}_{\text{Butanol}} \text{ g}_{\text{Butyrat}}^{-1}$ gesteigert werden. Die Raum-Zeit-Ausbeuten des Gesamtkaskadenprozesses lieferte mit $7,00 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Ethanol und $0,84 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Butanol deutliche Steigerungen gegenüber Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* (Faktor 8,9 für Ethanol und Faktor 3,5 für Butanol).

Eine Erhöhung der mittleren hydraulischen Verweilzeit durch Verringerung der Verdünnungsraten in kaskadierten Prozessen auf $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$ führte zu oszillierenden Verläufen von Biomasse- und Produktkonzentrationen in beiden Reaktoren. Dabei wurden im ersten Reaktor deutlich erhöhte mittlere Säurekonzentrationen erzielt ($5,37 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und $0,43 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat). Es wurde jedoch kein stabiler Gleichgewichtszustand im Kaskadenprozess erreicht.

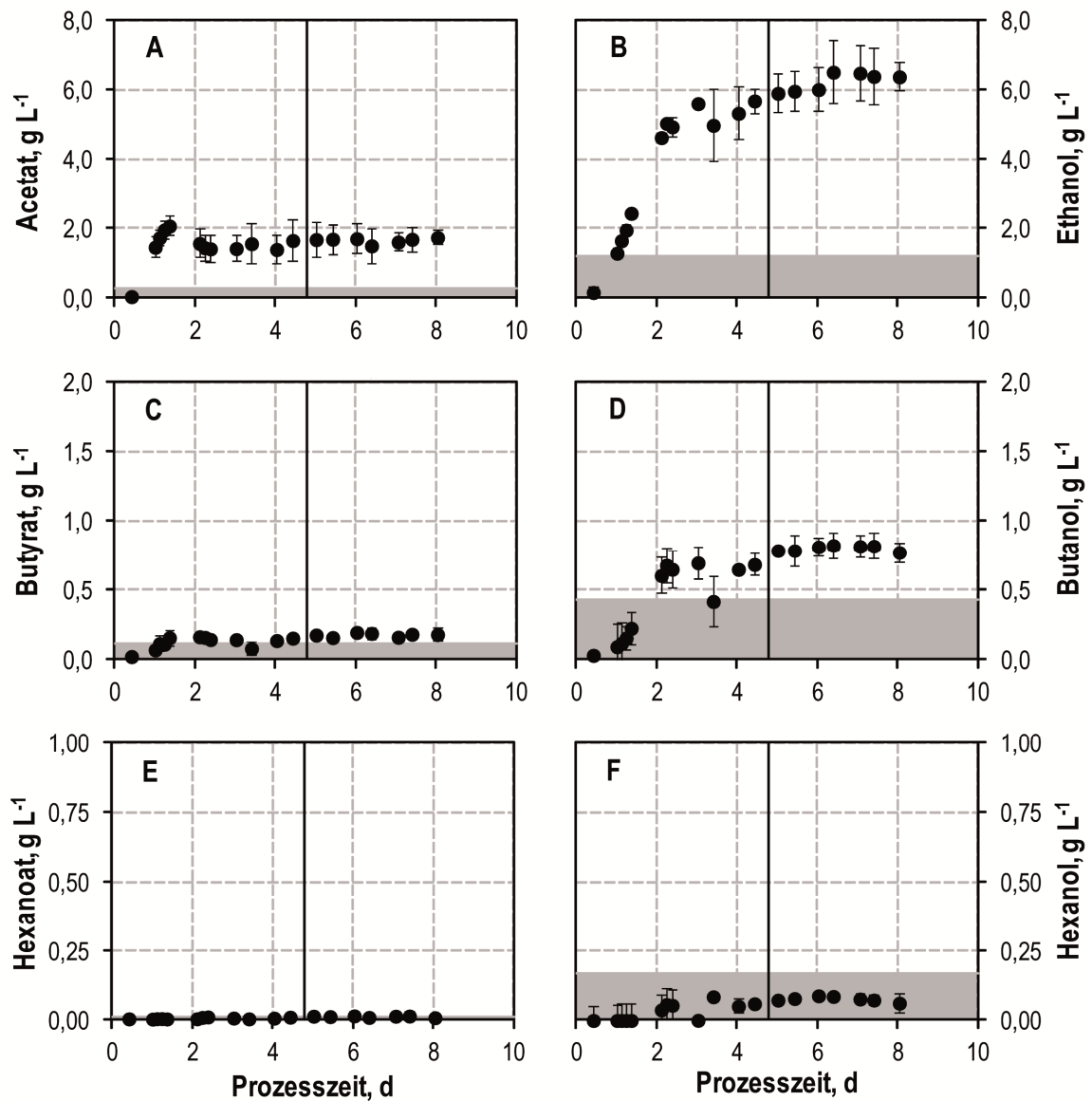


Abbildung 7.1: Vergleich der kontinuierlichen Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ mit dem Referenzprozess mit *C. carboxidivorans* im Satzbetrieb. Dargestellt sind die Verläufe der Produktkonzentrationen des zweiten Reaktors (schwarze Symbole) sowie schematisch die maximalen Alkoholkonzentrationen (graue Flächen) und Restsäurekonzentrationen (graue Flächen) des Satzprozesses (Referenz). Die vertikale durchgezogene Linie markiert das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten für das Gesamtsystem (τ_{gesamt}). Prozessbedingungen im Satzbetrieb: $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0 = 6,0$; $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$; $P = 1,01 \text{ bar}$; $V = 1,0 \text{ L}$. Prozessbedingungen im Kaskadenbetrieb. Erster Reaktor: $\text{pH } 6,0$; $1,0 \text{ L}$; $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Zweiter Reaktor: $\text{pH } 5,0$; $1,5 \text{ L}$; $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Für beide Reaktoren der Kaskade gleich: $\text{CO}:\text{CO}_2 = 60:40$; $n = 1200 \text{ rpm}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $P = 1,01 \text{ bar}$.

Ausblick

Die Rührkesselkaskade eignete sich, um den ersten Reaktor zur Bildung von Biomasse zu nutzen, während der zweite Reaktor der Alkoholbildung diente. Bei Nutzung von CO als Kohlenstoffquelle tritt eine hohe Nebenproduktbildung von CO₂ auf. Diese mindert den Kohlenstoffausbeute stark. Eine Rückführung des Kohlenstoffs aus dem CO₂-Überschussstrom zurück in das Reaktionssystem könnte den Kohlenstoffumsatz erheblich steigern. CO₂ müsste hierzu zunächst wieder zu CO reduziert werden, um den Kohlenstoff weiter nutzbar zu machen. Erste technische Lösungen hat Siemens hierzu gefunden, bei denen CO₂ mit Wasser elektrolytisch zu CO und H₂ umgesetzt wird (Schulze und Martini 2018).

Der Kaskadenprozess beruht bisher auf zwei hintereinander geschalteten Rührkesselreaktoren. Eine Umstellung auf industriell relevantere Reaktorkonzepte zum Beispiel auf Blasensäulenreaktoren (homogene Energiedistributionsverteilung, geringere Kosten für den Leistungseintrag) wäre denkbar. Reaktionstechnische Untersuchungen mit geeigneten Begasungsstrategien zur ausreichenden Gasverfügbarkeit könnten Blasensäulenreaktoren zu einer geeigneten Reaktorkonfiguration für eine Kaskadierung machen. In Blasensäulen baut sich zwar aufgrund der großen Höhe des Reaktors an unterschiedlichen Höhenpositionen ein hydrostatischer Druck auf, der die Partialdrücke zu einer Funktion über die Reaktorhöhe macht, mit hohem Partialdruck am Boden des Reaktors und niedrigem Partialdruck nahe des Flüssigkeitsspiegels. Jedoch ist *C. carboxidivorans* als Mikroorganismus unproblematisch, da es sich gegenüber erhöhten CO Partialdrücken sehr insensitiv gezeigt hat und in einem großen Bereich von CO-Partialdrücken keine negativen Effekte auftreten.

C. carboxidivorans weist ein breites Produktspektrum auf. Wenn jedoch gezielt einzelne Produkte hergestellt werden sollen, sind sämtliche anderen gebildeten Produkte als Nebenprodukte unerwünscht. Die Identifikation der genauen Stoffwechselzusammenhänge zur Bildung der Stoffwechselendprodukte und der dafür zuständigen Enzyme gefolgt von entsprechender genetischer Modifikation des Wildtypstammes hinsichtlich Hochregulation oder Ausschaltens daran beteiligter Enzyme könnte zu einem vermehrten Kohlenstofffluss in Richtung des gewünschten Zielproduktes führen. Auch ist über genetische Modifikation die Herstellung neuartiger Produkte außerhalb des natürlichen Produktspektrums denkbar.

8 Literaturverzeichnis

- Abrini, J.; Naveau, H. und Nyns, E.-J. (1994): *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of Microbiology*, 161 (4): 345–351.
- Abubackar, H. N.; Bengelsdorf, F. R.; Dürre, P.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2016a): Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by clostridia. *Applied Energy*, 169: 210–217.
- Abubackar, H. N.; Fernández-Naveira, Á.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2016b): Impact of cyclic pH shifts on carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum*. *Fuel*, 178: 56–62.
- Abubackar, H. N.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2011): Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5 (1): 93–114.
- Abubackar, H. N.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2018): Production of acids and alcohols from syngas in a two-stage continuous fermentation process. *Bioresource Technology*, 253: 227–234.
- Acharya, B.; Dutta, A. und Basu, P. (2017): Ethanol production by syngas fermentation in a continuous stirred tank bioreactor using *Clostridium ljungdahlii*. *Biofuels*, 86 (1): 1–17.
- Acharya, B.; Roy, P. und Dutta, A. (2015): Review of syngas fermentation processes for bioethanol. *Biofuels*: 1–14.
- Ahmed, A.; Cateni, B. G.; Huhnke, R. L. und Lewis, R. S. (2006): Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7T. *Biomass and Bioenergy*, 30 (7): 665–672.
- Ajanovic, A. (2011): Biofuels versus food production. Does biofuels production increase food prices? *Energy*, 36 (4): 2070–2076.
- Allen, T. D.; Caldwell, M. E.; Lawson, P. A.; Huhnke, R. L. und Tanner, R. S. (2010): *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60 (Pt 10): 2483–2489.

- Andersch, W.; Bahl, H. und Gottschalk, G. (1983): Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18 (6): 327–332.
- Andrews, J. (1968): A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 10 (6): 707–723.
- Atkins, P. W. und Paula, J. d. (2012): *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH. Weinheim. 1188 S.
- Bahl, H.; Andersch, W.; Braun, K. und Gottschalk, G. (1982): Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14 (1): 17–20.
- Bengelsdorf, F. R.; Beck, M. H.; Erz, C.; Hoffmeister, S.; Karl, M. M.; Riegler, P.; Wirth, S.; Poehlein, A.; Weuster-Botz, D. und Dürre, P. (2018): Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂ + H₂ Fermentation. In: Elsevier.
- Bennett, B.; Lemon, B. J. und Peters, J. W. (2000): Reversible Carbon Monoxide Binding and Inhibition at the Active Site of the Fe-Only Hydrogenase. *Biochemistry*, 39 (25): 7455–7460.
- Bennett, G. N. und Rudolph, F. B. (1995): The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews*, 17 (3): 241–249.
- Bertsch, J. und Müller, V. (2015): CO Metabolism in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (17): 5949–5956.
- Biegel, E. und Müller, V. (2010): Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (42): 18138–18142.
- Bowles, L. K. und Ellefson, W. L. (1985): Effects of Butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (5): 1165–1170.
- Bramlett, M. R.; Tan, X. und Lindahl, P. A. (2003): Inactivation of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase by copper. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (31): 9316–9317.
- Bredwell, M. D.; Srivastava, P. und Worden, M. R. (1999): Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. *Biotechnology Progress*, 15 (5): 834–844.

- Bruant, G.; Levesque, M.-J.; Peter, C.; Guiot, S. R. und Masson, L. (2010): Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7. *PLoS ONE*, 5 (9): 1–12.
- Bundesregierung (2018a):
<https://www.bundesregierung.de/Content/DE/Lexikon/EnergieLexikon/C/2013-09-18-co2-emission.html>. Aufgerufen am 8.4.2018.
- Bundesregierung (2018b):
https://www.bundesregierung.de/Webs/Breg/DE/Themen/Energiewende/EnergieLexikon/_function/glossar_catalog.html;jsessionid=FCD17C82B5BE07C38B7860255D72C549.s4t1?lv2=754372&lv3=77075&id=GlossarEntry770754. Aufgerufen am 8.4.2018.
- Busch, R.; Hirth, T.; Liese, A.; Nordhoff, S.; Puls, J.; Pulz, O.; Sell, D.; Syldatk, C. und Ulber, R. (2006): Nutzung nachwachsender Rohstoffe in der industriellen Stoffproduktion. *Chemie Ingenieur Technik*, 78 (3): 219–228.
- Carnarius, E. H. (1940): Butyl alcohol fermentation process (US 2198104 A).
- Chmiel, H. (2011): Bioprozesstechnik, 3. Auflage. Springer-Verlag. 555 S.
- Clarke, K. G.; Hansford, G. S. und Jones, D. T. (1988): Nature and significance of oscillatory behavior during solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 32 (4): 538–544.
- Costa, J. M. und Moreira, A. R. (1983): Growth Inhibition Kinetics for the Acetone-Butanol Fermentation. In: Blanch, H. W.; Papoutsakis, E. T. u. Stephanopoulos, G. (Hrsg.): Foundations of Biochemical Engineering. American Chemical Society. Washington, D.C.: 501–512.
- Cotter, J. L.; Chinn, M. S. und Grunden, A. M. (2009a): Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (3): 369–380.
- Cotter, J. L.; Chinn, M. S. und Grunden, A. M. (2009b): Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (5): 281–288.
- Daniell, J.; Köpke, M. und Simpson, S. (2012): Commercial Biomass Syngas Fermentation. *Energies*, 5 (12): 5372–5417.
- Datar, R. P.; Shenkman, R. M.; Cateni, B. G.; Huhnke, R. L. und Lewis, R. S. (2004): Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (5): 587–594.

- Davis, B. H. (2009): Fischer–Tropsch Synthesis. Reaction mechanisms for iron catalysts. *Catalysis Today*, 141 (1-2): 25–33.
- Diekert, G. und Wohlfarth, G. (1994): Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 209–221.
- Doran, P. M. (2004): Bioprocess engineering principles. Elsevier/Acad. Press. Amsterdam. 439 S.
- Drake, H. /Hrsg. (1994): Acetogenesis. Chapman & Hall. New York, London.
- Drake, H.; Gößner, A. und Daniel, S. (2008): Old Acetogens, New Light. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125: 100–128.
- Drake, H. L.; Küsel, K. und Matthies, C. (2006): Acetogenic Prokaryotes. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H. u. Stackebrandt, E. (Hrsg.): The Prokaryotes. Springer New York. New York, NY: 354–420.
- Dürre, P. /Hrsg. (2005): Handbook on clostridia. Taylor & Francis. Boca Raton. 903 S.
- Fernández-Naveira, A.; Abubackar, H. N.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2016a): Carbon monoxide bioconversion to butanol-ethanol by *Clostridium carboxidivorans*: kinetics and toxicity of alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (9): 4231–4240.
- Fernández-Naveira, A.; Abubackar, H. N.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2016b): Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (7): 3361–3370.
- Fernández-Naveira, Á.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2017a): Effect of pH control on the anaerobic H-B-E fermentation of syngas in bioreactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92 (6): 1178–1185.
- Fernández-Naveira, Á.; Veiga, M. C. und Kennes, C. (2017b): H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92.
- Fuchs, G. /Hrsg. (2014): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart [u.a.]. 750 S.
- Gaddy, J. L.; Arora, D. K.; Ko, C. W.; Phillips, J. R.; Basu, R.; Wikstrom, C. V. und Clausen, E. C. (2012): Methods for increasing the production of ethanol from microbial fermentation (US20120094346A1).

- Gaddy, J. L.; Arora, D. K.; Ko, C.-W.; Phillips, J. R.; Basu, R.; Wikstrom, C. V. und Clausen, E. C. (2007): Methods for increasing the production of ethanol from microbial fermentation (US 7285402 B2).
- Gaddy, J. L. und Clausen, E. C. (1992): *Clostridium ljungdahlii*, an anaerobic ethanol and acetate producing microorganism (5173429).
- Grethlein, A. J.; Worden, R. M.; Jain, M. K. und Datta, R. (1990): Continuous production of mixed alcohols and acids from carbon monoxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25 (1): 875–884.
- Grethlein, A. J.; Worden, R. M.; Jain, M. K. und Datta, R. (1991): Evidence for production of n-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72 (1): 58–60.
- Hartmanis, M. G. N.; Klason, T. und Gatenbeck, S. (1984): Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 66–71.
- Hass, V. C. und Pörtner, R. (2011): Praxis der Bioprozesstechnik. Mit virtuellem Praktikum. Spektrum Akad. Verl. Heidelberg. 180 S.
- Hemme, C. L.; Mouttaki, H.; Lee, Y.-J.; Zhang, G.; Goodwin, L.; Lucas, S.; Copeland, A.; Lapidus, A.; Glavina del Rio, T.; Tice, H.; Saunders, E.; Brettin, T.; Detter, J. C.; Han, C. S.; Pitluck, S.; Land, M. L.; Hauser, L. J.; Kyrpides, N.; Mikhailova, N.; He, Z.; Wu, L.; van Nostrand, J. D.; Henrissat, B.; He, Q.; Lawson, P. A.; Tanner, R. S.; Lynd, L. R.; Wiegel, J.; Fields, M. W.; Arkin, A. P.; Schadt, C. W.; Stevenson, B. S.; McInerney, M. J.; Yang, Y.; Dong, H.; Xing, D.; Ren, N.; Wang, A.; Huhnke, R. L.; Mielenz, J. R.; Ding, S.-Y.; Himmel, M. E.; Taghavi, S.; van der Lelie, D.; Rubin, E. M. und Zhou, J. (2010): Sequencing of multiple clostridial genomes related to biomass conversion and biofuel production. *Journal of Bacteriology*, 192 (24): 6494–6496.
- Henstra, A. M.; Sipma, J.; Rinzema, A. und Stams, A. J. M. (2007): Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (3): 200–206.
- Herrero, A. A. (1983): End-product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends in Biotechnology*, 1 (2): 49–53.
- Hu, P.; Bowen, S. H. und Lewis, R. S. (2011): A thermodynamic analysis of electron production during syngas fermentation. *Bioresource Technology*, 102 (17): 8071–8076.

- Huhnke, R. L.; Lewis, R. S. und Tanner, R. S. (2010): Isolation and characterization of novel clostridial species (US 7704723 B2).
- Hungate, R. (1976): A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: Norris, J. (Hrsg.): *Methods in Microbiology*. Academic Press. London: 117–132.
- Hurst, K. M. und Lewis, R. S. (2010): Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (2): 159–165.
- Jones, D. T. und Woods, D. R. (1986): Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, 50 (4): 484–524.
- Kantzow, C. und Weuster-Botz, D. (2016): Effects of hydrogen partial pressure on autotrophic growth and product formation of *Acetobacterium woodii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (8): 1325–1330.
- Knoshaug, E. P. und Zhang, M. (2009): Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153 (1-3): 13–20.
- Köpke, M.; Held, C.; Hujer, S.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Wollherr, A.; Ehrenreich, A.; Liebl, W.; Gottschalk, G. und Dürre, P. (2010): *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (29): 13087–13092.
- Kundiyana, D. K.; Huhnke, R. L. und Wilkins, M. R. (2010): Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: design and process considerations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (5): 492–498.
- Kundiyana, D. K.; Wilkins, M. R.; Maddipati, P. und Huhnke, R. L. (2011): Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by "*Clostridium ragsdalei*". *Bioresource Technology*, 102 (10): 5794–5799.
- Küsel, K.; Dorsch, T.; Acker, G.; Stackebrandt, E. und Drake, H. L. (2000): *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 2: 537–546.
- Leclerc, M.; Elfoul-Bensaid, L. und Bernalier, A. (1998): Effect of Yeast Extract on Growth and Metabolism of H₂-Utilizing Acetogenic Bacteria from the Human Colon. *Current Microbiology*, 37 (3): 166–171.
- Lee, S. Y.; Park, J. H.; Jang, S. H.; Nielsen, L. K.; Kim, J. und Jung, K. S. (2008a): Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101 (2): 209–228.

- Lee, S.-M.; Cho, M. O.; Park, C. H.; Chung, Y.-C.; Kim, J. H.; Sang, B.-I. und Um, Y. (2008b): Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. *Energy & Fuels*, 22 (5): 3459–3464.
- Lewis, R. S.; Tanner, R. S. und Huhnke, R. L. (2006): Indirect or direct fermentation of biomass to fuel alcohol (US 2007/0275447 A1).
- Li, D.; Meng, C.; Wu, G.; Xie, B.; Han, Y.; Guo, Y.; Song, C.; Gao, Z. und Huang, Z. (2018): Effects of zinc on the production of alcohol by *Clostridium carboxidivorans* P7 using model syngas. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45 (1): 61–69.
- Li, K.; Zhang, R. und Bi, J. (2010): Experimental study on syngas production by co-gasification of coal and biomass in a fluidized bed. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (7): 2722–2726.
- Liew, F.; Köpke, M. und Simpson, S. (2013): Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. In: Fang, Z. (Hrsg.): *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*. InTech.
- Liew, F. M.; Martin, M. E.; Tappel, R. C.; Heijstra, B. D.; Mihalcea, C. und Köpke, M. (2016): Gas Fermentation-A Flexible Platform for Commercial Scale Production of Low-Carbon-Fuels and Chemicals from Waste and Renewable Feedstocks. *Frontiers in Microbiology*, 7: 694.
- Liou, J. S.-C.; Balkwill, D. L.; Drake, G. R. und Tanner, R. S. (2005): *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (5): 2085–2091.
- Liu, H.; Wang, G. und Zhang, J. (2013): The Promising Fuel-Biobutanol. In: Fang, Z. (Hrsg.): *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*. InTech.
- Liu, K.; Atiyeh, H. K.; Stevenson, B. S.; Tanner, R. S.; Wilkins, M. R. und Huhnke, R. L. (2014): Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource Technology*, 151: 69–77.
- Liu, K.; Atiyeh, H. K.; Tanner, R. S.; Wilkins, M. R. und Huhnke, R. L. (2012): Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*. *Bioresource Technology*, 104: 336–341.

- Ljungdahl, L. (1986): The Autotrophic Pathway of Acetate Synthesis in Acetogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 40 (1): 415–450.
- Ljungdahl, L. und Wood, H. (1969): Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 23: 515–538.
- Lynd, L.; Kerby, R. und Zeikus, J. G. (1982): Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *Journal of Bacteriology*, 149 (1): 255–263.
- Min, F.; Köpke, M. und Dennis, S. (2013): Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. In: Fang, Z. (Hrsg.): Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques. InTech.
- Mohammadi, M.; Mohamed, A.; Najafpour, G.; Younesi, H. und Uzir, M. (2014): Kinetic studies on fermentative production of biofuel from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*. *The Scientific World Journal*, 2014: 910590.
- Mohammadi, M.; Younesi, H.; Najafpour, G. und Mohamed, A. R. (2012): Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87 (6): 837–843.
- Möller, B.; Oßmer, R.; Howard, B. H.; Gottschalk, G. und Hippe, H. (1984): *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*, 139 (4): 388–396.
- Monod, J. (1949): The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3: 371–394.
- Müller, V. (2003): Energy Conservation in Acetogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11): 6345–6353.
- Müller-Erlwein, E. (2007): Chemische Reaktionstechnik. Teubner. Wiesbaden. 283 S.
- Munasinghe, P. C. und Khanal, S. K. (2010): Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 101 (13): 5013–5022.
- Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K. und Dalai, A. K. (2010): Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2): 578–597.

- Najafpour, G. und Younesi, H. (2006): Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (1-2): 223–228.
- Neugebauer, R. /Hrsg. (2017): Ressourceneffizienz. Schlüsseltechnologien für Wirtschaft und Gesellschaft. Springer Vieweg. Berlin, Heidelberg. 331 S.
- Perry, R. H.; Green, D. W.; Maloney, J. O.; Abbott, M. M.; Ambler, C. M. und Amero, R. C. (1997): Perry's chemical engineers' handbook. McGraw-hill New York.
- Peters, V.; Janssen, P. H. und Conrad, R. (1999): Transient Production of Formate During Chemolithotrophic Growth of Anaerobic Microorganisms on Hydrogen. *Current Microbiology*, 38 (5): 285–289.
- Pfaffinger, C. E. (2017): Reaktionstechnische Untersuchungen zur Lipidherstellung mit *Nannochloropsis* sp. in verschiedenen Photobioreaktoren. Garching. 220 S.
- Pfaffinger, C. E.; Schöne, D.; Trunz, S.; Löwe, H. und Weuster-Botz, D. (2016): Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Algal Research*, 20: 153–163.
- Phillips, J. R.; Atiyeh, H. K.; Tanner, R. S.; Torres, J. R.; Saxena, J.; Wilkins, M. R. und Huhnke, R. L. (2015): Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technology*, 190: 114–121.
- Phillips, J. R.; Klasson, K.T.; Clausen, E. C. und Gaddy, J. L. (1993): Biological Production of Ethanol from Coal Synthesis Gas. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (39/40): 559–571.
- Ragsdale, S. (2004): Life with carbon monoxide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (3): 165–195.
- Ragsdale, S. (2008): Enzymology of the Wood-Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125 (1): 129–136.
- Ragsdale, S. und Pierce, E. (2008): Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et biophysica acta*, 1784 (12): 1873–1898.
- Ragsdale, S. W. (2006): Metals and their scaffolds to promote difficult enzymatic reactions. *Chemical Reviews*, 106 (8): 3317–3337.
- Rajagopalan, S.; Datar, R. P. und Lewis, R. S. (2002): Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biomass and Bioenergy*, 23 (6): 487–493.

- Ramachandriya, K. D.; Kundiyana, D. K.; Wilkins, M. R.; Terrill, J. B.; Atiyeh, H. K. und Huhnke, R. L. (2013): Carbon dioxide conversion to fuels and chemicals using a hybrid green process. *Applied Energy*, 112: 289–299.
- Ramachandriya, K. D.; Wilkins, M. R.; Delorme, M. J.M.; Zhu, X.; Kundiyana, D. K.; Atiyeh, H. K. und Huhnke, R. L. (2011): Reduction of acetone to isopropanol using producer gas fermenting microbes. *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (10): 2330–2338.
- Ramió-Pujol, S.; Ganigué, R.; Bañeras, L. und Colprim, J. (2015): Incubation at 25°C prevents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7. *Bioresource Technology*, 192: 296–303.
- Rathmann, R.; Szklo, A. und Schaeffer, R. (2010): Land use competition for production of food and liquid biofuels. An analysis of the arguments in the current debate. *Renewable Energy*, 35 (1): 14–22.
- Redl, S.; Diender, M.; Jensen, T.; Sousa, D. und Nielsen, A. (2017): Exploiting the potential of gas fermentation. *Industrial Crops and Products*, 106: 21–30.
- Saxena, J. und Tanner, R. S. (2011): Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanogenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (4): 513–521.
- SBIR STTR (2017): <https://www.sbir.gov/sbirsearch/detail/1204407>. Aufgerufen am 19.12.2017.
- Schiel-Bengelsdorf, B. und Dürre, P. (2012): Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters*, 586 (15): 2191–2198.
- Schuchmann, K. und Müller, V. (2014): Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 12 (12): 809–821.
- Schulze, E. und Martini, F. (2018): <http://corporate.evonik.de/de/presse/pressemitteilungen/Pages/news-details.aspx?newsid=72462>. Aufgerufen am 15.4.2018.
- Seedorf, H.; Fricke, F.; Veith, B.; Brüggemann, H.; Liesegang, H.; Strittmatter, A.; Miethke, M.; Buckel, W.; Hinderberger, J.; Li, F.; Hagemeyer, C.; Thauer, R. und Gottschalk, G. (2008): The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (6): 2128–2133.

- Shen, Y.; Brown, R. und Wen, Z. (2014a): Enhancing mass transfer and ethanol production in syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 through a monolithic biofilm reactor. *Applied Energy*, 136: 68–76.
- Shen, Y.; Brown, R. und Wen, Z. (2014b): Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. *Biochemical Engineering Journal*, 85: 21–29.
- Shen, Y.; Brown, R. C. und Wen, Z. (2017): Syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* P7 in a horizontal rotating packed bed biofilm reactor with enhanced ethanol production. *Applied Energy*, 187: 585–594.
- Sikkema, J.; de Bont, J. A. M. und Poolman, B. (1995): Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59 (2): 201–222.
- Sim, J.; Kamaruddin, A.; Long, W. und Najafpour, G. (2007): *Clostridium aceticum* - A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (5): 1234–1243.
- Speers, A.; Cologgi, D. und Reguera, G. (2009): Anaerobic cell culture. *Current protocols in Microbiology*, 12:4F: A.4F.1–A.4F.16.
- Storhas, W. (1994): Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender. Vieweg. Braunschweig. 377 S.
- Tanner, R.; Miller, L. und Yang, D. (1993): *Clostridium ljungdahlii* sp nov, an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 232–236.
- Tirado-Acevedo, O.; Chinn, M. S. und Grunden, A. M. (2010): Production of Biofuels from Synthesis Gas Using Microbial Catalysts. In: Elsevier: 57–92.
- Ukpong, M. N.; Atiyeh, H. K.; Lorme, M. J.M. de; Liu, K.; Zhu, X.; Tanner, R. S.; Wilkins, M. R. und Stevenson, B. S. (2012): Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (11): 2720–2728.
- Vega, J. L.; Prieto, S.; Elmore, B. B.; Clausen, E. C. und Gaddy, J. L. (1989): The Biological production of ethanol from synthesis gas. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20-21 (1): 781–797.

- Vollherbst-Schneck, K.; Sands, J. A. und Montenecourt, B. S. (1984): Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (1): 193–194.
- Wan, N.; Sathish, A.; Le Y.; Tang, Y. J. und Wen, Z. (2017): Deciphering Clostridium metabolism and its responses to bioreactor mass transfer during syngas fermentation. *Scientific Reports*, 7 (1): 10090.
- Wilkins, M. R. und Atiyeh, H. K. (2011): Microbial production of ethanol from carbon monoxide. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (3): 326–330.
- Wood, H.; Ragsdale, S. und Pezacka, E. (1986): The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 39 (4): 345–362.
- Woods, D.R. (1995): The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in Biotechnology*, 13 (7): 259–264.
- Worden, R. M.; Grethlein, A. J.; Jain, M. K. und Datta, R. (1991): Production of butanol and ethanol from synthesis gas via fermentation. *Fuel*, 70 (5): 615–619.
- Zhang, J.; Taylor, S. und Wang, Y. (2016): Effects of end products on fermentation profiles in *Clostridium carboxidivorans* P7 for syngas fermentation. *Bioresource Technology*, 218: 1055–1063.
- Zlokarnik, M. (1999): Rührtechnik. Theorie und Praxis. Springer. Berlin. 339 S.

9 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Tabelle 9.1: Abkürzungs- und Symbolverzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Größen und Bezeichnungen.

Abkürzung/Symbol	Bezeichnung/Definition
abs	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
BuOH	Butanol
BTM	Biotrockenmasse
<i>C. carboxidivorans</i>	<i>Clostridium carboxidivorans</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoA	Coenzym A
CoFeS-P	Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
c _{ss}	Gleichgewichtskonzentration, g L ⁻¹
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (engl: <i>continuous stirred-tank reactor</i>)
c _x	Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
c _{x, max}	maximale Biotrockenmassekonzentration, g L ⁻¹
C2-Produkt	Produkt mit 2 Kohlenstoffatomen (Acetat, Ethanol)
C4-Produkt	Produkt mit 4 Kohlenstoffatomen (Butyrat, Butanol)
C6-Produkt	Produkt mit 6 Kohlenstoffatomen (Hexanoat, Hexanol)
D	Verdünnungsrate, h ⁻¹
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Ech	energiekonservierende Hydrogenase
EtOH	Ethanol
e ⁻	Elektron
Fd/Fd ²⁻	Ferredoxin
F _{Gas}	eingetragener Gasvolumenstrom, L h ⁻¹
F _{Abgas}	ausgetragener Gasvolumenstrom, L h ⁻¹
ΔG ⁰	freie Enthalpie, kJ mol ⁻¹
[H]	Reduktionsäquivalent
He	Henry'scher Verteilungskoeffizient, mol L ⁻¹ bar ⁻¹

Abkürzung/Symbol	Bezeichnung/Definition
HEPA	Sterilfilter (engl.: <i>high efficiency particulate arrestance filter</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HxOH	Hexanol
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MESNA	2 Mercaptoethansulfonat-Natrium
MFC	Massendurchflussregler
MFM	Massendurchflussmesser
MTR	Massentransferrate, g L ⁻¹ h ⁻¹
μ	spezifische Wachstumsrate, h ⁻¹
μGC	Mikro-Gaschromatograph
NAD ⁺ /NADH	Nikotinadenindinukleotid
n	Drehzahl, rpm
N ₂	Stickstoff
OD	optische Dichte bei 600 nm, -
PBS	Phosphatpuffer (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
P	Druck, bar
P _i	Monophosphat
P _{ini}	initialer Druck, bar
p _{CO}	Kohlenstoffmonoxidpartialdruck am Ausgang, bar
p _{CO₂}	Kohlenstoffdioxidpartialdruck am Ausgang, bar
p _{CO,in}	Eingangs-Kohlenstoffmonoxidpartialdruck, bar
p _{CO₂,in}	Eingangs-Kohlenstoffdioxidpartialdruck, bar
pH	Maß für sauren oder basischen Charakter (<i>pondus hydrogenii</i>), -
pH ₀	initialer pH, -
p _{H₂}	Wasserstoffpartialdruck, bar
pK _s	Säurekonstante, -
PPG	Polypropylenglykol
Q _P	volumetrische Produktbildungsrate, g L ⁻¹ d ⁻¹
q _P	zellspezifische Produktbildungsrate, g g ⁻¹ d ⁻¹
r _{CO}	volumetrische Kohlenstoffmonoxidaufnahmerate, mmol L ⁻¹ h ⁻¹
r _{CO₂}	volumetrische Kohlenstoffdioxidaufnahmerate, mmol L ⁻¹ h ⁻¹
r _{Gas}	volumetrische Gasaufnahmerate, mmol L ⁻¹ h ⁻¹
RI	Brechungsindex

Abkürzung/Symbol	Bezeichnung/Definition
Rnf	Ferredoxin:NAD ⁺ Oxidoreduktase
rpm	Rührerdrehzahl (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, g L ⁻¹ d ⁻¹
R1	Reaktor 1
R2	Reaktor 2
SLP	Substratkettenphosphorylierung
STR	Rührkesselreaktor (engl.: <i>stirred-tank reactor</i>)
T	Temperatur, °C
UniProt	Universal Protein Database
THF	Tetrahydrofolat
τ	mittlere hydraulische Verweilzeit, h
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
YE	Hefeextrakt
$Y_{\text{EtOH}/X}$	spezifische Ethanolausbeute, g g ⁻¹
$Y_{\text{BuOH}/X}$	spezifische Butanolausbeute, g g ⁻¹
$Y_{\text{HxOH}/X}$	spezifische Hexanolausbeute, g g ⁻¹

10 Anhang

10.1 Untersuchungen zur erhöhten Fe^{2+} -Konzentration in der Rührkesselkaskade

Nachdem sich eine Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration in Satzprozessen positiv auf die Alkoholbildung auswirkte, wurden Rührkesselkaskadenprozesse mit Zulaufmedium durchgeführt, bei dem die Fe^{2+} -Konzentration verzehnfacht wurde.

In einem ersten Ansatz konnten bei Verdünnungsraten von $D_{R1} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_{R2} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ die Alkoholkonzentrationen im Gleichgewicht auf $6,53 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol, $1,01 \text{ g L}^{-1}$ Butanol und $0,15 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol bei einer Biotrockenmassekonzentration von $1,83 \text{ g L}^{-1}$ im zweiten Reaktor gesteigert werden. Reproduktionsprozesse unter identischen Versuchsbedingungen waren jedoch problematisch. Direkt nach Inokulation wuchsen die Zellen in der Satzphase zunächst wie gewohnt an, jedoch verdunkelte sich das Reaktormedium im ersten Reaktor rasch gräulich bis schwärzlich. Durch kontinuierlichen Eintrag in den zweiten Reaktor verfärbte sich dieser ebenfalls. Nach einer Prozesszeit von 1,0 d waren die Verfärbungen verschwunden bei leicht erniedrigter Biomassebildung ($1,46 \text{ g L}^{-1}$) aber deutlich verringerter Alkoholbildung ($3,9 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol, $0,06 \text{ g L}^{-1}$ Butanol und $0,07 \text{ g L}^{-1}$ Hexanol im Gleichgewicht im zweiten Reaktor; gegenüber dem ersten Reaktor kaum erhöht). Es wird davon ausgegangen, dass die Bakterien unter den vorherrschenden reduzierenden Bedingungen das ihnen zur Verfügung stehende Sulfat zu Schwefelwasserstoff H_2S umgesetzt haben und dieses anschließend mit der erhöhten Konzentration an Fe^{2+} zu Eisensulfat FeSO_4 abreagierte, welches bei Überschreiten der Löslichkeitsgrenze zum Ausfall des schwarzen Niederschlags führte.

Zum Teil konnten die Redoxpotentiale online aufgezeichnet werden. Für eine Kaskade ohne Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration lag dieses bei in etwa -500 mV (R1). Bei der ersten erfolgreichen Kaskade mit Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration fiel das Redoxpotential auf -480 mV (R1) ab und stieg wiederum an, bei der Kaskade mit erhöhter Fe^{2+} -Konzentration und Verfärbung des Reaktormediums lag deutlich darunter mit einem gemessenen Redoxpotential von -600 mV (R1), was diese Hypothese unterstützt (Daten nicht gezeigt). Das zusätzliche Fe^{2+} stand den Zellen dann nicht mehr zur Verfügung.

Daher wurde ein einem weiteren Kaskadenprozess das Satzmedium ohne eine Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration in den beiden Reaktoren vorgelegt, um eine langsame Adaption an höhere Fe^{2+} -Konzentrationen erst über den kontinuierlichen Einstrom von

Zulaufmedium mit erhöhter Fe^{2+} -Konzentration zu gewährleisten, obwohl die erste durchgeführte Rührkesselkaskade mit erhöhter Fe^{2+} -Konzentration hiermit keine Probleme aufwies. Es trat zwar keine starke Dunkelfärbung des Reaktormediums mehr auf, jedoch resultierte dies auch nicht in einer gesteigerten Alkoholbildung gegenüber eines Kaskadenprozesses ohne Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration.

10.2 Untersuchungen zu Verdunstung

Es wurden Untersuchungen mit einer Mischung aus vorgelegten Alkoholkonzentrationen aus Ethanol, Butanol und Hexanol durchgeführt, um festzustellen, ob die diese in Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* über die Zeit hinweg zu Verdunstung neigen. Dabei war zu beobachten, dass vorgelegte Alkoholkonzentrationen über lange Zeiträume hinweg tatsächlich abnahmen und daher von Verdunstungseffekten bei der Kultivierung mit *C. carboxidivorans* ausgegangen werden muss (Abbildung 10.1).

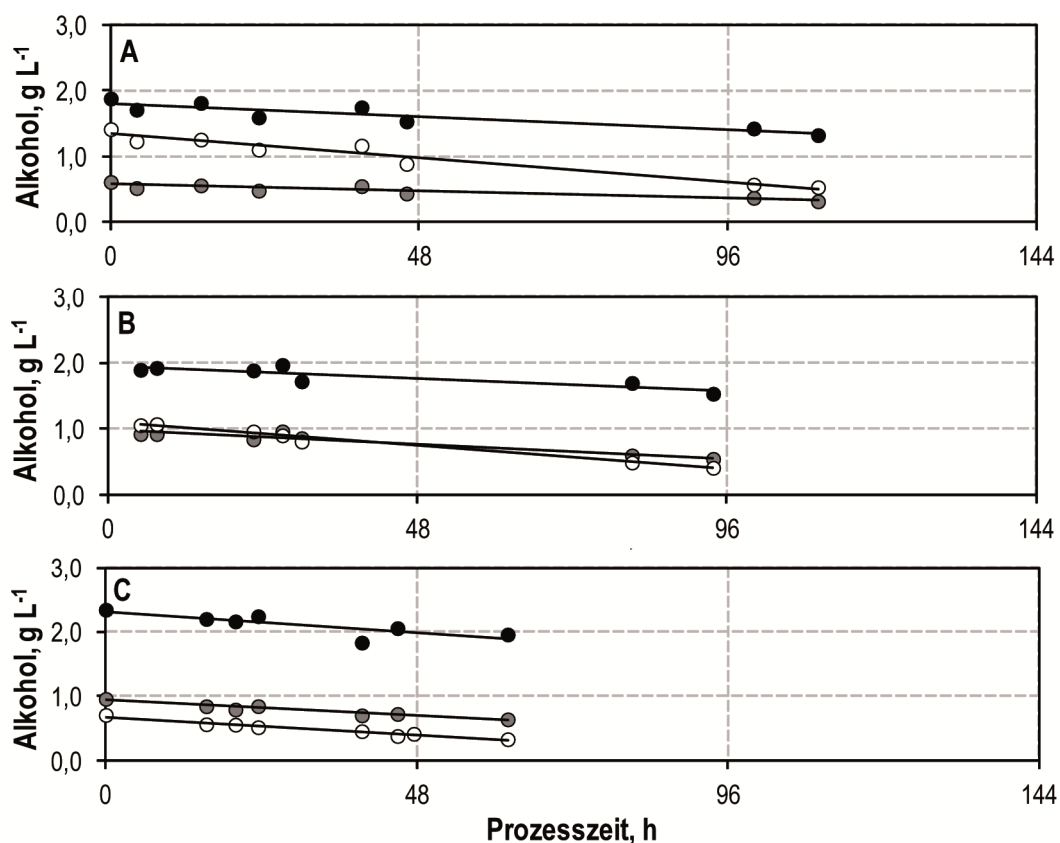


Abbildung 10.1: Konzentrationsverläufe der vorgelegten Alkohole Ethanol (schwarz), Butanol (grau) und Hexanol (weiß) im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor unter Prozessbedingungen ($15,1 \text{ W L}^{-1}$; 1 L Medium ; $37 \text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$; $\text{CO}:\text{CO}_2 = 80:20$) mit unterschiedlich vorgelegten Konzentrationen an Alkoholen A) – C). Abgaskühlung mit Umlaufkühler auf $2 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Untersuchung der Verdunstung über die Zeit. Dargestellte Linien stellen Trendlinien dar.

Eine Bestimmung der Verdunstungsraten der einzelnen Alkohole zur Bestimmung der Verluste ist dabei jedoch stets abhängig von den jeweiligen Alkoholkonzentration in Abhängigkeit der anderen Alkoholkonzentrationen und wurde deswegen nicht durchgeführt. Die tatsächlichen Verluste sind dabei gering, da die Kohlenstoffbilanzen beispielsweise im Referenzsatzprozess zu 89 % geschlossen werden konnten.

10.3 Medienzusätze und Puffer

Tabelle 10.1: Zusammensetzung des PBS-Puffers. Sofern anaerobes PBS benötigt wurde, wurden die Bestandteile nach dem Einwiegen mit anaerobem VE-Wasser in der Anaerobwerkbank aufgefüllt.

Komponente	Konzentration	Einheit
Na ₂ HPO ₄	1,44	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,20	g L ⁻¹
KCl	0,20	g L ⁻¹
NaCl	8,00	g L ⁻¹

Tabelle 10.2: Zusammensetzung der Mineralienstammlösung (33,3x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
NH ₄ Cl	100	g L ⁻¹
NaCl	80	g L ⁻¹
KCl	10	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	10	g L ⁻¹

Tabelle 10.3: Zusammensetzung der Magnesiumlösung (16,65x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20,47	g L ⁻¹

Tabelle 10.4: Zusammensetzung der Calciumlösung (16,65x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,65	g L ⁻¹

Tabelle 10.5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100x) für das Hurst-Medium. Zunächst wurde die Nitroliotriessigsäure gelöst und der pH mit KOH auf 6,0 eingestellt, bevor die restlichen Bestandteile eingewogen und gelöst wurden.

Komponente	Konzentration	Einheit
Nitroliotriessigsäure	2,00	g L ⁻¹
MnSO ₄ · H ₂ O	1,12	g L ⁻¹
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	1,10	g L ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,37	g L ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,36	g L ⁻¹
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	25,0	mg L ⁻¹
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	37,0	mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	23,0	mg L ⁻¹
Na ₂ SeO ₄	20,0	mg L ⁻¹
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	22,0	mg L ⁻¹

Tabelle 10.6: Zusammensetzung der Vitaminlösung (100x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
Pyridoxin-HCl	12,0	mg L ⁻¹
Thiamin-HCl	6,00	mg L ⁻¹
Riboflavin	5,00	mg L ⁻¹
D-Ca-Pantothenat	5,00	mg L ⁻¹
Liponsäure	5,00	mg L ⁻¹
p-Aminobenzoesäure	5,00	mg L ⁻¹
Nicotininsäure	5,00	mg L ⁻¹
Vitamin B12	5,00	mg L ⁻¹
D-Biotin	2,00	mg L ⁻¹
Folsäure	2,00	mg L ⁻¹
MESNA (2 Mercapto-ethansulfonat-Natrium)	23,0	mg L ⁻¹

Tabelle 10.7: Zusammensetzung der Cystein-HCl Stammlösung (100x).

Komponente	Konzentration	Einheit
Cystein-HCl	40	g L ⁻¹

Tabelle 10.8: Zusammensetzung der Glucose-Stammlösung (50x).

Komponente	Konzentration	Einheit
Glucose · H ₂ O	275	g L ⁻¹

10.4 Verwendete Chemikalien und Materialien

Tabelle 10.9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Artikel-Nr.
p-Aminobenzoesäure	C ₇ H ₇ NO ₂	Merck KgaA	822312
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Carl Roth GmbH	5470.2
Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat	NH ₄ FeSO ₄ · 6 H ₂ O	Merck KgaA	103792
Bacto™ Yeast Extract	-	Becton Dickinson and Company	212750
D(+)-Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	Carl Roth GmbH	3822.2
1-Butanol	C ₄ H ₉ OH	Carl Roth GmbH	7171
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck KgaA	102382
Calcium-D(+)-Pantothenat	C ₁₆ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Carl Roth GmbH	3812.1
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	Carl Roth GmbH	5054.1
Folsäure	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	Carl Roth GmbH	T 912.1
D(+)-Glucose-Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	Carl Roth GmbH	6887.5
1-Hexanol	C ₆ H ₁₃ OH	Carl Roth GmbH	3847.1
Hexansäure	C ₆ H ₁₁ O ₂	Carl Roth GmbH	8799.1
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH	6781.2
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH	3904.1
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	CoCl ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth GmbH	7095.1
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	CuCl ₂ ·2H ₂ O	Merck KgaA	102733
L-Cystein-Hydrochlorid	C ₃ H ₇ NO ₂ ·HCl	Carl Roth GmbH	3468.1
Liponsäure	C ₈ H ₁₄ O ₂	Carl Roth GmbH	6229.1
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Carl Roth GmbH	T888.3
Mangan(II)-sulfat Monohydrat	MnSO ₄ · H ₂ O	Merck KgaA	105941

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Artikel-Nr.
2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MESNA)	$C_2H_5NaO_3S_2$	Merck KgaA	810595
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	$C_6H_{13}NO_4S$	Carl Roth GmbH	7033.2
Natriumacetat-Trihydrat	$C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$	Carl Roth GmbH	6779.2
Natriumbutytrat	$C_4H_7NaO_2$	Merck KgaA	817500
Natriumchlorid	NaCl	Labochem International	LC-5932.3
Natriumformiat	$CHNaO_2$	Sigma-Aldrich	715391
di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck KgaA	106586
Natriummolybdat Dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Merck KgaA	106521
Natriumselenat	Na_2O_4Se	Sigma-Aldrich	S8295-10G
Natriumsulfid Nonahydrat	$Na_2S \cdot 9H_2O$	Sigma-Aldrich	208043
Natriumwolframat Dihydrat	$Na_2O_4W \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich	1324421
Natriumhydroxid	NaOH	neo-Froxx	LC-7334.5
Nickelchlorid Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck KgaA	106717
Nicotinsäure	$C_6H_5NO_2$	Merck KgaA	818714
Nitrilotriessigsäure	$C_5H_9NO_6$	Merck KgaA	108416
Poly(propylenglycol) (PPG)	-	Sigma Aldrich	202339
Pyridoxin Hydrochlorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Carl Roth GmbH	T914.2
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	R4500
Thiamin Hydrochlorid	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	Sigma-Aldrich	T4625
Vitamin B ₁₂	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Carl Roth GmbH	T915.1
Wilkins Chalgren anaerobe broth	-	Oxoid	CM0643
Zinksulfat Heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck KGaA	108883

Tabelle 10.10: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Gase.

Gas	Artikelnummer	Lieferant
Stickstoff 5.0, 50 L, 200 bar	P1709L50R2R001	Air Liquide
Kohlenstoffmonoxid N37	P0752L40R2A001	Air Liquide
Kohlenstoffdioxid 4.5, 50 L, 37,5 kg	P0760L50R0A001	Air Liquide
Wasserstoff 5.0, 50 L, 300 bar	P1713L50R3A001	Air Liquide
Formiergas (ARCAL F5), 50 L, 200 bar	I2513L50R2A001	Air Liquide

Tabelle 10.11: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Materialien.

Material	Typ	Hersteller
Abluftfilter	Acro 50, 0,2 µm, PTFE	Pall Corporation
Butylgummistopfen	für GL45	Glasgerätebau Ochs
Einwegkanülen	0,6 x 30 mm, 0,9 x 70 mm, 0,8 x 120 mm	B. Braun Melsungen
Einwegküvetten	Ratiolab Küvetten, Halbmikro	Ratiolab
Einwegspritzen	1, 2, 3, 5, 10, 20, 50 mL	B. Braun Melsungen, Becton Dickinson
Hungate Kulturröhrchen	16 x 125 mm, mit Butylgummiseptum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
HPLC-Rollrandfläschchen	ND11 mit Aluminiumbödelkappe und Septum; 1,5 mL	VWR
Laborglasflaschen	250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L; Duran protect mit Gewinde GL45, PU- beschichtet	Sigma Aldrich
Lochkappen für Laborglasflaschen	für Gewinde GL45	Glasgerätebau Ochs
Pipettenspitzen	200 µL, 1000 µL, 10 mL	Gilson, Brand
Schnellverschluss- kupplungen und Einstecktüllen	Messing vernickelt; NW 5, LW 4 – 6	Riegler Co KG
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Spritzenvorsatzfilter, steril	Porengröße 0,2 µm,	VWR
Zentrifugenröhrchen	15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One
Zuluftfilter	Acro 50, 0,2 µm, Emflon II	Pall Corporation

10.5 Verwendete Geräte

Tabelle 10.12: Allgemeine Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Explorer E121245 (0,1 mg – 210 g)	Ohaus
Analysewaage	Explorer E1N213 (5 g – 32 kg)	Ohaus
Analysewaage	Scout Pro 4000 g	Ohaus
Autoklav	H + P 500 EC-Z	H + P Labortechnik
Autoklav	Systemc VX-150	Systemc
CO-Sensor	ToxiRAE 3 CO 2000	RAE Systems
Gasleckdetektor	GLD 100	COY Laboratory Products Inc.
Heizpilz	Wise Therm WHM 12015	witeg
Heizpilz	U2/2000 2L	Heraeus Wittmann
Magnetrührer	Variomag 90750	2mag AG
Magnetrührer	D-6010	neolab
Magnetrührer	Variomag	H + P Labortechnik
pH-Elektrode	BlueLine 14pH	Schott
pH-Elektrode	HI 1330 B	HANNA-Instruments
pH-Meter	Lab 850	Schott
mobiles pH-Meter	PCE-PHD2	PCE Group
Schüttelinkubator	AJ 119	Infors
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich
Tischzentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich
Trockenschrank	Serie E 28 L	Binder
Pipetten	Transferpette S	Brand
Photometer	Spectronic Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
Vortexer	Reax top	Heidolph
Vortexer	7-2020	neolab
Schlauchpumpe	501U	Watson Marlow
Schwingmühle	Retsch MM200	Retsch

Tabelle 10.13: Rührkesselreaktor Labfors 4 mit Peripherie.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gasmischstation	WMR 4000	Westphal Mess- & Regeltechnik
Massendurchflussmesser	F-101D-RAD-33-V	Ohaus
Laborrührkesselreaktor	Labfors 4	Infors HT
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler-Toledo
Redoxelektrode	Pi 4805-SC-DPAS-K8S/120	Mettler-Toledo
Schlauchpumpe	Reglo Digital MS-4/12	Cole Parmer
Software Reaktorsteuerung	Iris V5.3	Infors HT
Software MFM	Flow Plot V 3.28	Bronkhorst

Tabelle 10.14: Rührkesselreaktor KLF2000 mit Peripherie.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gasmischstation mit Massendurchflussreglern (MFC)	P-702CV-6K0R-RAD-33-V	Bronkhorst
Massendurchflussmesser (MFM)	F-101D-RAD-33-V	Bronkhorst
Laborrührkesselreaktor	KLF2000, 2,4 L	Bioengineering
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler-Toledo
Redox-Elektrode	Pi 4805-SC-DPAS-K8S/120	Mettler-Toledo
Software Reaktorsteuerung	BiOSCADA lab	Bioengineering
Software MFM	Flow Plot V 3.28	Bronkhorst

Tabelle 10.15: verwendete μ -Gaschromatographieeinheiten.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
μ GC	μ 490	Agilent Technologies
μ GC	CP-4900	Varian
Trennsäule	1 m COX HI BF	Agilent Technologies
Software	Open Lab CDS EZ Chrom	Agilent Technologies

Tabelle 10.16: verwendetes Hochleistungschromatographie (HPLC)-System.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autosampler	HPLC Autosampler Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Pumpe	HPLC Pumpe Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
RI-Detektor	HPLC RI Detektor	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Säulenofen	Jet Stream 5 – 85 °C	Knauer
Trennsäule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio-Rad
Software	Agilent EZChrom Elite	Agilent Technologies

Tabelle 10.17: Anaerobwerkbank mit Einzelgeräten.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
flexible Anaerobkammer aus Polyvinylchlorid	Typ A mit 2 Schleuskammern	Coy Laboratory Products, Toepffer GmbH
HEPA Filter	Scout Pro 4000 g	Coy Laboratory Products
Gas Analyzer	für H ₂ und O ₂	Coy Laboratory Products
Lüftergehäuse mit Trockenmittel und Palladiumkatalysatoren	StakPak	Coy Laboratory Products
Vakuumpumpe	G608NGX	Coy Laboratory Products
Trockenschrank	UNB100	Memmert