

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen von
Clostridium acetobutylicum Stämmen zur
Butanolgärung in Rührkesselreaktoren**

Michael Schmidt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Die Dissertation wurde am 17.10.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 01.03.2013
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
2. Problemstellung und Zielsetzung.....	3
3. Theoretische Grundlagen	5
3.1 Butanol	5
3.1.1 Stoffeigenschaften.....	5
3.1.2 Verwendung von Butanol.....	7
3.2 Herstellung von Butanol	8
3.2.1 Petrochemische Herstellung von Butanol	8
3.2.2 Biotechnologische Herstellung, Stämme und Geschichte	10
3.3 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824.....	11
3.3.1 Allgemeines.....	11
3.3.2 Stoffwechsel	13
3.3.3 Toxizität von Sauerstoff	18
3.3.4 Lösemitteltoxizität	19
3.3.5 Theoretische Betrachtungen zum Stoffwechsel von <i>Clostridium acetobutylicum</i> ..	20
3.3.6 <i>Metabolic Engineering</i>	21
3.4 Ansätze mit anderen Mikroorganismen	25
3.5 Substrate für die ABE Fermentation.....	25
3.6 Prozessführung und <i>in-situ</i> Produktabtrennung bei ABE Fermentationen	26
3.7 Parallele Kultivierungstechniken	32
4. Material und Methoden.....	35
4.1 Rekombinante Stämme.....	35
4.2 Medien.....	36
4.3 Kultivierung von <i>Clostridium acetobutylicum</i>	38
4.3.1 Stammhaltung und Aktivierung von <i>Clostridium acetobutylicum</i>	38

4.3.2 Kultivierung in anaeroben Septumflaschen.....	39
4.3.3 Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab	40
4.3.4 Parallele Satzkultivierungen in Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab.....	48
4.3.5 Leistungseintrag in Rührkesselreaktoren.....	51
4.4 Analysemethoden	52
4.4.1 Bestimmung der Zellkonzentration	52
4.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	53
4.4.3 Bestimmung der Zusammensetzung des Abgases	54
4.4.4 Bestimmung der Ammoniumkonzentration	55
4.4.5 Bestimmung der Verdunstungsraten.....	55
5. Referenzprozess zur ABE Herstellung mit <i>Clostridium acetobutylicum</i>	56
5.1 Reproduzierbarkeit.....	56
5.2 Kohlenstoffbilanz.....	62
6. Maßstabsverkleinerung der ABE Herstellung mit <i>Clostridium acetobutylicum</i>	64
6.1 Anaerobe Septumflaschen.....	64
6.2 Anaerobe Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab	65
6.2.1 Maßstabsübertragung des Referenzprozesses	65
6.2.2 Reproduzierbarkeit der ABE Fermentation	69
6.2.3 Sterilität und Kreuzkontamination im Parallelbioreaktorblock.....	70
7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	71
7.1 Deletionsstämme	71
7.1.1 Deletionsmutante <i>Clostridium acetobutylicum</i> hbd::int.....	71
7.1.2 Deletionsmutante <i>Clostridium acetobutylicum</i> adhE::int.....	74
7.1.3 Deletionsmutante <i>Clostridium acetobutylicum</i> adc::int	77
7.1.4 Deletionsmutante <i>Clostridium acetobutylicum</i> pta::int.....	80
7.1.5 Doppeldeletion: <i>Clostridium acetobutylicum</i> adc::int Δ RAM-pta::int	83
7.1.6 Doppeldeletion: <i>Clostridium acetobutylicum</i> pta::int Δ RAM-adc::int	85

7.1.7 Doppeldeletion: <i>Clostridium acetobutylicum</i> pta::int Δ RAM-cffA::int.....	88
7.2 Überexpressionsstämme	91
7.2.1 Überexpressionsstamm <i>Clostridium acetobutylicum</i> ÜE-pT::bcd.....	91
7.2.2 Überexpressionsstamm <i>Clostridium acetobutylicum</i> ÜE-pT::crt.....	94
7.3 Zusammenfassung und Diskussion.....	96
8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen.....	97
8.1 Anfangs-pH.....	97
8.2 Ammonium.....	100
8.3 Zusätzliche Spurenelemente und Ergänzungsstoffe	102
8.4 Validierung der Zinksulfatzugabe im Liter-Maßstab.....	107
8.4.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	107
8.4.2 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ÜE-pT::bcd.....	109
8.4.3 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ÜE-pT::crt.....	110
8.5 Zusammenfassung und Diskussion.....	112
8.6 Vergleichende Butanolproduktion im Liter-Maßstab	113
9. Zusammenfassung und Ausblick	116
10. Literaturverzeichnis	121
11. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	135
12. Anhang.....	138
12.1. Compact GC	138
12.1.1 Einstellungen.....	138
12.1.2 Kalibrierung	138
12.2 Geräte.....	140
12.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Gase	143

Danksagung

Diese Dissertation entstand aus den Ergebnissen meiner experimentellen Forschungsarbeiten als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Viele Menschen haben auf unterschiedliche Weise dazu beigetragen.

Deshalb möchte ich mich bei den folgenden Personen bedanken:

Bei Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, die fruchtbaren Diskussionen und Ratschläge und dem mir entgegengebrachten Vertrauen, das mir die Spielräume bei der Verwirklichung des Projektes eigeräumt hat.

Beim Prüfungsvorsitzenden Professor Dr.-Ing. Andreas Kremling und dem Zweitprüfer Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen für die Übernahme der jeweiligen Aufgaben.

Bei Irma Einsle, Ellen Truxius, Markus Amann, Norbert Werth, Susanne Kuchenbaur und Georg Kojro für die tatkräftige Unterstützung bei den alltäglichen Problemen und Wehwehchen.

Bei Herrn Dr. Georg Schirmmacher, Clariant AG für die Koordination dieses vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungsvorhabens. Bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und Clariant für die finanzielle Unterstützung.

Bei Frau Dr. Lütke-Eversloh, Dörte Lehmann, Miriam Mann, Michael Scheel (Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock) für die Tipps zur Kultivierung anaerober Mikroorganismen, die Bereitstellung der rekombinanten Stämme und die Unterstützung bei vielen Fragen, die während des Projektes auftraten.

Bei Andreas Kossmann, Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Technische Universität München für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft über thermodynamische Fragen. Bei allen (ehemaligen) Kollegen für die jederzeit gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.

Bei Dr. Kathrin Castiglione, Harald Krispin und Michael Weiner für das gründliche Korrekturlesen und die guten Verbesserungsvorschläge.

Bei meinen Studenten Sarah, Fan, Stefan, Sabrina, Tom, Patrick und Samy für die gute Mitarbeit.

Bei den Personen unserer Kaffee-Runde und Mensa-Mittags-Runde für die lustigen, geistreichen und inspirierenden Diskussionen.

Bei meinen Eltern und meiner Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat und natürlich bei meiner Frau Andrea, die mir in den wichtigen Zeiten den Rücken freigehalten hat.

Ich danke Ihnen/Euch!

1. Einleitung

Der Energiebedarf der Menschheit steigt stetig. Gleichzeitig werden fossile Ressourcen immer knapper. Obwohl die Förderung von Rohöl auf eine ökologisch sehr riskante Art und Weise auf immer weitere Vorkommen und Gebiete ausgeweitet wird, sind auf lange Sicht Alternativen zu fossilen Energieträgern unabdingbar. Bereits jetzt werden in vielen Ländern diverse Kraftstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen eingesetzt (Demain, 2009).

Bisher sind allerdings hauptsächlich Biokraftstoffe der ersten Generation, zum Beispiel Pflanzenöle oder mikrobiell hergestellter Bioethanol aus Zuckerrohr, Mais oder Zuckerrüben, auf dem Weltmarkt vertreten und in Anwendung (Bukold, 2009). Da diese auf Lebensmittelbasis hergestellt werden, bleibt eine ethische Diskussion über den damit verbundenen Anstieg der Lebensmittelpreise auf dem Weltmarkt nicht aus.

Biokraftstoffe der zweiten Generation, also Kraftstoffe die nicht aus Lebensmitteln gewonnen werden, umgehen diese Problematik. Hierzu gibt es Produktionsansätze, wie zum Beispiel das „Biomass to Liquid“-Verfahren¹, bei dem aus Biomasse Synthesegas gewonnen und anschließend aus diesem über ein chemisches Verfahren synthetischer Dieselmotorkraftstoff hergestellt wird. Hierbei sind allerdings hohe Drücke und Temperaturen notwendig, die das Verfahren bisher nicht rentabel machen. Eine weitere Möglichkeit bieten mikrobielle Produktionsverfahren. So sind für die Herstellung von Bioethanol aus Cellulose schon einige Pilotanlagen in Betrieb (Demain, 2009). Die Verwertung von Lignocellulose stellt aufgrund dessen Struktur (Quervernetzung und die Verwertbarkeit von C₅-Zuckern von Ethanolbildnern) zusätzliche Herausforderungen dar. Hierzu existieren erst einige wenige Pilotanlagen. Dieser Ansatz ist sehr interessant, da auch Abfallstoffe aus der Landwirtschaft oder der Holzverarbeitenden Industrie für die Produktion genutzt werden könnten und nicht unbedingt zusätzliche Anbauflächen für die Rohstoffe benötigt werden. Bisher war der Focus hauptsächlich auf Ethanol als Biokraftstoff gerichtet. Aufgrund der schlechten Lager- und Transportfähigkeit, sowie der niedrigen Energiedichte im Vergleich zu Benzin, sind die Stoffeigenschaften von Ethanol nicht optimal.

¹ (<http://www.bioliq.de/55.php>; KIT; aufgerufen am 29.08.2012)

Butanol kann diese Anforderungen abdecken und ist deshalb ein weiterer vielversprechender Biokraftstoffkandidat. Die anaerobe Gärung einer zuckerhaltigen Lösung mit bestimmten Clostridien, die sogenannte Aceton-Butanol-Ethanol Fermentation (ABE Fermentation), ist seit 1916 bekannt und wurde bis Ende des zweiten Weltkrieges kommerziell betrieben (Jones & Woods, 1986). Jedoch wurde sie seither aus kommerziellen Gründen kaum noch industriell genutzt. Im Zeitalter steigender Rohölpreise und mit der Möglichkeit Produktionsstämme zu designen, die in der Lage sind Lignocellulose zu verstoffwechseln mit der anschließenden Optimierung von Stoffwechselwegen („*metabolic engineering*“) steigt das Interesse an dieser Technologie wieder. Der 2009 erfolgte Einstieg von DuPont und British Petrol in die Forschung zum Thema mikrobielle Butanolproduktion ist ein guter Hinweis darauf². Das erklärte Ziel dieses Joint Ventures ist das Ersetzen von Ethanol durch Butanol als Biokraftstoff.

² (<http://www.butamax.com/>; Joint Venture: DuPont und British Petrol; aufgerufen am 19.09.2012)

2. Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl Butanol als Biokraftstoff bessere Stoffeigenschaften als Ethanol besitzt, gibt es bislang in der westlichen Welt noch keine Pilotanlagen oder gar Produktionsanlagen für die mikrobielle Butanolproduktion aus Lignocellulose. Mit den bisher entwickelten Produktionsstämmen lassen sich nur niedrige Butanolkonzentrationen und Produktionsraten erreichen. Die Hauptgründe hierfür sind neben der Inhibierung der Mikroorganismen mit zunehmenden Butanolkonzentrationen, die niedrige Produktivität der eingesetzten Stämme und die große Anzahl an Nebenprodukten, die bei einer Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation mit Clostridien anfallen. In Verbindung mit hohen Rohstoff- und Personalkosten war bislang keine ökonomisch sinnvolle Umsetzung des Prozesses möglich. Lediglich in Südafrika, China und Russland (Zverlov *et al.*, 2006) wurden ABE Fermentation aufgrund der dort niedrigen Rohstoff- und Personalkosten auch nach dem zweiten Weltkrieg noch industriell durchgeführt.

Neben den hohen Rohstoffkosten war das Fehlen molekularbiologischer Werkzeuge zur gezielten Veränderung des Stoffwechsels (*„metabolic engineering“*) von Clostridien bis vor einigen Jahren ein weiteres Problem (Lee *et al.*, 2008). Dies hat sich mittlerweile geändert. Beispielsweise wurde 2007 von Heap *et al.* ein effizientes Deletionssystem für den strikt anaeroben ABE Produzenten *Clostridium acetobutylicum* beschrieben.

Zur vergleichenden Charakterisierung der Stoffwechseleigenschaften von rekombinanten Clostridien wurden bisher überwiegend anaerobe Septumflaschen im Parallelansatz eingesetzt. Hierbei handelt es sich um unkontrollierte Satzprozesse ohne Homogenisierung der Flüssigphase. In der Regel sind lediglich Endpunktbestimmungen möglich, um die erzielten Produktkonzentrationen bestimmen zu können. Die Reaktionsbedingungen in anaeroben Septumflaschen zeigen allerdings nur wenig Relevanz für technische Prozesse. Daher müssen letztendlich Labor-Rührkesselreaktoren zur technisch relevanten Prozesscharakterisierung eingesetzt werden. Diese sind aufgrund der fehlenden Parallelisierung in der Regel nur sequentiell einsetzbar, um die Stoffwechselleistungen verschiedener Stämme miteinander vergleichen zu können. Ein zentrales Problem stellt hierbei insbesondere bei der Charakterisierung von Clostridien die häufig zu beobachtende fehlende Reproduzierbarkeit der Satzverfahren dar. Um sequenziell durchgeführte

2. Problemstellung und Zielsetzung

Fermentationen mit *Clostridium acetobutylicum* in Rührkesselreaktoren bei technisch relevanten Bedingungen miteinander vergleichen zu können, soll daher zunächst ein robustes Verfahren erarbeitet werden, dass die reproduzierbare sequentielle Durchführung von Satzprozessen im Rührkesselreaktor ermöglicht („Referenzprozess“).

Eine direkte vergleichende Charakterisierung unterschiedlicher Stämme bei variierenden Reaktionsbedingungen erfordert den Einsatz vieler parallel betreibbarer Rührkesselreaktoren. Der am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TU München) entwickelte Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im 12 Milliliter-Maßstab fand bis zum Beginn dieser Arbeit nur für aerobe Bioprozesse Anwendung (beispielsweise: Puskeiler *et al.*, 2005). Als Reaktoren werden hierbei Einwegreaktionsgefäße aus gasdurchlässigem Kunststoff eingesetzt und der Kopfraum der parallelen Rührkesselreaktoren steht in direktem Kontakt mit der Außenluft. Um die parallelen Rührkesselreaktoren auch zur reaktionstechnischen Charakterisierung von strikt anaeroben Mikroorganismen in aerober Laborumgebung nutzen zu können, soll untersucht werden, wie trotzdem anaerobe Reaktionsbedingungen im Bioreaktorblock aufrecht erhalten werden können. Falls ein anaerober Betrieb unter diesen Bedingungen tatsächlich möglich ist, soll geprüft werden, ob und wie der zuvor im Litermaßstab etablierte, auch sequentiell reproduzierbare „Referenzprozess“, im Milliliter-Maßstab mit denselben Prozessergebnissen durchgeführt werden kann.

Damit sollen die technischen Voraussetzungen geschaffen werden, um verschiedene rekombinante *Clostridium acetobutylicum* Stämme unter definierten und technisch relevanten Reaktionsbedingungen untersuchen zu können. Dies soll am Beispiel mehrerer gezielt metabolisch definiert veränderter *Clostridium acetobutylicum* Stämme gezeigt werden, die hierzu freundlicherweise von Herrn Prof. Bahl und Frau Dr. Lütke-Eversloh (Institut für Biowissenschaften / Mikrobiologie der Universität Rostock) zur Verfügung gestellt werden.

Im Rahmen dieser vergleichenden reaktionstechnischen Untersuchungen kann darüber hinaus im Parallelansatz einfach überprüft werden, ob die Zusammensetzung des seit vielen Jahrzehnten zur Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* etablierten Reaktionsmediums tatsächlich optimal für die Butanolbildung geeignet ist.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Butanol

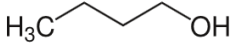
Butanol, Butan-1-ol, n-Butylalkohol oder auch n-Butanol ist der ein primärer C₄ Alkohol und hat die Summenformel C₄H₉OH.

3.1.1 Stoffeigenschaften

Butanol besitzt einen charakteristischen Geruch und bei Raumtemperatur handelt es sich um eine farblose, leicht entflammbare Flüssigkeit, die komplett mit organischen Lösemitteln, jedoch nur begrenzt mit Wasser mischbar ist. Sie kann bei direktem Hautkontakt auch reizend wirken (Dürre, 2008).

In Tabelle 3.1 sind weitere Stoffeigenschaften von Butanol aufgelistet.

Tabelle 3.1: Kennzahlen und Eigenschaften von Butanol (Lee *et al.*, 2008).

Strukturformel	
Molare Masse	74,12 g/mol
Löslichkeit in Wasser (20 °C)	79 g/L
Dichte (20 °C)	0,809 kg/L
Siedepunkt	117,7 °C
Schmelzpunkt	-89,3 °C
Dampfdruck (20 °C)	6,7 hPa
PubChem Compound Identification (CID)	263
Chemical Abstracts Service (CAS)	71-36-12

Butanol wirkt schon ab geringen Konzentrationen toxisch auf Mikroorganismen (Knoshaug & Zhang, 2009; Mann *et al.*, 2012).

Eigenschaften des Gemisches Wasser - Butanol - Ethanol

Die Stoffgemische Wasser - Ethanol und Wasser - Butanol besitzen jeweils ein Minimumazeotrop. Das Azeotrop des Gemisches Wasser - Ethanol liegt bei einem molaren Wasseranteil von 90 %. Das Azeotrop von Wasser - Butanol liegt bei 75 % Molanteil Wasser.

Zwischen diesen beiden Minimumazeotropen liegt eine Grenzdestillationslinie im Dreistoffgemisch Wasser - Butanol - Ethanol vor. In Abbildung 3.1 sind die Rückstandslinien eingezeichnet. Rückstandslinien zeigen den Verlauf der Zusammensetzung eines Stoffgemisches bei einer Destillation mit unendlichem Rückfluss. Die Grenzdestillationslinie ist zwischen den Azeotropen zu erkennen.

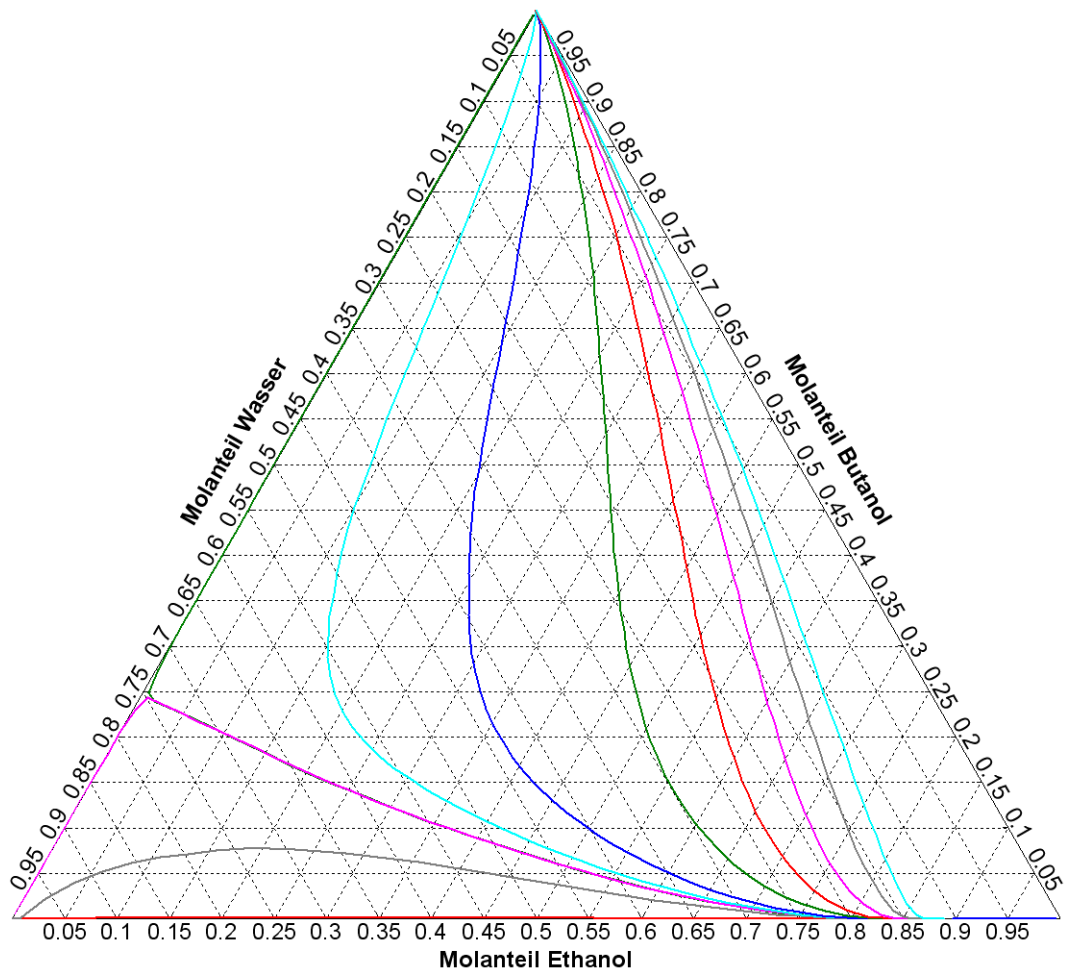


Abbildung 3.1: Verlauf der Rückstandslinien für das ternäre Gemisch Wasser - Butanol - Ethanol

Diese Eigenschaften des Stoffgemisches führen dazu, dass von einem Gemisch, in dem hauptsächlich Wasser (> 80 mol %) vorliegt, Butanol über thermische Verfahren abgetrennt werden kann, ohne dass das gesamte Wasser abgetrennt werden muss. Aceton besitzt kein Azeotrop mit Wasser, Butanol oder Ethanol und wirkt sich kaum auf den Verlauf der Rückstandslinien aus. Aceton kann allerdings aufgrund des niedrigeren Siedepunktes von 56 °C einfacher thermisch abgetrennt werden³.

3.1.2 Verwendung von Butanol

Einer Schätzung zufolge umfasste der jährliche Markt von Butanol 4 - 5 Millionen Tonnen mit einem Marktwert von 7 - 8 Milliarden US-Dollar (Donaldson *et al.*, 2007) bei einer gleichzeitig erwarteten Wachstumsrate von 3 % pro Jahr (Lee *et al.*, 2008; Kirschner, 2006). Butanol besitzt in der chemischen Industrie ein sehr weit gefächertes Anwendungsspektrum. Für Acrylat- und Metacrylatester wird knapp die Hälfte der Jahresproduktion verwendet. Monomere, sowie Polymere dieser Ester werden häufig für Oberflächenbeschichtungen, Textilien, Fasern, bei Klebstoffen oder als Flockungsmittel verwendet. Weitere wichtige Derivate von Butanol sind Glycolether, Butylacetate und Butylamine (Dürre, 2008). Hier reicht der Anwendungsbereich von Farben, Lacken und Lebensmitteln über eine Verwendung in der Zahnmedizin bis hin zur Produktion von Pestiziden. Direkte Anwendungsbereiche von Butanol erstrecken sich von Extraktionsmitteln über Kosmetikartikel bis hin zu Brems- oder Hydraulikflüssigkeiten (Dürre, 2007).

Ein weiterer, sehr vielversprechender Verwendungszweck ist der Einsatz von Butanol als Biokraftstoff (Qureshi *et al.*, 2007; Fortman *et al.*, 2008). Butanol weist einige gravierende Vorteile gegenüber Ethanol, dem derzeitigen Primus auf dem Segment der Biokraftstoffe, auf. So ist Butanol in jedem Verhältnis zu Benzin mischbar ohne dass Motoren modifiziert werden müssen. Butanol wirkt kaum korrosiv und ist im Gegensatz zu Ethanol auch nicht hygroskopisch. Die Transportfähigkeit und die Lagerfähigkeit sind somit entscheidend verbessert. Bestehende Infrastrukturen, also Tankstellen oder Pipelines, könnten mit Butanol ohne jegliche Veränderungen genutzt werden (Atsumi *et al.*, 2008). Zudem ist die Energiedichte von Butanol mit ca. 29 MJ/L bedeutend höher als die von Ethanol (19,6 MJ/L) und kommt nahezu an die von Benzin (32 MJ/L).

³ (Die Simulationen zu den Stoffgemischen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Andreas Kossman, TU München, Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Harald Klein)

3.2 Herstellung von Butanol

3.2.1 Petrochemische Herstellung von Butanol

Bis Mitte des 20. Jahrhunderts wurde Butanol auf biologischem Wege produziert. Als jedoch der Bedarf stark anstieg und die petrochemische Industrie weitere Synthesen hervorbrachte und auch in der Lage war günstiger zu produzieren, wurde die biologische Produktion in nahezu allen Ländern eingestellt (Jones & Woods, 1986).

Aktuell wird ein gängiger Prozess zur Butanolproduktion genutzt, nämlich die Hydroformylierung (Oxosynthese). Daneben ist die Reppe Synthese und die Crotonaldehyd Hydrogenierung mit einer vorangehenden Aldolkondensation zu erwähnen. In Abbildung 3.2 sind diese Prozesse schematisch dargestellt.

Bei der Oxosynthese wird Propen, Wasserstoff und Kohlenstoffmonoxid teilweise zu Butyraldehyd umgesetzt, welches im Anschluss zu Butanol hydrogeniert werden kann (Falbe, 1970). Dieser Prozess wird aktuell industriell verwendet. Die sog. Reppe Synthese wird direkt mit Wasser durchgeführt, ist aber nicht so wirtschaftlich (Wollrab, 2009; Weißermel & Arpe, 2003). Die Crotonaldehyd Hydrogenierung wird aktuell ebenfalls kaum verwendet, jedoch besteht die Möglichkeit, dass dieser Weg wieder an Bedeutung gewinnen kann, da das Edukt Acetaldehyd auch aus Ethanol, welches nicht zwangsweise erdölbasiert ist (Buschhorn *et al.* 1989; Demler & Weuster-Botz, 2011) gewonnen werden kann. Bei allen drei Prozessen sind entweder umweltgefährdende Katalysatoren, hohe Drücke oder Temperaturen notwendig.

Mit weiterhin steigenden Erdölpreisen werden die im folgenden Kapitel gezeigten biologischen Produktionsverfahren stetig interessanter.

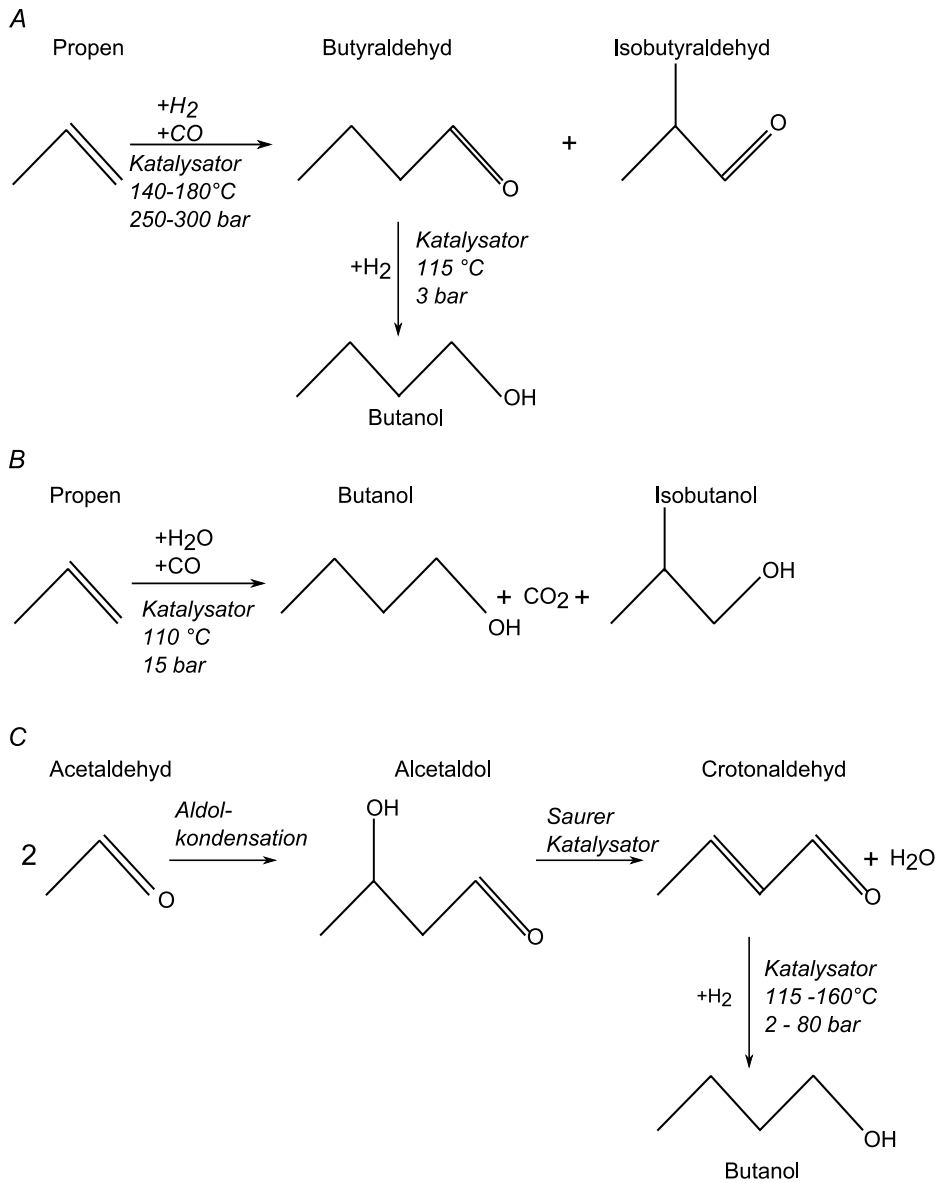


Abbildung 3.2: Chemische Produktionsverfahren zur Herstellung von Butanol: A Oxosynthese; B Reppe Prozess; C Crotonaldehyd Hydrierung nach Aldolkondensation von Aldehyden.

3.2.2 Biotechnologische Herstellung, Stämme und Geschichte

1861 berichtete Louis Pasteur als erster von der fermentativen Herstellung von Butanol (Jones & Woods, 1986). Zur anschließenden Jahrhundertwende herrschte ein Engpass an Kautschuk für die Herstellung von Gummi. Nach synthetischen Alternativen wurde geforscht. Die Firma „Strange and Graham Ltd.“ aus England entschloss sich dazu, Butadien und Isopren aus Butanol herzustellen (Gabriel, 1928; Gabriel & Crawford, 1930). Unter den Forschern war auch Chaim Weizmann, der später zum Erfinder der ABE Fermentation erklärt wurde. Er forschte an solventogenen, also lösemittelbildenden Mikroorganismen unter denen sich auch *Clostridium acetobutylicum* befand. Zum ersten Weltkrieg hin schwenkte die Forschung auf Aceton, da dieses zur Produktion von Cordit, einem rauchfreien Schießpulver, gebraucht wurde (Gabriel & Crawford, 1930). Der Prozess wurde daraufhin Weizmann Prozess genannt. Produziertes Butanol wurde dabei als unerwünschtes Nebenprodukt angesehen (Killeffer, 1927). Als nach dem ersten Weltkrieg jedoch der Aufschwung der Automobilindustrie begann und diese auf der Suche nach schnell trocknenden Lösemitteln war, wurden Butanol und die damit zusammenhängenden Butylester interessant, da sie genau die gesuchten Eigenschaften besaßen. Im Jahr 1923 wurde eine Anlage mit 32 jeweils 190 m³ Fermentationsanlagen, die im Satzverfahren betrieben wurden, in den USA in Betrieb genommen wurden (Gabriel & Crawford, 1930). Diese Anlage konnte bis zu 100 Tonnen Lösemittel täglich produzieren, was für diese Zeit eine enorme Leistung war. Damals wurde jedoch auch mit der petrochemischen Herstellung von Aceton begonnen. Ab 1936 wurde die ABE Fermentation auch von Ländern wie Australien, Japan, Indien und Süd Afrika aufgenommen (Ross, 1961). Für den zweiten Weltkrieg wurden die Kapazitäten für die fermentative Herstellung von Aceton und Butanol nochmals erhöht. Die damalige UDSSR, sowie China bauten ebenfalls entsprechende Kapazitäten auf.

Nach dem zweiten Weltkrieg florierte die Ölindustrie, die Preise für petrochemisch gewonnenes Aceton und Butanol sanken und die bis dato für die ABE Fermentation verwendeten Melassen, Abfallprodukte aus der Zuckerherstellung, fanden Eingang in die Futtermittelindustrie. Diese beiden Faktoren machten die ABE Fermentation mehr und mehr unrentabel (Hastings, 1971). So endete der kommerzielle Betrieb der ABE Fermentation mehr oder weniger weltweit. In den USA wurde 1960 nahezu kein Butanol mehr mikrobiell produziert. Lediglich die UDSSR und Süd Afrika betrieben noch bis 1980 Anlagen, da dort die Preise für Melassen niedrig und die Verfügbarkeit von Öl limitiert war (Zverlov *et al.*, 2006).

Die verwendeten Mikroorganismen wurden meist unter dem Begriff *Clostridium acetobutylicum* geführt. Es gab keine zuverlässige Nomenklatur, deshalb waren die Bezeichnungen eher irreführend (Ross, 1961; Jones & Woods, 1986). Heute wird davon ausgegangen, dass Vertreter von *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* NCIMB 8052, *C. saccharobutylicum*, und *C. saccharoperbutylacetonicum* am häufigsten für die Produktion verwendet wurden (Dürre, 2005; Keis *et al.*, 1995; Keis *et al.*; 2001).

3.3 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Clostridien sind eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien, die alle strikt anaerob und gram positiv sind, sowie eine stäbchenförmige Morphologie zeigen. Innerhalb der Prokaryoten gehören Clostridien zu einer der größten Gattungen und es gibt daher zahlreiche Arten mit unterschiedlichen physiologischen und metabolischen Eigenschaften.

Für die industrielle Nutzung sind bisher nur wenige Arten interessant. Neben den lösemittelbildende Arten wie *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium beijerinckii* sind Arten wie *Clostridium botulinum*, das eines der stärksten Toxine produzieren kann, von Interesse.

3.3.1 Allgemeines

Clostridium acetobutylicum hat einen Durchmesser zwischen 0,2 und 2 µm und kann bis zu 30 µm lang werden, wie in Abbildung 3.3 gezeigt. Neben der regulären stäbchenförmigen Zellform bilden lösemittelbildende (solventogene) Kulturen „zigarrenförmige“ Zellen aus. Zudem kann *C. acetobutylicum* bei ungünstigen Umgebungsbedingungen Endosporen bilden. Der genaue regulatorische Ablauf ist für beide Fälle nicht genau geklärt. Es wird angenommen, dass zigarrenförmige Zellen für die Lösemittelbildung verantwortlich sind und sporenbildende dazu nicht in der Lage sind (Zverlov *et al.*, 2006). Diese Zusammenhänge werden von mehreren Forschungsgruppen seit längerer Zeit genauer untersucht (Harris *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2008).

Im Jahr 2001 wurden die Ergebnisse der Genomsequenzierung von *Clostridium acetobutylicum* veröffentlicht (Nölling *et al.*, 2001). Das Genom besteht aus 3.940.880 Basenpaaren und 3.740 offene Leserahmen (ORFs) und einem Megaplasmid pSOL1 mit 192.000 Basenpaaren und 178 ORFs. Auf dem Plasmid befinden sich neben den Genen

3. Theoretische Grundlagen

Alkoholdehydrogenase (*adhE*), CoA-Transferase (*ctfAB*) und der Acetoacetatdecarboxylase (*adc*) noch viele weitere an der Solventogenese beteiligte Gene (Nair *et al.*, 1999).

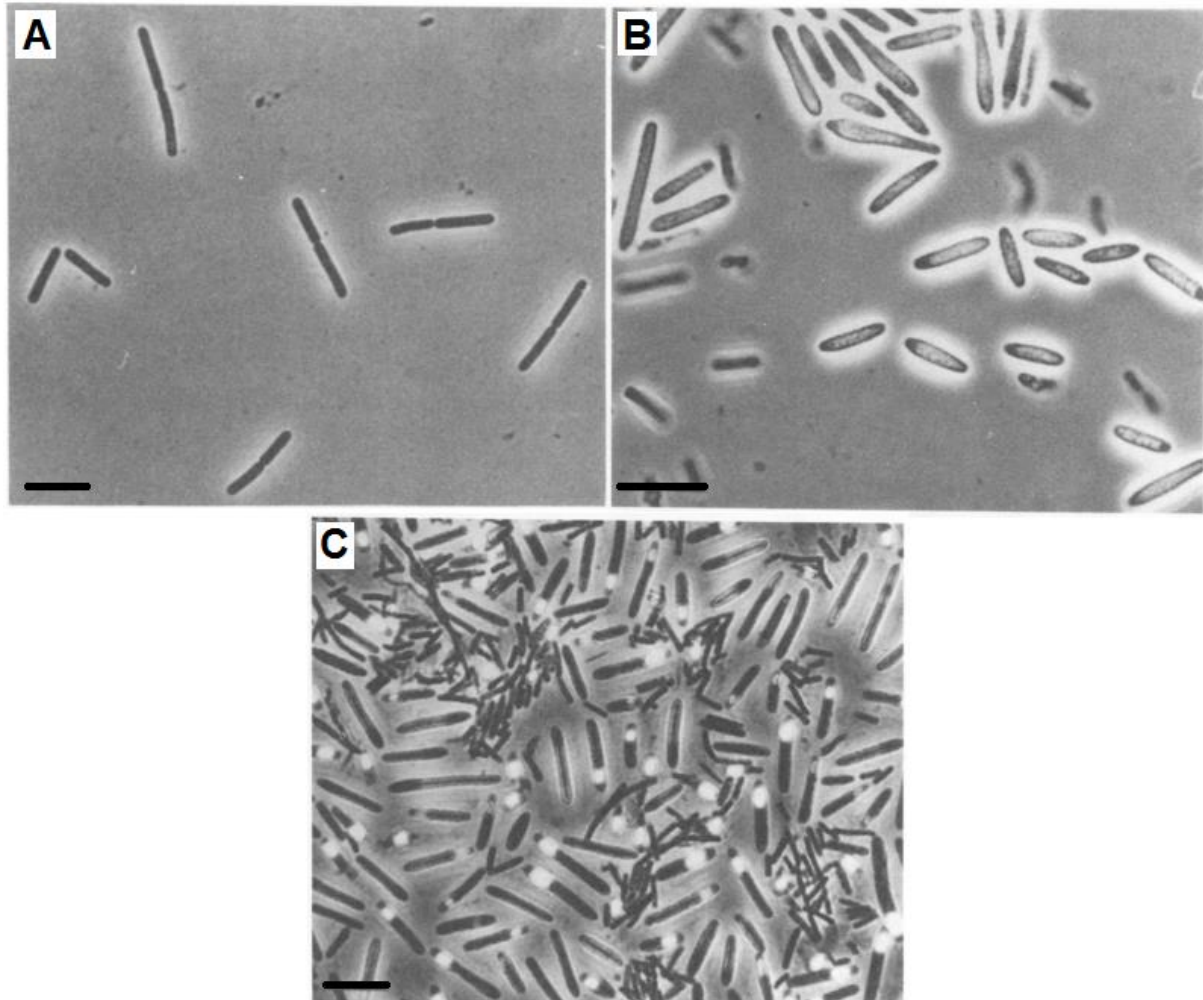


Abbildung 3.3: Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Jones *et al.*, 1982). Gezeigt sind die verschiedenen Wachstumsstadien: Exponentielles Wachstum während der Acidogenese (A); Zigarrenförmige Zellen während der Solventogenese (B); Kultur nach der Bildung von Endosporen nach der Solventogenese (C). Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 10 μm .

Das Wachstum von *Clostridium acetobutylicum* im Satzverfahren bei begrenztem Nährstoffangebot kann in vier Phasen unterteilt werden. Nach einer Verzögerungsphase, während der sich die Mikroorganismen an die Wachstumsbedingungen im Medium adaptieren steigt die Zellzahl in der Übergangsphase langsam an. In der sich anschließenden exponentiellen Wachstumsphase findet die maximale Vermehrung der

Zellen statt. Bei *Clostridium acetobutylicum* ist diese Phase in zwei Abschnitte unterteilt. Zunächst findet eine acidogene Wachstumsphase, in der Säuren gebildet werden und anschließend eine solventogene Phase, in der die Säuren wiederaufgenommen werden und Lösemittel gebildet werden. Dieser Verlauf ist sehr gut an dem pH Verlauf während eines unkontrollierten Satzprozesses zu erkennen (siehe Abbildung 3.4). Die Akkumulation von Produkten, vor allem von Butanol führt zu einer Absterbephase.

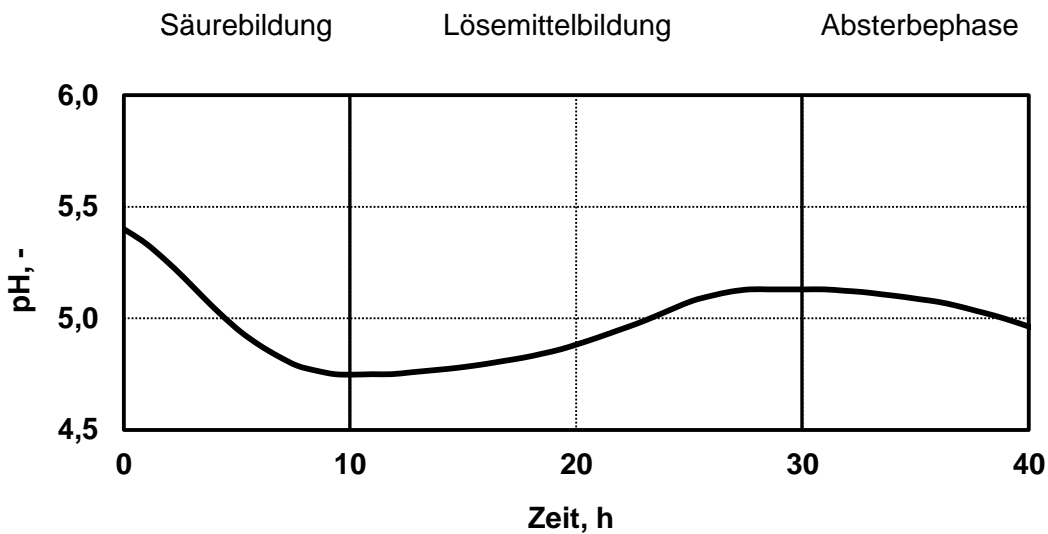


Abbildung 3.4: Charakteristischer Verlauf des pH während einer Satzkuultivierung ohne pH Regelung von *Clostridium acetobutylicum*.

3.3.2 Stoffwechsel

Der Stoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum* unterteilt sich im Satzverfahren in zwei Phasen, eine acidogene und eine solventogene. In der acidogenen Phase werden Essigsäure und Buttersäure sowie sehr geringe Mengen Milchsäure gebildet. Milchsäure kann dabei aus dem zentralen Stoffwechselprodukt Pyruvat gebildet werden. Pyruvat reagiert jedoch unter Freisetzung von CO_2 hauptsächlich zu Acetyl-CoA. Bei der Reaktion von Acetyl-CoA zu Acetat, über die Zwischenstufe Acetyl-Phosphat, wird ein ATP frei. Aus zwei Acetyl-CoA Molekülen wird mit dem Enzym *Thiolase* ein Acetoacetyl-CoA (C_4) Körper gebildet, welcher dann über die Enzyme 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*), Crotonase (*crt*) und Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*) zu Butyryl-CoA katalysiert wird.

3. Theoretische Grundlagen

Butyryl-CoA wird anschließend mit Hilfe der Phosphotransbutyrylase (*ptb*) und Butyrylkinase (*buk*) zu Buttersäure katalysiert (siehe Abbildung 3.5).

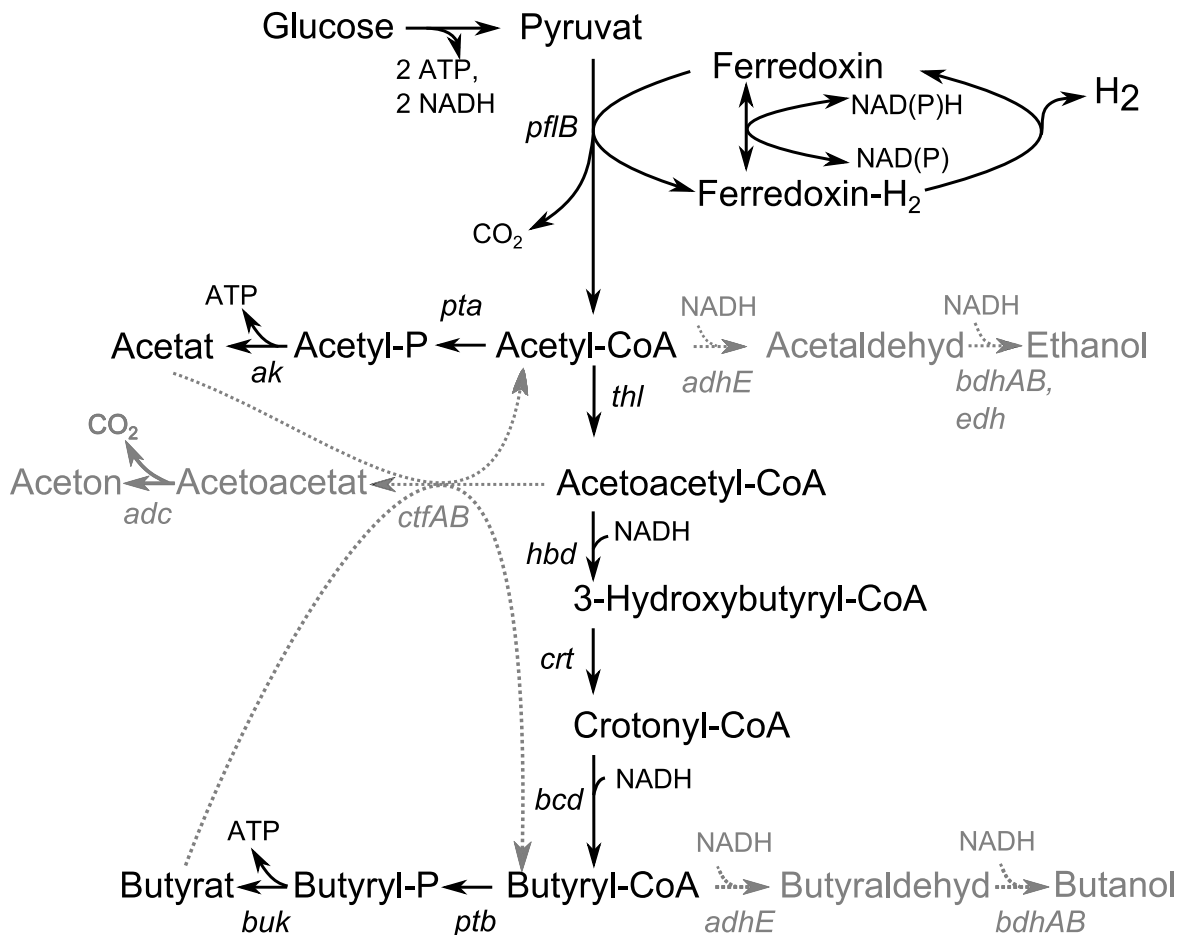


Abbildung 3.5: Darstellung des acidogenen Stoffwechsels von *Clostridium acetobutylicum*. Während der Acidogenese aktive Gene und gebildete Produkte sind schwarz dargestellt. Inaktive Gene und nicht gebildete Produkte sind grau dargestellt. Gene: Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase (*pflB*), Acetatkinase (*ak*), Phosphotransacetylase (*pta*), Acet-/Butyraldehyd Dehydrogenase (*adhE*), Ethanoldehydrogenase (*edh*), Thiolase (*thl*), 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*), Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*), Acetoacetat Decarboxylase (*adc*), CoA-Transferase (*ctfAB*), Butyratkinase (*buk*), Phosphotransbutyrylase (*ptb*), Butanoldehydrogenase (*bdhAB*), Adenosintriphosphat (ATP), Nicotinamidadenindinukleotid (phosphat) reduziert, oxidiert (NAD(P)H, NAD(P)⁺).

Während der Acidogenese gewonnenes ATP wird für eine exponentielle Wachstumsphase verwendet (Amador-Noguez *et al.*, 2011). Im Überschuss anfallendes NADH wird über eine Ferredoxinoxidoreduktase zu molekularem Wasserstoff umgesetzt (Jones & Woods, 1986). Eine theoretisch maximale Ausbeute an ATP von 4 ATP pro Molekül Glucose wäre für die

Zellen möglich, wenn nur Acetat gebildet werden würde. Allerdings führte dies zu einem weiteren Überschuss an Elektronen (respektive NADH), da die Acetatbildung, im Gegensatz zur Redox-neutralen Butyratbildung, zu zwei überschüssigen NADHs pro verbrauchter Glucose führt. Aus diesem Sachverhalt folgt auch das Verhältnis von 1 mol Essigsäure zu 1,5 mol Buttersäure, das von einem Wildtypstamm *Clostridium acetobutylicum* oder *Clostridium beijerinckii* während der Acidogenese produziert wird (Rogers, 1986; Thauer *et al.*, 1977).

Im unkontrollierten Satzverfahren sinkt der pH durch die Produktion der Säuren ab (siehe auch Abbildung 3.4). Nach dem Erreichen einer bestimmten Konzentration an nicht dissoziierten Säuren stellt sich der Stoffwechsel auf eine solventogene Phase um und die zuvor gebildeten Säuren werden teilweise wieder aufgenommen. Die Effekte, die dieses Umschalten auf die Solventogenese veranlassen, sind nicht genau geklärt, da viele verschiedene Gene aktiviert oder inaktiviert werden (Dürre, *et al.*, 1987). In der Literatur sind verschiedene Effekte die zum Wechsel der Phase führen beschrieben. Sehr wichtig für diesen Wechsel ist ein niedriger pH (Grimmler *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 1984). Allerdings wurde auch schon eine Lösemittelbildung bei höherem pH beobachtet. Weitere Schlüsselrollen spielen die sauren Produkte der Acidogenese, der interne pH der Zellen sowie verschiedene Nährstofflimitationen (Jones & Woods, 1986). Wird bei der Acidogenese im Satzverfahren ein Schwellenwert der Konzentration an Acetat und Butyrat überschritten, so werden die Säuren nicht mehr aufgenommen und es kommt zum sogenannten "Säurekollaps" oder "*acid crash*" (Maddox *et al.*, 2000). Die Fermentation kommt dabei zum Erliegen und der pH steigt nicht wieder an.

Im Zuge der Solventogenese werden beide Säuren unter der Bildung von Aceton wieder aufgenommen (siehe Abbildung 3.6). Der pH steigt bei einer nicht kontrollierten Satzfermentation wieder an, was den Zellen erlaubt den pH Gradienten (von pH 1) über die Membran, der für die Energiegewinnung nötig ist, noch für eine Weile aufrecht zu erhalten um die bei der Solventogenese einsetzende Sporenbildung durchzuführen (Dürre, 2008). Ein beispielhafter Verlauf des pH ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Bei der Solventogenese wird zunächst das CoA Transferase-Gen (*ctfAB*) exprimiert und die Wiederaufnahme der Säuren unter Acetoacetatbildung eingeleitet. Das Acetoacetat wird zu Aceton decarboxyliert. Gängige Meinung war, dass die Wiederaufnahme beider Säuren mit der Acetonbildung einher geht (Lee *et al.*, 2008; Jones & Woods, 1986), wie in Abbildung

3. Theoretische Grundlagen

3.6. dargestellt. Parallel dazu werden die Gene zur Alkoholbildung (Acet-/Butyraldehyd Dehydrogenase (*adhE*)), Ethanoldehydrogenase (*edh*) Butanoldehydrogenase (*bdhAB*) exprimiert und Butanol sowie Ethanol gebildet.

Der Wechsel von Acidogenese zu Solventogenese geht außerdem mit einer Änderung des Verhältnisses Wasserstoff zu Kohlenstoffdioxid im Abgas einher. Während der Anteil an Kohlenstoffdioxid aufgrund der Acetonbildung steigt, fällt der Anteil an Wasserstoff, da Redoxequivalente nun auch für die Produktion von Butanol und Ethanol verbraucht werden, was auch in Abbildung 3.6 erkennbar ist.

Ist eine toxische Konzentration an Butanol erreicht oder keine Kohlenstoffquelle mehr im Medium vorhanden, so endet die Fermentation.

Es gibt weitere Hinweise auf einen alternativen Weg zur Alkoholproduktion in *Clostridium acetobutylicum*. Allerdings sind die Gene, die in einer sogenannte Alcohologenese, also der Produktion von Alkoholen ohne Aceton, aktiv sind, weithin unbekannt (Lee *et al.*, 2008).

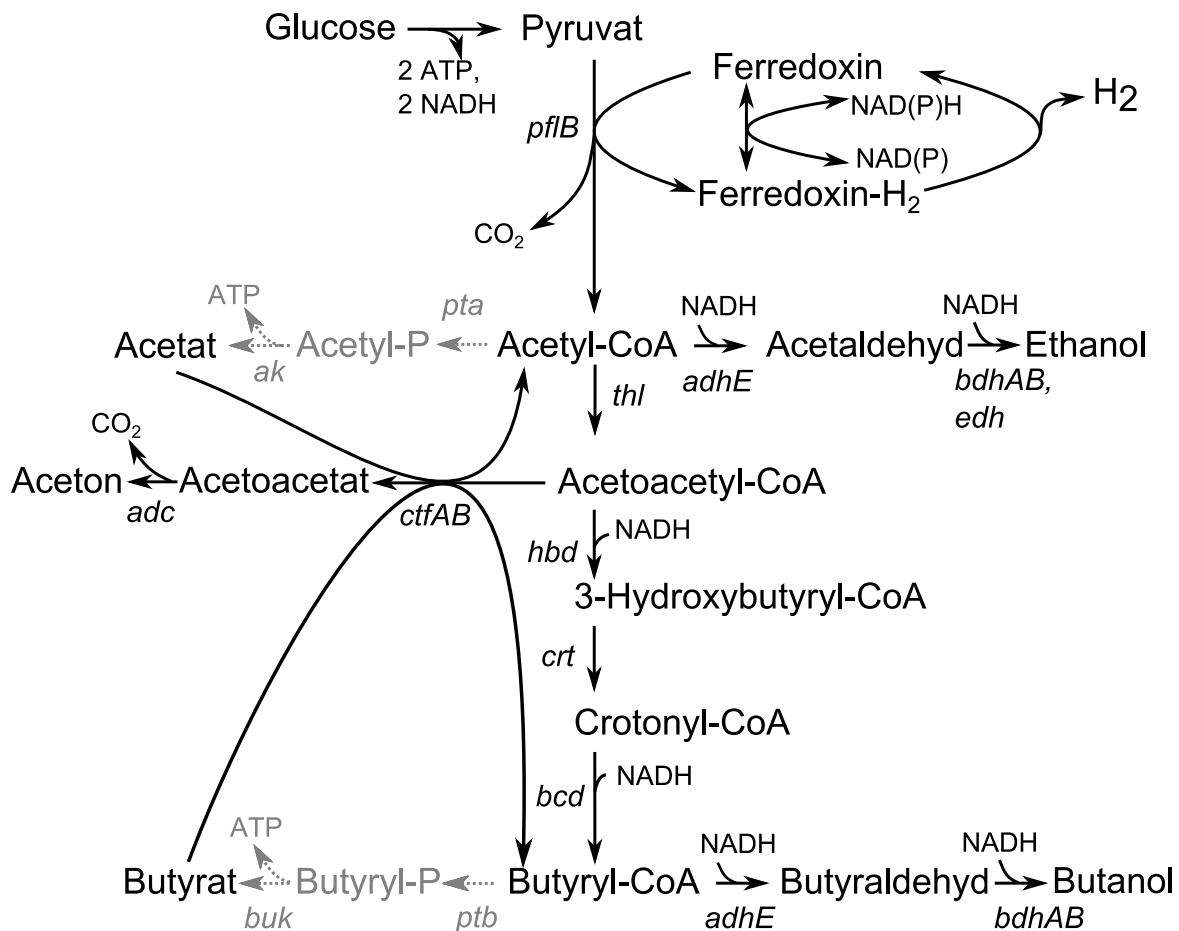


Abbildung 3.6: Darstellung des solventogenen Stoffwechsels von *Clostridium acetobutylicum*. Während der Solventogenese aktive Gene und gebildete Produkte sind schwarz dargestellt. Inaktive Gene und nicht gebildete Produkte sind grau dargestellt. Gene: Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase (*pflB*), Acetatkinase (*ak*), Phosphotransacetylase (*pta*), Acet-/Butyraldehyd Dehydrogenase (*adhE*), Ethanoldehydrogenase (*edh*), Thiolase (*thl*), 3- Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (*hbd*), Crotonase (*crt*), Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*), Acetoacetat Decarboxylase (*adc*), CoA-Transferase (*ctfAB*), Butyratkinase (*buk*), Phosphotransbutyrylase (*ptb*), Butanoldehydrogenase (*bdhAB*), Adenosintri-phosphat (ATP), Nicotinamidadenindinukleotid (phosphat) reduziert, oxidiert (NAD(P)H, NAD(P)⁺).

Die in der Literatur beschriebenen Butanolkonzentrationen die mit *Clostridium acetobutylicum* aus 60 g/L Glucose erzeugt wurden schwanken stark und sind abhängig von den entsprechenden Randbedingungen. Die stärksten Einflüsse gehen dabei von den verwendeten Medien, der Begasungsrate (bei Rührkesselreaktoren) und dem pH, bei dem die Kultivierung gestartet wurde, bzw. der verwendeten Regelung aus. So berichtet Mermelstein *et al.* (1993) bei nicht begasten Versuchen mit einem Komplexmedium und einer Glucosekonzentration zwischen 80 und 90 g/L von Butanolkonzentrationen von 6,6 g/L

bei geregelten pHs 4,5 und 9,6 g/L bei pH 5,5. Green berichtet 9,6 g/L Butanol aus einem Medium mit 80 g/L Glucose und Komplexbestandteilen (Green *et al.*, 1996). Bei Studien, die über 60 g/L Glucose als Ausgangswert einsetzen, wird zudem meist von einem Verbleib an Glucose im Medium berichtet. Harris berichtet von 11,6 g/L Butanol mit dem Wildtypstamm (Harris *et al.*, 2001) bei einem Komplexmedium. Eine aktuelle Studie berichtet, ausgehend von einem synthetischen Medium mit 60 g/L Glucose, von knapp 7 g/L Butanol (Mann *et al.*, 2012).

3.3.3 Toxizität von Sauerstoff

Seit der Entdeckung von strikt anaeroben Mikroorganismen wurde die toxische Wirkungsweise von Sauerstoff untersucht. Vier Hypothesen werden bis heute diskutiert (O'Brien & Morris, 1971). Einer davon zufolge sei Sauerstoff selbst ein Zellgift. Eine weitere geht davon aus, dass in Anwesenheit von Sauerstoff, das für anaerobes Wachstum nötige niedrige Redoxpotential von -150 mV bis -400 mV (bezogen auf die Wasserstoffnormalelektrode) nicht aufrecht zu halten wäre. Eine andere Hypothese ist, dass Wasserstoffperoxid, zu dem Sauerstoff unter reduzierenden Bedingungen umgewandelt wird, die Zellen, welche keine Katalasen besitzen, vergiftet. Die vierte Hypothese diesbezüglich ist, dass Sauerstoff als sehr guter Elektronenakzeptor alle freien Elektronen, die im Organismus vorhanden sind, an sich zieht und so den NADH Haushalt in den Zellen massiv stört (O'Brien & Morris, 1971). Für verschiedene Mikroorganismen kann jede dieser Hypothesen zutreffen. 1971 stellten Morris und O'Brien fest, dass eine kurzzeitige Exposition von *Clostridium acetobutylicum* mit Sauerstoff lediglich das Wachstum hemmt und die ATP Konzentration stark sinken lässt. Zudem kann die Sporulation eingeleitet werden (Jones & Woods, 1986). Es konnte ausgeschlossen werden, dass das hohe Redoxpotential für die Inhibierung verantwortlich war. Sauerstoff wirkt jedoch wie ein Zellgift für *Clostridium acetobutylicum*. So sind einige Enzyme, allen voran Ferredoxine, die in *Clostridium acetobutylicum* für den Elektronenhaushalt zuständig sind, sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff (Dürre, 2005). Endet die Exposition rechtzeitig, so können sich die anaeroben Organismen wieder regenerieren und weiter wachsen (O'Brien & Morris, 1971). Es gibt Berichte, in denen von stimulierenden Effekten des Sauerstoffes auf die Butanolproduktion die Rede ist. Diese lassen sich auf den Einfluss auf das Redoxpotential erklären (Wang *et al.* 2012).

3.3.4 Lösemitteltoxizität

Eines der größten Probleme der ABE Fermentation ist die Produktinhibierung durch Butanol. Ab 20 g/L stellt der Zellmetabolismus von *Clostridium acetobutylicum* unweigerlich die Funktion ein (Woods, 1995). Ab 7 g/L ist das Zellwachstum bereits um 50 % eingeschränkt. Eine neue Studie (Mann *et al.*, 2012) zeigt den Effekt von 10 g/L Butanol auf den Wildtypstamm. Dabei sinkt die Zahl der koloniebildenden Einheiten binnen sechs Stunden auf unter 0,1 % des Ausgangszustandes. Die damit verbundenen niedrigen Endkonzentrationen führen zu entsprechend geringen Produktionsraten.

Die Funktionsweise der Butanolinhibierung lässt sich vereinfacht auf einen Mechanismus zurückführen. So verursachen die lipophilen Butanolmoleküle direkt eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran (Bowles & Ellefson, 1985). Das kann ab einem gewissen Grad zum Verlust der Membranfunktion führen. Ein zusätzlicher Effekt der Permeabilitätssteigerung ist die Senkung der Aktivität der membranständigen ATPasen. So wird die Aufnahmefähigkeit für Zucker und damit verbunden auch das Wachstum negativ beeinflusst (Lee *et al.*, 2008).

Butanol ist jedoch das einzige Lösemittel, das bei der ABE Fermentation in toxischen Konzentrationen auftritt. Aceton und Ethanol wirken sich zum Beispiel erst ab 40 g/L mit einer Wachstumsverlangsamung von 50 % aus (Jones & Woods, 1986).

Mit der stetigen Verbesserung von DNA Microarrays (Alsaker *et al.*, 2004; Alsaker *et al.*, 2010; Hönicke *et al.*, 2012) und Proteom Analysen (Terracciano *et al.*, 1988; Mao *et al.*, 2011) (Mao *et al.*, 2012) lassen sich die Auswirkungen von Butanol auch in einem größeren Zusammenhang beobachten. So treten bei akutem Butanolstress zwei Abwehrmechanismen in *Clostridium acetobutylicum* in Kraft: Zum einen wird die Membranzusammensetzung auf mehr gesättigte Fettsäuren umgestellt, um der Fluidisierung entgegenzuwirken (Baer *et al.*, 1987; Ezeji, *et al.*, 2010). Zum anderen werden die sogenannten Heat Shock Proteine, z.B. *groES* oder *groESL*, vermehrt gebildet (Alsaker *et al.*, 2004; Tomas *et al.*, 2003). Diese Chaperone sind wahrscheinlich für eine Rückfaltung denaturierter Proteine zuständig (Nicolaou *et al.*, 2010; Mann *et al.*, 2012).

3.3.5 Theoretische Betrachtungen zum Stoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum*

In diesem Kapitel soll auf die theoretisch möglichen Reaktionen während einer ABE Fermentation eingegangen werden. Dazu sind in Tabelle 3.2 einige Reaktionen aufgelistet, die im Hinblick auf Stöchiometrie und Redoxequivalente möglich sind (nach Lütke-Eversloh & Bahl, 2011a; Jones & Woods, 1986).

Tabelle 3.2: Theoretisch mögliche Reaktionen im Stoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum* (nach Lütke-Eversloh & Bahl, 2011a). Markiert sind die vorrangig ablaufenden Reaktionen während der Acidogenese (Reaktion 3) und der Solventogenese (Reaktion 10).

Reaktion	Edukte	Produkte	Generiertes ATP
1	1 Glucose	2 Acetat + 2 CO ₂ + 4 H ₂	4
2	1 Glucose	1 Butyrat + 2 CO ₂ + 4 H ₂	3
3	1 Glucose	~ 0,6 Acetat + 0,7 Butyrat + 2 CO₂ + 2,7 H₂	3,3
4	1 Glucose	2 Laktat	2
5	1 Glucose	1 Acetat + 1 Ethanol + 2 CO ₂ + 4 H ₂	3
6	1 Glucose	2 Ethanol + 2 CO ₂	2
7	1 Glucose	1 Aceton + 3 CO ₂ + 4 H ₂	2
8	1 Glucose	1 Butanol + 2 CO ₂	2
9	1 Glucose	0,5 Aceton + 0,5 Butanol + 2,5 CO ₂ + 2 H ₂	2
10	1 Glucose	0,3 Aceton + 0,6 Butanol + 0,2 Ethanol + 2,3 CO₂ + 1,2 H₂	2
11	1 Glucose + 1 Acetate	1 Acetone + 1 Ethanol + 3 CO ₂ + 2 H ₂	2
12	1 Glucose + 1 Acetate	1 Acetone + 0,5 Butanol + 3 CO ₂ + 2 H ₂	2
13	1 Glucose + 1 Butyrate	1 Acetone + 1 Butanol + 3 CO ₂ + 2 H ₂	2

Obwohl während der Acidogenese eine reine Buttersäure- oder Essigsäuregärung möglich wäre, läuft annähernd „Reaktion 3“ aus Tabelle 3.2 ab, um ATP zu generieren, welches für das Wachstum benötigt wird. In der Solventogenese läuft näherungsweise „Reaktion 10“ ab, um möglichst effektiv reduzierte Redoxequivalente zu regenerieren, indem Alkohole und Wasserstoff parallel gebildet werden. Die Schwierigkeit, eine vereinfachte Reaktionsgleichung für die Solventogenese aufzustellen, resultiert aus der Tatsache, dass mehrere Stoffe begleitend aufgenommen werden können (siehe Reaktionen 11-13 in Tabelle 3.2).

Aus Tabelle 3.2 wird zudem ersichtlich, dass theoretisch eine reine Butanolfermentation möglich wäre, sofern keine Elektronen auf Protonen übertragen würden und somit kein Wasserstoff gebildet würde. Es gibt Ansätze den Elektronenfluss zu Wasserstoff zu manipulieren, indem man Ferredoxin, das Enzym zur Übertragung, mit Kohlstoffmonoxid inhibiert oder mit einem hohen Partialdruck an Wasserstoff zur Produktinhibierung bei der Fermentation arbeitet (Dabrock *et al.*, 1992; Peguin & Soucaille, 1995).

3.3.6 Metabolic Engineering

Die Zusammenfassung der wichtigsten rekombinanten Stämme ist in Tabelle 3.3 gezeigt. Eine der ersten erfolgreich durchgeführten genetischen Arbeiten an *Clostridium acetobutylicum* war die Überexpression des Stoffwechselweges zur Acetonbildung *adc* und *ctfAB*. Dies führte dazu, dass die Gene früher exprimiert wurden, so wurden Butyrat sowie Acetat nahezu vollständig wieder aufgenommen. Das führte zu einer 95 % Erhöhung von Aceton und einer 37 % Erhöhung der erreichten Butanolkonzentration (Mermelstein *et al.*, 1993).

3. Theoretische Grundlagen

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der wichtigsten genetischen Arbeiten an *Clostridium acetobutylicum* (modifiziert aus Lee *et al.*, 2008); „+“ entspricht Überexpression; „-“ entspricht Deletion oder verringerte Expression. Als Kohlenstoffquelle für die Satzverfahren wurde Glucose verwendet. In Klammern steht der Wert, der mit dem jeweiligen Kontrollstamm erzielt wurde.

+	-	Butanol- konzentration g/L	Kommentar	Quelle
<i>adc</i>; <i>ctfAB</i>	-	13 (9,5)	50 % höhere Ausbeute an Lösemitteln	(Mermelstein <i>et al.</i> , 1993).
<i>adhE</i>	-	8,7 (5,5)	Verhältnis Alkohole/Aceton erhöht	(Nair, <i>et al.</i> , 1994)
-	<i>pSOL</i>	0 (5,5)	Erkenntnis:	(Nair & Papoutsakis, 1994)
<i>adhE</i>	<i>pSOL</i>	6,2 (5,5)	<i>adhE</i> ist für die Butanolproduktion verantwortlich	
-	<i>pta</i>	9,9 (9,7)	Erkenntnis: Butyryl-P ist	(Green & Bennett, 1996)
-	<i>buk</i>	10,8 (9,7)	kritisch für die Butanolproduktion	
-	<i>solR</i>	17,8 (5,5)	Verbesserte Ausbeuten, jedoch auch hohe Ethanol-, Acetonkonzentrationen	(Nair <i>et al.</i> , 1999)
-	<i>buk</i>	16,7 (5,5)	und sehr hohe	(Harris <i>et al.</i> , 2000)
<i>adhE</i>	<i>buk</i>	16,7 (5,5)	Butanolkonzentrationen	
-	<i>solR</i>	14,6 (11,4)	Regulator für eine sehr hohe	(Harris <i>et al.</i> , 2001)
<i>adhE</i>	<i>solR</i>	17,6 (11,4)	Butanolkonzentration wurde gefunden	
<i>adhE</i>	-	10 (10,4)	Hohe Ethanolkonzentrationen	(Tummala <i>et al.</i> , 2003)
-	<i>ctfB</i>	1,2 (10,4)	mittels antisense RNA (4- 5 g/L)	
<i>groESL</i>	-	17 (13)	Lösemitteltoleranter Stamm	(Tomas <i>et al.</i> , 2003)

Diese Tabelle wird auf der Folgeseite fortgeführt.

+	-	Butanol- konzentration g/L	Kommentar	Quelle
<i>adhE1</i>	<i>ctfA</i>	13,2 (13)	45% weniger Aceton bei gleichbleibender Butanolkonzentration, dazu schneller einsetzende Butanolproduktion	(Tummala <i>et al.</i> , 2003) (Sillers <i>et al.</i> , 2009)
-	<i>adc</i>	7,4 (13,6)	Keine Acetonbildung: Butanolproduktion sinkt	(Jiang <i>et al.</i> , 2009)

Im Jahr 1994 wurde von Nair *et al.* publiziert, dass das *adhE* Gen, kodierend für die Aldehyddehydrogenase, die zu den Alkoholen führt, erfolgreich in *Clostridium acetobutylicum* amplifiziert wurde. Das zeigte jedoch keinen Effekt auf die Höhe der Lösemittelkonzentration. Allerdings wurden im Vergleich zum Kontrollstamm mehr Alkohole produziert. Zusätzlich wurde durch die Kultivierung eines pSOL-Plasmid defizienten Stamms, dem nahezu alle solventogenen Gene fehlen, mit wiederhergestelltem *adhE* Gen gezeigt, dass die Fähigkeit Butanol zu produzieren ebenfalls wiederhergestellt wurde (Nair & Papoutsakis, 1994). Aus weiteren Versuchen wurde zudem deutlich, dass eine Überexpression des Genes *adhE* unter 10 g/L Butanol hauptsächlich zur Butanolproduktion führt, darüber hinaus jedoch auch in hohem Maße zur Ethanolbildung beiträgt (Nair *et al.*, 1994; Nair & Papoutsakis, 1994).

Green konnte 1996 zeigen, dass die Inaktivierung des Genes für die Phosphotransacetylase (*pta*) wie erwartet zu niedrigeren Acetatkonzentrationen führte. Es konnte auch festgestellt werden, dass die Inaktivierung der Butyratkinase (*buk*) zu niedrigeren Werten für Butyrat führt. Ziel dieser Inaktivierungen war es, den Kohlenstofffluss von den Säuren zu den Alkoholen umzuleiten. Was hier überraschend auffiel war, dass wenn weniger Butyrat produziert wurde, also mehr Butyryl-Phosphat vorlag, auch gleichzeitig mehr Butanol produziert wurde. Das deutet darauf hin, dass die Butanolproduktion auch von dem Butyryl-Phosphat-Level innerhalb der Zelle abhängt. Weiter optimierte Bedingungen und die gleichzeitige Überexpression von *adhE* führten zu Butanolkonzentrationen über 16 g/L (Harris *et al.*, 2000).

Im Jahr 1999 wurde das erste Mal von einer erfolgreiche Repression mittels antisense RNA (asRNA) berichtet. Die Repression lag jedoch nur bei 80 % (Desai & Papoutsakis, 1999). Mit dieser Technik konnten weitere Erkenntnisse über den solventogenen Stoffwechsel gewonnen oder bekannte untermauert werden. So konnte mit einer Phosphotransbutyrylase

3. Theoretische Grundlagen

(*ptb*) und einer Butyratkinase (*buk*) asRNA Mutante gezeigt werden, dass das Butyryl-Phosphat Level tatsächlich wichtig für die Butanolbildung (Desai & Papoutsakis, 1999) ist. Zudem konnte für die Acetonbildung gezeigt werden, dass nicht die Decarboxylase *adc*, sondern die CoA-Transferase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Tummala *et al.*, 2003).

Die Repression des *solR*, eines Regulators für die Gene, die für die Solventogenese zuständig sind, führte 1999 ebenfalls zu einer erhöhten Butanolkonzentration (Nair *et al.*, 1999b). Der genaue Effekt, beziehungsweise das Zusammenspiel für die Regulation ist umstritten, da verschiedene Gene oder Repressoren, wie zum Beispiel *Spo0A* hierfür verantwortlich zu sein scheinen (Thormann *et al.*, 2002).

Alternative Ansätze zur Verbesserung der Butanolproduktivität sind hauptsächlich darauf ausgerichtet die Butanoltoleranz zu erhöhen oder die Sporenbildung des Produktionsorganismus zu vermindern. Die Butanoltoleranz konnte mit der Überexpression von der Heat Shock Proteine *groES* und *groEL* vermutlich dadurch erhöht werden (Tomas *et al.*, 2003), dass solventogene Enzyme stabilisiert und gegebenenfalls wieder richtig gefaltet wurden. 2012 wurde von Mann gezeigt, dass eine Überexpression diverser Heat Shock Proteine zu einer besseren Adaption an hohe Butanolkonzentrationen führt (Mann *et al.*, 2012).

Im Jahr 2009 wurde eine Anwendung eines Deletionssystems „TargeTron“ von Jiang *et al.* publiziert. Hierbei konnte das *adc* Gen deletiert werden (Jiang *et al.*, 2009). Das Ergebnis zeigte, dass zwar die Acetonkonzentration wie erwartet gesenkt werden konnte, jedoch auch die Butanolkonzentration des Produktionsstamms gravierend sank.

Neben den systematischen Ansätzen existiert auch noch die Möglichkeit der zufälligen Mutagenese. Diese führte bei dem zu *Clostridium acetobutylicum* nahe verwandten *Clostridium beijerinckii* zu einem rekombinanten Stamm namens *Clostridium beijerinckii* BA 101 (Formanek *et al.*, 1997). Dieser Stamm ist in der Lage bereits während der Acidogenese Butanol zu produzieren. Das führt zur Produktion von Butanolkonzentrationen um 18,6 g/L (Ezeji *et al.*, 2004).

3.4 Ansätze mit anderen Mikroorganismen

Es gibt weitere Ansätze mit anderen Mikroorganismen Butanol herzustellen. Da die Gene für die Produktion von Butanol nicht weit verbreitet sind, wurde der CoA-abhängige Weg von *Clostridium acetobutylicum* in einfacher zugängliche oder butanoltolerantere Mikroorganismen transformiert. So zum Beispiel in *Escherichia coli* (0,55 bis 1,20 g/L Butanol; Atsumi *et al.*, 2008; Inui *et al.*, 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (2,5 mg/L Butanol) (Steen *et al.*, 2008), *Lactobacillus brevis* (0,3 g/L Butanol) (Berezina *et al.*, 2010), *Pseudomonas putida* (~0,6 g/L) und *Bacillus subtilis* (~0,1 g/L) (Nielsen *et al.*, 2009). Alle in diese Richtung gehenden Versuche führten hier zu einer Butanolbildung weit unterhalb der Wildtypproduktivität.

Erst kürzlich wurde von erfolgsversprechenden Ergebnissen mit rekombinanten *Escherichia coli* berichtet. Hier wurden allerdings nur teilweise Gene des Stoffwechselweges von *Clostridium acetobutylicum* eingesetzt. So wurden von Butanolkonzentrationen von 4,6 g/L (Bond-Watts *et al.*, 2011) und 30 g/L (Shen *et al.*, 2011) berichtet. Bei letzterem Wert ist es wichtig zu erwähnen, dass hier die Produktivität verzehnfacht wurde, indem ein reversibel funktionierendes Enzym von *Clostridium acetobutylicum* durch ein irreversibles eines anderen Organismus ersetzt wurde. Dieses Potential wurde bei *C. acetobutylicum* noch nicht ausgenutzt. Kombiniert mit der höheren Butanolverträglichkeit von *C. acetobutylicum* könnte sich diese Erkenntnis als sehr nützlich erweisen.

3.5 Substrate für die ABE Fermentation

Bei den Substraten für die ABE Fermentation zeigen Clostridien eine sehr große Bandbreite. Da sich die Substratkosten stark auf die Produktionskosten auswirken (Lee *et al.*, 2008; Lenz & Morelra, 1980) ist eine Flexibilität des Produktionsorganismus ein weiterer Aspekt, der für Clostridien als Butanolproduzenten spricht.

Clostridium acetobutylicum ist in der Lage Arabinose, Xylose, Glucose, Sucrose, Maltose, Cellobiose, Mannose, Mannitol und Lactose zu verstoffwechseln (Mes-Hartree & Saddler, 1982; Kanouni *et al.*, 1998; Bahl *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2008; Tangney & Mitchell, 2000). Diese Flexibilität lässt verschiedenste landwirtschaftliche Rohstoffe bzw. Reststoffe als Substrat zu. So wurde die Fermentierung von Molkereiabfällen (Bahl *et al.*, 1986), Apfeltrester (Jones & Woods, 1986), Maniok (Gu *et al.*, 2009) oder sogar organische

Haushaltsabfälle (López-Contreras *et al.*, 2000) durchgeführt. Ebenso konnte minderwertiges Glycerol zu Butanol fermentiert werden (Andrade & Vasconcelos, 2003).

Ein weiteres interessantes Argument ist, dass im Genom von *Clostridium acetobutylicum* diverse Gene für Cellulasen zu finden sind (Nölling *et al.*, 2001). Allerdings weist *Clostridium acetobutylicum* während des Wachstums auf Xylose geringe cellulolytische Aktivität auf, die bei einem Wachstum auf Glucose nicht vorhanden ist, was auf eine Substratinhibierung deutet (López-Contreras *et al.*, 2004). Gelänge es, diese vorhandenen Gene zu aktivieren, so würde sich zum Beispiel Lignocellulose direkt als ein sehr vielversprechendes Substrat anbieten.

3.6 Prozessführung und *in-situ* Produktabtrennung bei ABE Fermentationen

Bis 1986 wurden alle industriell genutzten Verfahren in Standkulturen durchgeführt (Jones & Woods, 1986). In Rührkesseln ist die Stoffwechselaktivität von *Clostridium acetobutylicum* erhöht (Yerushalmi & Volesky, 1985). Eine Untersuchung des Einflusses der Rührerdrehzahl auf den zentralen Stoffwechsel wird in dieser Veröffentlichung aufgezeigt. So nimmt die Butanolproduktivität bis zu einer Reynoldszahl von 4000 zu, bricht jedoch bei einer weiteren Steigerung wieder ein, da solventogene Clostridien scherkraftempfindlich sind.

Seither werden jedoch viele Veröffentlichungen zum Thema Butanolproduktion mit Mikroorganismen mit gerührten Systemen publiziert. Allgemein lässt sich feststellen, dass die bevorzugte Art der ABE Herstellung in der Bioindustrie das Satzverfahren ist, da eine einfache Prozessführung und eine geringe Gefahr der Kontamination damit einhergehen (Lee *et al.*, 2008). Im Satzverfahren sind alle Substrate und Supplements im Medium vorgelegt, es werden also keine flüssigen Komponenten, mit der Ausnahme von Titrationsmitteln, mehr zugegeben. Im Hinblick auf die Flüssigphase handelt es sich deshalb um ein geschlossenes System. Trotz des konstanten Gasstromes durch das Reaktionsmedium spricht man in der Bioverfahrenstechnik von einem Satzverfahren (Chmiel, 2006). Problematisch bei Satzverfahren sind jedoch die Totzeiten für die Reinigung und Vorbereitung. Zusätzlich können längere Verzögerungszeiten der Mikroorganismen zu Buche schlagen. Bei Zulaufverfahren kann eine durch Substrat- oder Produktlimitation auftretende Hemmung der Produktion teilweise umgangen werden. Wird ein kontinuierlicher Prozess gewählt, muss die Durchflussrate bei solventogenen Clostridien so gewählt werden, dass inhibierende Konzentrationen von Butanol vermieden werden können. Bahl *et al.*

beschrieb (1982) den Zusammenhang von Durchflussrate und Butanolkonzentration. Zudem sind phosphatlimitierte Bedingungen zu wählen, da ansonsten das Risiko besteht, dass die Zellen das Megaplasmid pSOL1 und somit die Fähigkeit Lösemittel zu produzieren, verlieren (Ezeji *et al.*, 2005).

Ein direkter Vergleich der drei Betriebsweisen bei einer ABE Fermentation wurde 2011 von Li *et al.* publiziert. Hierbei schnitt die kontinuierliche Betriebsweise mit der höchsten Butanolproduktivität wie –selektivität am besten ab. Der Nachteil des Satz- und Zulaufverfahrens waren die oben beschriebenen Totzeiten, allerdings konnten im Satzverfahren die höchsten Butanolkonzentrationen erreicht werden (Li *et al.*, 2011).

Bis in die 1960er wurden industrielle Prozesse im Satzverfahren durchgeführt (Zverlov *et al.*, 2006). Zu dieser Zeit wurde in der USSR, einem der wenigen Länder die Butanol auf mikrobiellem Weg herstellten, ein semikontinuierliches Verfahren eingesetzt.

Die Toxizität von Butanol auf die Produktionsorganismen stellt ein gravierendes Problem für einen industriellen ABE Prozess dar. So verwundert es nicht, dass schon frühe Arbeiten auf eine *in-situ* Abtrennung des Produktes abzielten. Drei der häufigsten *in-situ* Verfahren zur Abtrennung von Butanol aus wässriger Lösung sind im Folgenden kurz dargestellt:

Abbildung 3.7 zeigt schematisch das *in-situ* Strippen von Butanol mit Stickstoff. Dabei wird durch eine aktive Begasung der Fermentationslösung die Verdunstung des Butanols zur Abtrennung ausgenutzt. In einem anschließenden Kondensationsschritt wird das Lösemittel dann vom Gasstrom abgetrennt und kann gewonnen werden. Das Gas kann wiederverwendet werden und direkt im Kreislauf geführt werden.

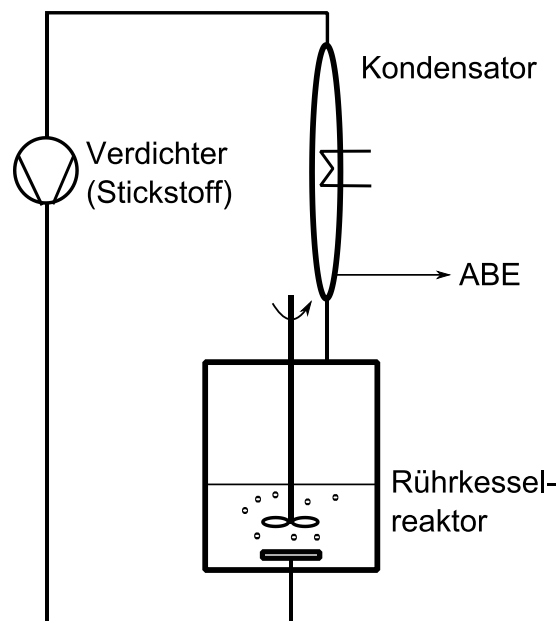


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung einer Produktabtrennung mittels Strippen von Butanol aus einem Rührkesselreaktor mit Stickstoff.

Anwendungsbeispiele für das Strippen mit Gas sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Das Strippen mit Gas ist eine geeignete Methode zur Produktabtrennung in der ABE Fermentation, da nach einer Anreicherung durch das Verfahren, Butanol in Wasser ab etwa 70 g/L nicht mehr löslich ist und direkt in einer zweiten Phase vorliegt. Allerdings werden alle gebildeten Lösemittel mit abgetrennt.

Eine weitere Möglichkeit Butanol *in-situ* aus wässriger Lösung abzutrennen ist die flüssig – flüssig Extraktion, schematisch dargestellt in Abbildung 3.8. Die Fermentationslösung wird, nach Abtrennung der Zellen, durch einen Extraktor geführt. Im Gegenstrom dazu läuft ein Extraktionsmittel, welches Butanol absorbiert. Decanol kann zum Beispiel hierfür eingesetzt werden (Evans & Wang, 1988). Um die meist toxischen Effekte des Extraktionsmittels auf die Zellen zu minimieren, kann eine Membran verwendet werden (Pertraktion). Diese Methode birgt den Nachteil, dass das Extraktionsmittel anschließend wieder vom Butanol getrennt werden muss und zum Teil auch in der Kulturlösung zu finden ist.

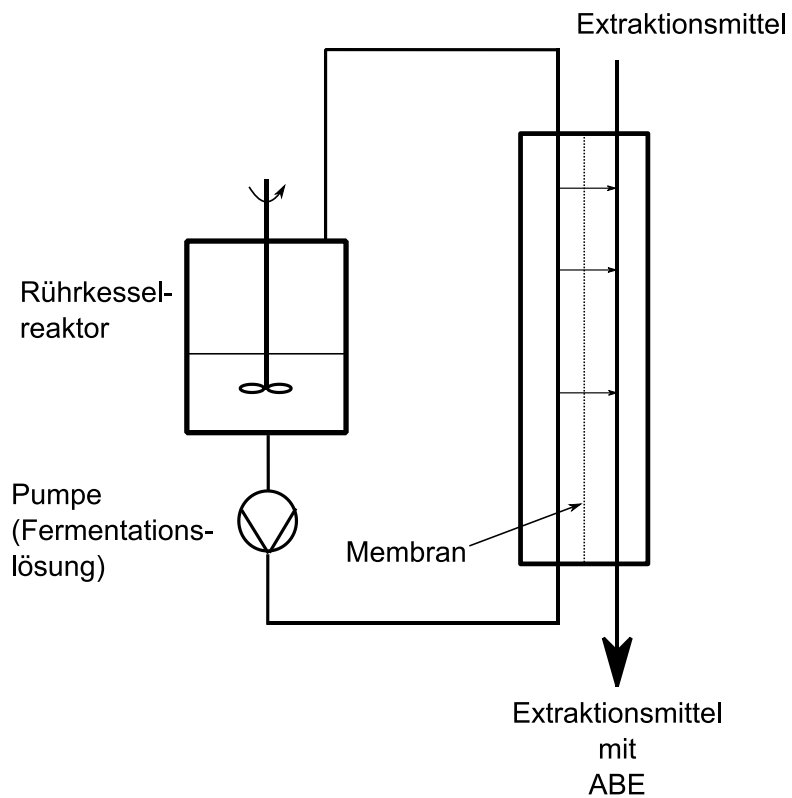


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung einer *in-situ* Produktabtrennung mittels Pertraktion.

Eine der Pertraktion sehr ähnliche Methode ist die in Abbildung 3.9 dargestellte Pervaporation. Hierbei wird kein Extraktionsmittel verwendet, sondern ein Unterdruck auf der Permeatseite der Membran angelegt. Dadurch kann Butanol je nach Membrantyp mehr oder weniger selektiv entfernt werden (siehe Tabelle 3.4). Eine poröse Silikonschicht kann hier verwendet werden.

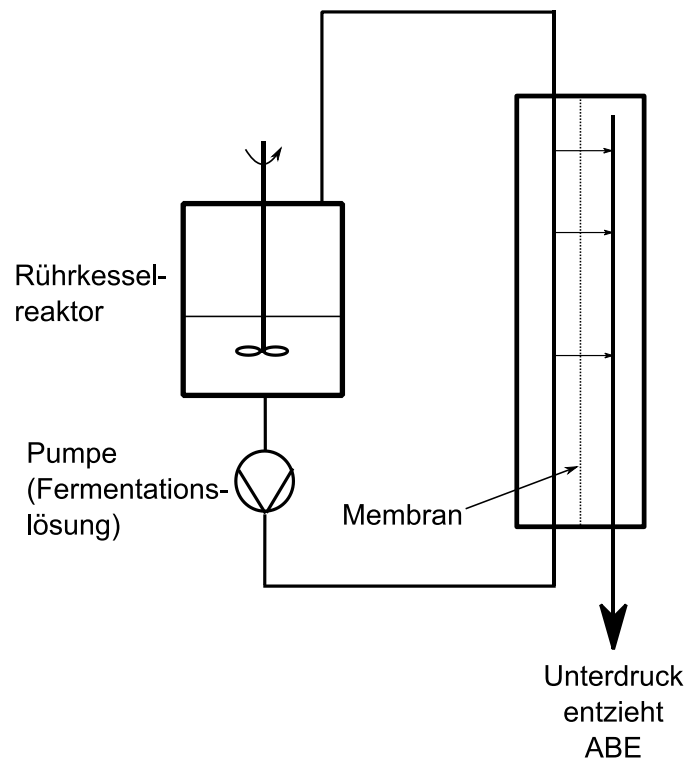


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung einer *in-situ* Produktaufreinigung mittels Pervaporation.

Als Membran für die Pervaporation kann zum Beispiel eine poröse Silikonschicht, aber auch ein nicht flüchtiges und nicht in Wasser lösliches Lösemittel in einer porösen Trägermembran (z.B. Oleylalkohol) verwendet werden, die selektiv für Butanol durchlässig ist (Matsumura *et al.*, 1988) (Qureshi & Blaschek, 2000). Butanol kann so durch diese Membran diffusiv entfernt werden.

Mit diesen Abtrennungsschritten kann eine inhibierende Konzentration von Butanol auf die Mikroorganismen umgangen werden. Die Kombination der Produktabtrennungen mit den Produktionsprozessen im Satz-, Zulaufprozess oder mit einem kontinuierlich geführten Prozess führt zu einer Steigerung der Produktivitäten und auch Ausbeuten. Eine Zusammenfassung verschiedener Anwendungen ist in Tabelle 3.4 zu finden. Die Vergleichbarkeit der absoluten Werte ist jedoch nicht gegeben, da verschiedene Stämme und Medien verwendet wurden.

Tabelle 3.4: Übersicht über die Ergebnisse diverser Prozesstypen mit verschiedenen *in-situ* Abtrennungsverfahren (modifiziert aus Lee *et al.*, 2008); Die Angaben sind auf die Gesamtheit der produzierten Lösemittel bezogen. * erfolgte mit *Clostridium acetobutylicum* Stämmen.

Prozess	Lösemittel- produktivität (g/(L h))	Lösemittel Ausbeute (g/g)	(aufsummierte) Lösemittel- konzentration (g/L)	Referenz
Immobilisierte Zellen (kontinuierlicher Betrieb)	15,8	0,38	7,9	(Qureshi <i>et al.</i> , 2000)
Membran Reaktor mit Zellrückhaltung (kontinuierlich)*	6,5	0,35	13	(Pierrot <i>et al.</i> , 1986)
Satzverfahren*	0,34	0,42	24,2	(Evans & Wang, 1988)
Satzverfahren mit Pervaporation*	0,5	0,42	32,8	(Evans & Wang, 1988)
Zulaufverfahren mit Pervaporation	0,98	0,43	165,1	(Groot' <i>et al.</i> , 1984)
Satzverfahren mit Gasstrippen	0,61	0,47	75,9	(Ezeji <i>et al.</i> , 2003)
Zulaufverfahren mit Gasstrippen	1,16	0,47	233	(Ezeji <i>et al.</i> , 2004)
Kontinuierliche Betriebsweise mit Gasstrippen	0,91	0,4	460	(Qureshi, & Blaschek, 2004)
Kontinuierlich betriebener Bioreaktor mit flüssig-flüssig Extraktion*	3,08	0,3	14,5	(Eckert & Schügerl, 1987)

3.7 Parallele Kultivierungstechniken

Neben der Bereitstellung von hochproduktiven Stämmen stellt die Optimierung von Prozessbedingungen einen wesentlichen Bestandteil bei der Entwicklung von kommerziell relevanten industriellen Bioprozessen dar. Um einen möglichst optimalen Prozess gestalten zu können, ist oft eine hohe Anzahl an Prozessvariablen, zum Beispiel diverse Medienkomponenten in verschiedenen Konzentrationen und die damit verbundenen Interaktionen, zu untersuchen. Die Zahl der damit verbundenen Experimente kann so sehr rasch ansteigen (Weuster-Botz, 2000). Eine statistische Versuchsplanung kann die Anzahl der Versuche zwar senken, jedoch sind die damit verbundenen Experimente im Labormaßstab immer noch sehr zeitintensiv. So liegt es nahe, dass die Versuche zum einen maßstabsverkleinert und zum anderen parallelisiert durchgeführt werden.

Um die gewonnenen Daten erfolgreich verwenden zu können muss eine Skalierung der Versuche in den kleineren Maßstab durchgeführt werden, das heißt es muss gewährleistet werden, dass die Versuche im kleinen Maßstab und im großen Maßstab vergleichbar ablaufen. Dazu werden oftmals Charakteristika wie Leistungseintrag, Mischzeiten oder dimensionslose Kennzahlen, wie zum Beispiel die Reynoldszahl, vergleichbar gestaltet.

Im Folgenden werden einige parallelisierte anaerobe und aerobe Verfahren in verschiedenen Maßstäben vorgestellt.

Standkulturen in anaeroben Septumflaschen

Schüttelkolben stellen in der Bioverfahrenstechnik aufgrund der einfachen Handhabung, einfacher Parallelisierung und günstigen Verfügbarkeit die Mehrheit der benutzten Reaktortypen dar (Weuster-Botz, 2000). Für aerobe Prozesse ist der nur eingeschränkt mögliche Sauerstoffeintrag, die praktische Begrenzung auf die Satzbetriebsweise, fehlende Online Analytik (pH, pO_2), sowie die oftmals nur eingeschränkt mögliche Maßstabsvergrößerung von Nachteil (Hortsch & Weuster-Botz, 2010a). Das anaerobe Pendant dazu sind anaerobe Septumflaschen (siehe Abbildung 3.10). Ein Butylstopfen wird verwendet um einen luftdichten Abschluss der Flasche zu garantieren und gleichzeitig eine Probenahme mit Spritzen und Kanülen zu ermöglichen. Die Kontrolle des pH ist nur sehr begrenzt möglich. Der anaerobe parallele Betrieb dieser Standkulturen ist jedoch problemlos möglich.

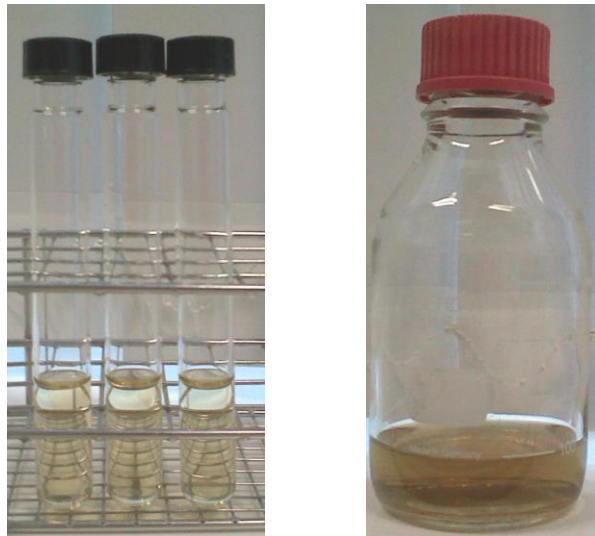


Abbildung 3.10: Möglichkeiten für parallele anaerobe Kultivierungen in Standkulturen: links: Hungate Röhrchen (5 - 10 Milliliter Volumen); rechts: anaerobe Septumflasche (20 – 1000 Milliliter Volumen) die mit einem Butylstopfen verschlossen ist

In der Literatur sind weitere aerobe nicht gerührte Reaktoren im Milliliter- und Mikroliter-Maßstab beschrieben (Betts & Baganz, 2006; Fernandes & Cabral, 2006; Schäpper *et al.*, 2009). Deren Anwendung wurde jedoch bisher nicht für anaerobe Zwecke gezeigt.

Miniaturisierte Rührkesselreaktoren

Miniaturisierte Rührkesselreaktoren bieten den Vorteil, dass eine Übertragbarkeit von Prozessen in größere Maßstäbe, aufgrund vergleichbarer Durchmischung leichter durchführbar ist. So wurden diverse miniaturisierte Rührkesselreaktoren, entwickelt (Hortsch & Weuster-Botz, 2010a). Hinsichtlich Automatisierung und Parallelisierung ist, nach Micheletti & Lye (2006), eines der zum damaligen Zeitpunkt fortschrittlichsten Systeme, der in (Puskeiler & Weuster-Botz, 2004; Puskeiler *et al.*, 2005a; Puskeiler *et al.*, 2005b; Weuster-Botz *et al.*, 2005) beschriebene 48-fach Parallelbioreaktorblock (siehe Abbildung 3.11, oben). In diesem Reaktorblock sind 48 Einwegrührkesselreaktoren mit einem Füllvolumen von jeweils 8 - 14 Milliliter angeordnet. Über eine sterile Gasabdeckung kann jeder Reaktor begast werden. An dieser Gasabdeckung sind 48 Rührorgane an Hohlachsen gleitend gelagert, die je in einen einzelnen Reaktor ragen. Die Rührorgane können magnetisch induktiv betrieben werden. Der Reaktionsraum kann beheizt werden und der Kopfraum des Reaktors kann gekühlt werden um die Verdunstung möglichst gering zu halten (siehe Abbildung 3.11, unten).

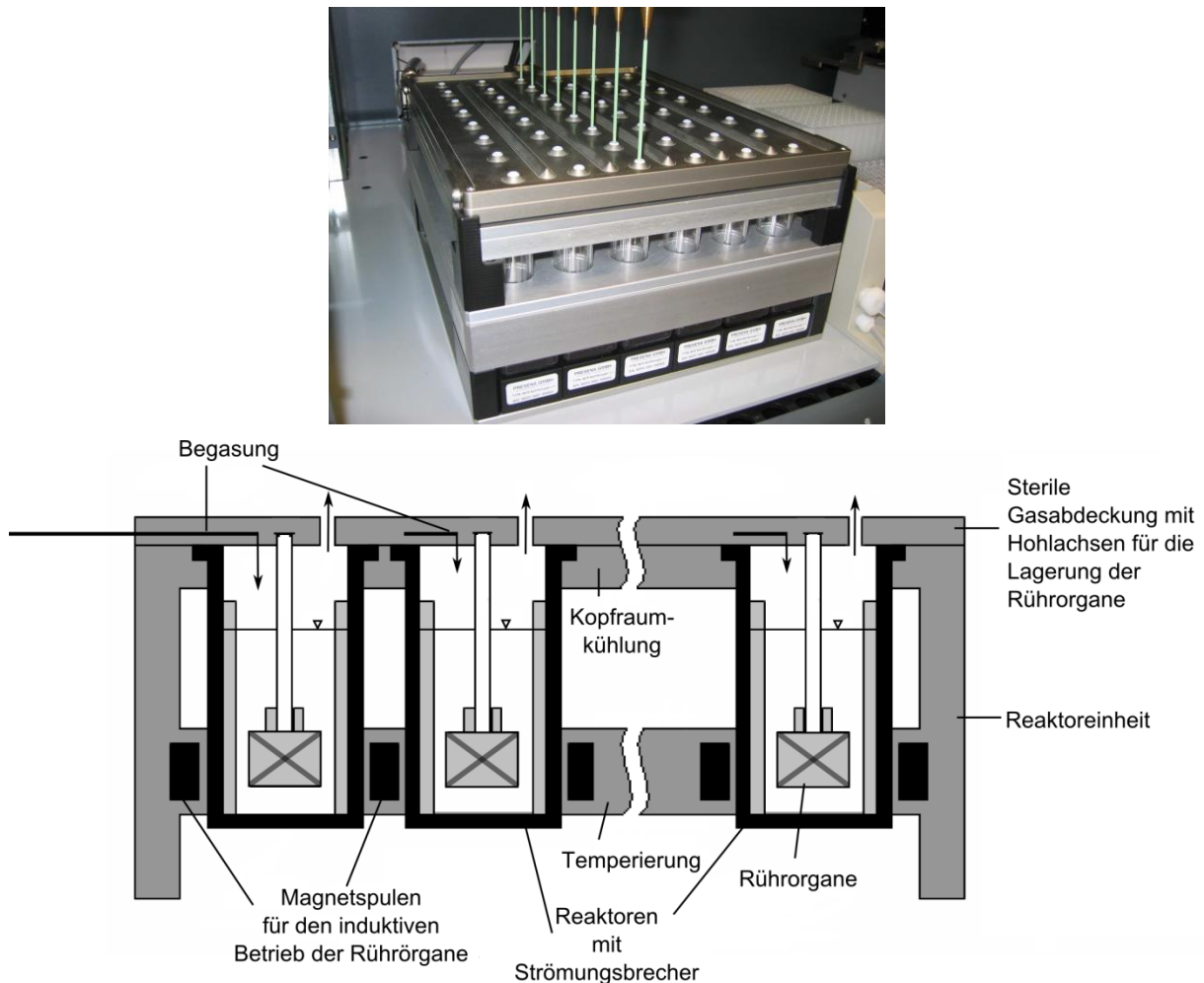


Abbildung 3.11: Oben: 48-facher Rührkesselreaktorblock (Kusterer *et al.*, 2008); unten: Funktionsskizze des Rührkesselreaktorblocks (nach Puskeiler, 2005a; modifiziert von Hortsch, 2011)

Der 48 Rührkesselreaktorblock wurde im Rahmen mehrerer Studien verwendet und/oder weiterentwickelt (Knorr *et al.*, 2007; Kusterer *et al.* 2008; Vester *et al.*, 2009; Hortsch *et al.*, 2010; Hortsch & Weuster-Botz, 2010b; Hortsch & Weuster-Botz, 2011; Schmidt & Weuster-Botz, 2012; Gebhardt *et al.*, 2011; Hoefel, *et al.*, 2012; Riedlberger & Weuster-Botz, 2012; Dennewald *et al.*, 2012). Die maßstabsverkleinerte Kultivierung von aeroben Kultivierungen wurden mit diesem Bioreaktorblock ebenfalls publiziert (Hortsch & Weuster-Botz, 2010b). Die Nutzung der Online-Messung von Prozessvariablen, wie pH oder pO_2 , ist möglich. Alle bisher publizierten Kultivierungen wurden mit aeroben Mikroorganismen durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1 Rekombinante Stämme

Eine wichtige Grundlage für Stämme die in dieser Arbeit charakterisiert werden wurde 2007 von der Forschungsgruppe um Professor Nigel Minton publiziert. Mit dem sogenannten ClosTron-System lassen sich verschiedene stabile *Clostridium acetobutylicum* Deletionsmutanten herstellen (Heap *et al.*, 2007). Dieses wurde von dem Kooperationspartner der Universität Rostock verwendet, um die in dieser Arbeit untersuchten Deletionsmutanten zu generieren. Als Selektionsmarker fungierte eine Erythromycin Resistenz. Bei Doppeldeletionsmutanten musste diese nach dem ersten Knock out wieder entfernt werden, was dazu führen kann, das die Doppeldeletionsmutanten aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierung der Resistenz auch unterschiedliche Phänotypen zeigen können. Für die Überexpressionsstämme wurde der Vektor pT-HydA-C-Tag verwendet.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Lütke-Eversloh (Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie, Universität Rostock, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Neben dem Wildtypstamm *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 wurden die Deletionsstämme

Clostridium acetobutylicum hbd::int (Hydroxybutyryl-CoA- Integrant),

Clostridium acetobutylicum adhE::int (Alkohol/Aldehyddehydrogenase- Integrant),

Clostridium acetobutylicum pta::int (Phosphotransacetylase- Integrant),

Clostridium acetobutylicum adc::int (Acetoacetatdecarboxylase- Integrant),

die Doppeldeletionsstämme

Clostridium acetobutylicum pta::int ΔRAM-adc::int,

Clostridium acetobutylicum adc::int ΔRAM-pta::int,

Clostridium acetobutylicum pta::int ΔRAM- ctfA::int, (+CoA-Transferase Integration)

sowie die Überexpressionsstämme

Clostridium acetobutylicum ÜE-pT::*crt* (Überexpression der Crotonase)

Clostridium acetobutylicum ÜE-pT::*bcd* (Überexpression der Butyryl-CoA Dehydrogenase)

untersucht.

4.2 Medien

Für die Kultivierungen von *Clostridium acetobutylicum* wurde für die Anzucht aus einer Sporensuspension *Clostridial Growth Medium* (CGM) verwendet (siehe Tabelle 4.1). Die Glucose wurde erst unmittelbar vor dem Animpfen zum Medium gegeben.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des *Clostridial Growth Mediums* (CGM).

KH ₂ PO ₄	0,75 g
K ₂ HPO ₄	0,75 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 g
MnSO ₄ × H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,01 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Hefeextrakt	5 g
Asparagin	2 g
H ₂ O	ad 1000 mL
	pH 6,6 (NH ₄ OH)
	anaerobisieren, autoklavieren
Glucose (50 g/L, w/v)	50 mL

Zur weiteren Kultivierung und Charakterisierung wurde ein definiertes Mineralsalzmedium (modifiziert von Monot *et al.*, 1982) verwendet (MS-MES Medium), siehe Tabelle 4.2. Als Puffer wurde 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) verwendet, da es sich hierbei um einen synthetischen, von *Clostridium acetobutylicum* nicht zu verstoffwechselnden Puffer handelt, der zugleich die Bestimmung der Biomasse nicht beeinflusst. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose verwendet.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Mineralsalz MES Mediums (mod. nach Monot *et al.*, 1982).

Glucose	120 g
KH ₂ PO ₄	1,1 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1,1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,44 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,964 g
Eisessig	4,6 mL
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	22 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1700 mL
	→ pH 6,6 (KOH)
PABA	16 mg
Biotin	160 µL einer 1 mg/mL Lösung
MES	42,6 g
H ₂ O	ad 2000 mL
	→ pH 5,5 (KOH)
anaerobisieren, autoklavieren	

Zur Anaerobisierung wurde die Lösung 20 Minuten gekocht und anschließend unter Stickstoffbegasung auf Eis abgekühlt. Die Medien für die Kultivierung in Flaschen wurden in der Anaerobarbeitsbank abgefüllt.

Zur Überprüfung der anaeroben Verhältnisse konnte der Redoxindikator Resazurin in der Konzentration von 1 mg/L hinzugefügt werden. Solange kein molekularer Sauerstoff im Medium vorhanden war, war dieses farblos. Bei einer rosa Färbung war davon auszugehen, dass Sauerstoff vorhanden war (Overmann, 2006). Dieser Indikator wurde nicht standardmäßig eingesetzt, da er die HPLC-Analytik beeinträchtigt.

Zudem wurde ein *Reinforced Clostridial Agar* (RCA) von Thermo Scientific noch käuflich erworben um eine Stammhaltung auf Agar-Platten zu ermöglichen. RCA konnte wie übliche Agarplatten hergestellt werden, musste jedoch einen Tag vor der Verwendung in die Anaerobwerkbank eingebracht werden um den Restsauerstoff diffusiv zu entfernen.

4.3 Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum*

Als strikt anaerobes Bakterium wurde *Clostridium acetobutylicum* mit den von Hungate und Macy entwickelten und 1973 beschriebenen (Macy *et al.*, 1972; Hungate & Macy, 1973) anaeroben Methoden und Techniken kultiviert. Neben der Medienherstellung und Vorkulturbehandlung wurde auch unter einer Anaerobwerkbank aus Polyvinylchlorid gearbeitet. Diese war ausgerüstet mit einer HEPA Filtereinheit um keimfreie Bedingungen zu erhalten (Speers *et al.*, 2009). Palladium Katalysatoren sorgten bei einer Stickstoff/Wasserstoffatmosphäre (~95 / 5 %) dafür, dass diffusiv eindringender und mit Schleusenvorgängen in niedrigen Konzentrationen eingebrachter Sauerstoff kalt zu Wasser umgesetzt wurde. Die dabei entstehende Feuchtigkeit wurde durch Trockenmittel aufgenommen, um ein Kondensieren an der Innenseite der Anaerobwerkbank zu verhindern. Die Sauerstoff- und Wasserstoffkonzentrationen in der Anaerobwerkbank wurden im ppm Bereich bestimmt um eine sauerstofffreie Atmosphäre dauerhaft gewährleisten zu können. Bei einem Schleusenvorgang wurde das Gas in der Schleuse jeweils dreimal auf 0,3 bar evakuiert und durch Formiergas (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff; Airliquide, München) ersetzt.

4.3.1 Stammhaltung und Aktivierung von *Clostridium acetobutylicum*

Die Sporenbildung von *Clostridium acetobutylicum* wurde dazu genutzt, um eine dauerhafte Stammhaltung mittels Sporensuspensionen bei -20 °C in 1,5 mL Aliquoten durchzuführen. Hierzu wurden die Mikroorganismen in MS-MES Medium kultiviert und nach 3 - 7 Tagen, sobald Sporenbildung mikroskopisch zu beobachten war, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Sporensuspension konnte so aerob gelagert werden.

Rekombinante Stämme, die in flüssigem Minimalmedium keine Sporenbildung zeigten, wurden auf RCA-Platten bei anaeroben Bedingungen in der Anaerobwerkbank bei 37 °C kultiviert. Nach 3 - 7 Tagen zeigten diese Stämme auch hier Sporenbildung oder mindestens Koloniebildung. Die Sporen-Platten konnten für weitere Versuche drei Monate verwendet werden. Bei Stämmen, die keine Sporenbildung zeigten, mussten neue Agarplatten nach zwei bis drei Wochen angesetzt werden. Ein Vorteil dieser Stammhaltung war, dass lediglich eine einzelne Kultur von den Platten für das Animpfen verwendet werden konnte (siehe Abbildung 4.1).

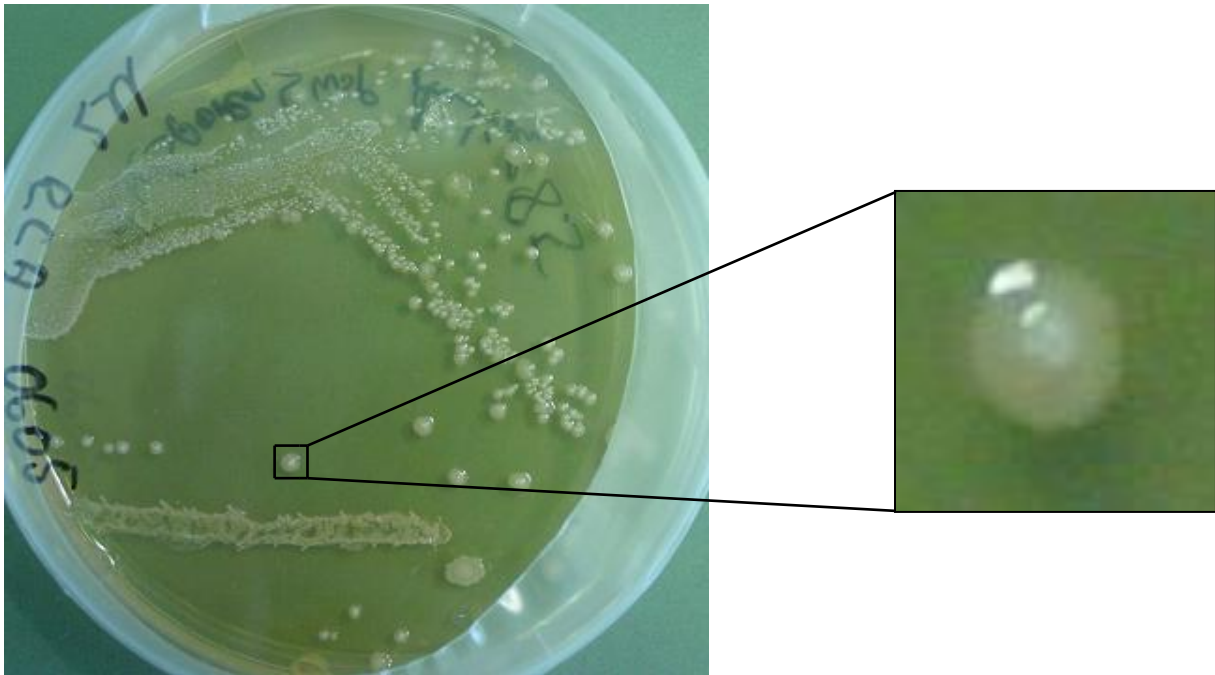


Abbildung 4.1: links: Vereinzlungsausstrich von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 auf einer Platte mit RCA-Medium. Rechts: Kulturform von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, einen ausgeprägten Hof mit einem Sporenschirm.

Die Vorgehensweise des Animpfens lief bei allen Stämmen ähnlich ab. Nach der Glucose Supplementierung der mit 5 mL CGM gefüllten Hungate-Röhrchen wurden 100 μ L der Sporensuspension, beziehungsweise die Sporen einer Kultur von den RCA-Platten hinzugegeben. Flüssige Sporensuspensionen wurden mit einer Kanüle injiziert. Sporen von RCA-Platten wurden unter der Anaerobwerkbank zugefügt. Im Anschluss wurde die inokulierte Kultur für 10 Minuten bei 80 °C im Wasserbad aktiviert. Bei rekombinanten Stämmen wurde danach noch Erythromycin (20 μ g/mL) als Selektionsmarker durch das Septum hinzugegeben. Die so vorbereitete Kultur wuchs über Nacht bei 37 °C an und konnte so für weitere Versuche verwendet werden.

4.3.2 Kultivierung in anaeroben Septumflaschen

Die Kultivierung in anaeroben Septumflaschen erfolgte aus mehreren Gründen (siehe auch Kapitel 3.7). Die Anzucht der Vorkulturen für die Versuche im Rührkesselreaktor war in den Flaschen zuverlässig reproduzierbar. Zudem konnten in den Flaschen Vorversuche

4. Material und Methoden

durchgeführt werden. Die Gewinnung der Sporen für die Stammhaltung war darüber hinaus hier gut durchführbar.

Die Vorbereitungen liefen dabei wie folgt ab: Die Flaschen wurden unter anaeroben Bedingungen mit dem bereits anaerobisierten MS-MES Medium zu 20 % (maximal 50 %) des Maximalvolumens der jeweiligen Flasche gefüllt. Geschlossen und in Wasser stehend wurden diese anschließend thermisch sterilisiert.

Mit einer wie in 4.3.1 vorbereiteten Kultur konnte anschließend über das Septum mit Spritzen angeimpft werden. Dazu wurde die vorgewärmte Septumflasche mit 96 %-igen Ethanol abgeflammt und unter sterilen Bedingungen 10 % angeimpft. Probenahmen in Septumflaschen wurden ebenfalls mit Spritzen durchgeführt. Zudem bildet sich bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* Überdruck durch gebildeten Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Dieser musste, um ein Abplatzen der Septen zu verhindern, spätestens alle zwei Tage mit einer Kanüle abgelassen werden.

Zur Gewinnung von Zellmasse für Versuche in den Rührkesselreaktoren wurden die Vorkulturen solange 10 % überimpft bis ausreichend Volumen für das Animpfen des Rührkesselreaktors vorhanden war.

4.3.3 Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab

Anaerobe Satzkultivierungen im Liter-Maßstab (L-Maßstab) wurden in Rührkesselreaktoren (Labfors, Infors GmbH, Bottmingen, Schweiz) mit einem Gesamtvolumen von 3,2 bzw. 2,0 Litern durchgeführt. Ein Standardversuch ist in Abbildung 4.2 aufgebaut. Im Anhang in Kapitel 12.2 sind die Gerätespezifikationen aufgelistet.

Reaktoraufbau

Bei den Satzversuchen wurde eine standardmäßige Ausrüstung verwendet, das Schema ist in Abbildung 4.2 zu erkennen. pH und Temperatur konnten über Sonden bestimmt und kontrolliert werden. Für die Probenahme waren ein verschließbares Rohr am Reaktor und ein in den Deckel integriertes Septum angebracht. Die Temperierung erfolgte über einen Doppelmantel. Die Temperatur wurde, wenn nicht anders erwähnt auf 37 °C geregelt. Ein Abgaskühler wurde mit 16 – 18 °C betrieben und sollte die Verdunstung der flüchtigen Komponenten reduzieren. Die Begasung wurde über einen thermischen Massendurchflussregler für das 3,2 Liter Gefäß auf 0,27 L/min und für das 2 Liter Gefäß auf

0,17 L/min eingestellt und durch ein Tauchrohr in das Flüssigvolumen eingebracht. Als Gas wurde Stickstoff (Airliquide, München) der Reinheit 5.0 (99,999 %) verwendet. Für die Durchmischung sorgten zwei Rushton Turbinen (Sechsblassscheibenrührer) sowie ein Strömungsbrecher mit 3 Blättern. Die Rührerdrehzahl konnte zwischen 50 und 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) eingestellt werden. Für den Fall eines Übersäumens wurde eine Abgasfalle mit Antischaummittel und einem Fassungsvermögen von zwei Litern in der Abgasstrecke installiert. Im Anschluss daran wurde ein Sterilfilter (0,45 μm) angebracht. Bei ausgewählten Versuchen wurde die Kohlenstoffdioxidkonzentration direkt im Abgasstrom bestimmt (siehe Abbildung 4.2). Für die Bestimmung der Lösemittelkonzentration im Abgas, wurde mit eine Pumpe in der GC direkt eine Probe aus dem Abgas gezogen.

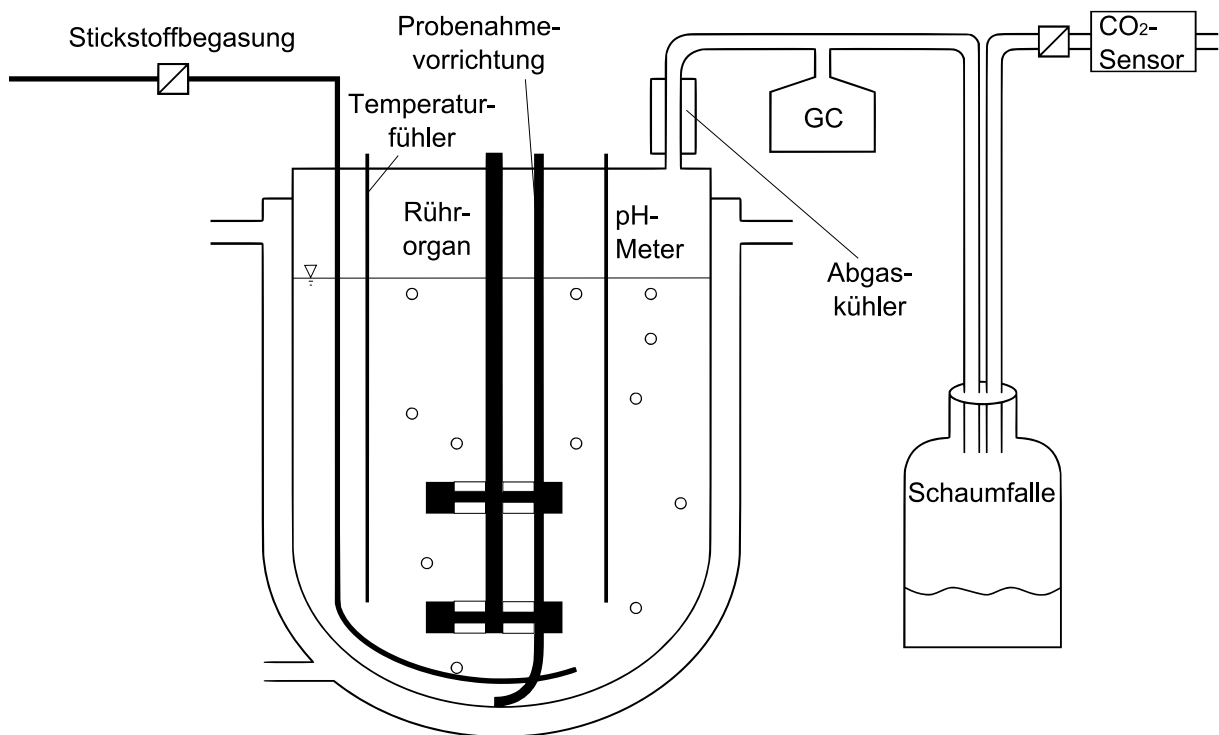


Abbildung 4. 2: Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors mit den Analysegeräten

Betrieb des Rührkesselreaktors mit anaeroben Mikroorganismen

Ein Anaerobisieren des Mediums wurde direkt mit der thermischen Sterilisation verbunden. Dazu wurde der mit Medium gefüllte Reaktor bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert und im Anschluss während des Abkühlens bei über 90 °C aus dem Autoklaven genommen und direkt mit 2 L/min Stickstoff und einer Rührerdrehzahl von 400 rpm für 20 Minuten bei 70 °C begast. Danach wurden die Temperatur, die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate auf die Betriebsbedingungen eingestellt. Die Inokulation erfolgte über ein Septum im Deckel und einem Adapter aus einem sterilen Silikonschlauch und zwei Kanülen. Durch die Verwendung eines berechneten Volumens an Vorkultur wurde eine anfängliche Biotrockenmassekonzentration von 0,09 bis 0,11 g/L eingestellt. Das Animpfen selbst wurde durch den Überdruck in den Septumflaschen mit der Vorkultur automatisch initiiert sobald die Kanüle in die kopfüber stehende Flasche eingebracht wurde. Direkt im Anschluss an das Animpfen wurde der pH mit 3 M Kaliumhydroxid auf 5,5 eingestellt. Da *Clostridium acetobutylicum* scherkraftempfindlich ist (Yerushalmi & Volesky, 1985) wurde eine Initialphase mit einer Drehzahl von 50 rpm zu Beginn jeder Kultivierung eingestellt. Sobald der pH durch die einsetzende Säurebildung der Zellen auf unter 5,4 gefallen war, wurde automatisch die Drehzahl auf 200 rpm erhöht. Für Versuche die „ohne Begasung“ durchgeführt wurden, wurde zu diesem Zeitpunkt auch die Begasung unterbrochen. Diese Initialbegasung war nötig, da die Gasbildung durch die Zellen in der Verzögerungsphase nicht ausreichend war, um diffusiv eindringende Raumluft durch die Abgasstrecke zu verdrängen. Die Probenahme erfolgte über ein Probenahmesystem (Labfors, Infors GmbH, Bottmingen, Schweiz; siehe Abbildung 4.3) oder, wenn möglich, direkt über ein im Deckel integriertes Septum. Die Proben wurde jeweils direkt im Anschluss für die HPLC Analyse vorbereitet und die Biotrockenmassekonzentration bestimmt.

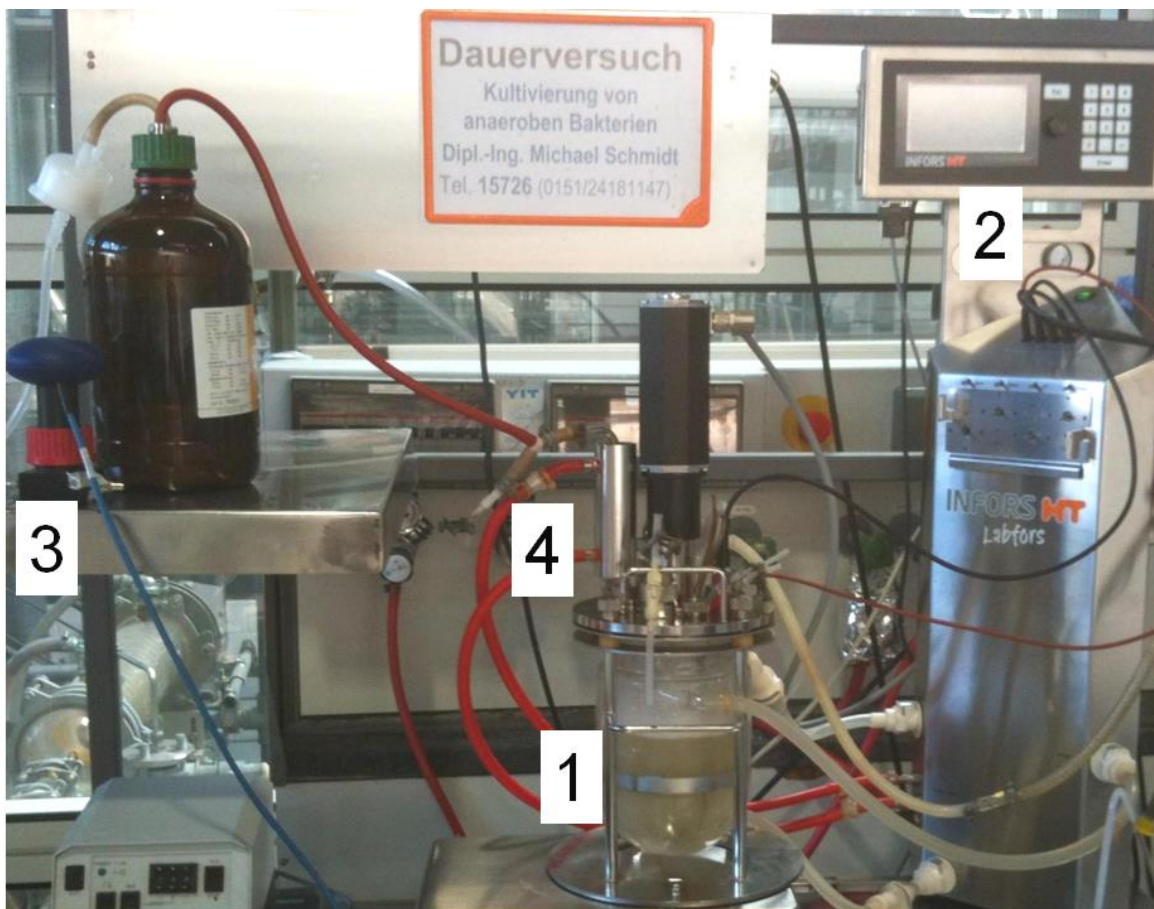


Abbildung 4.3: Aufbau des Rührkesselreaktors zur Kultivierung von Mikroorganismen: 1 Rührkesselreaktor (1 L); 2 Steuereinheit; 3 Abgasanalytik für Kohlenstoffdioxid; 4 Probenentnahmestelle zur Bestimmung flüchtiger Lösemittel.

Bilanzierung in einem idealen Rührkesselreaktor im Satzverfahren

Um ausschließen zu können, dass nicht beschriebene Stoffwechselwege auch während den Fermentationen aktiv sind, wurden Kohlenstoffbilanzen durchgeführt. Für die Berechnung einer Kohlenstoffbilanz wurden zwei Annahmen getroffen:

1. Es gilt das ideale Gasgesetz.
2. Während der Fermentation werden nur die Salze der Säuren Acetat, Butyrat und Laktat, die Lösemittel Aceton, Ethanol und Butanol, sowie Acetoin, Kohlenstoffdioxid und Biomasse gebildet.

4. Material und Methoden

Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurde die Stoffmenge an Gesamtkohlenstoff bestimmt. Dieser setzt sich, wie in Gleichung 4.1 beschrieben, zusammen. Neben dem sich im Reaktor befindlichem Kohlenstoff wird die Summe an entwichenem Kohlenstoffdioxid, sowie der durch alle bisherigen Probenahmen entfernte Kohlenstoff mit dem über die Lösemittel verdunsteten Kohlenstoff gebildet.

$$n_t(C_{gesamt}) = n_t(C_R) + \sum_0^t n_t(C_{CO_2}) + \sum_0^t n_t(C_{Probe}) + \sum_0^t n_t(C_{LM,verd})$$

Gleichung 4.1

$n_t(C_{gesamt})$	Gesamter Kohlenstoff zum Zeitpunkt t, mol
$n_t(C_R)$	Stoffmenge des Kohlenstoffs im Reaktor (Metabolite und Biomasse), mol
$n_t(C_{CO_2})$	Kohlenstoffmenge an entwichenem Kohlenstoffdioxid, mol
$n_t(C_{LM,verd})$	Kohlenstoffmenge an entwichenem Lösemittel, mol
$n(C_{Probe})$	Kohlenstoffmenge, die mit den Probenahmen entnommen wurde, mol

Das Reaktorvolumen wurde gravimetrisch aufgezeichnet. So konnte die Verdunstung berücksichtigt werden (siehe Gleichung 4.2).

$$V_{R,t} = V_{R,t_0} - V_{Verd,t} - \sum_0^t V_{P,t}$$

Gleichung 4.2

V_{R,t_0}	Volumen im Reaktor zum Zeitpunkt t_0 , L
$V_{Verd,t}$	Volumen, das bis zum Zeitpunkt t verdunstet ist, L
$V_{P,t}$	Volumen, das bis zum Zeitpunkt t für Probenahmen entnommen wurde, L

Die Kohlenstoffmenge in den entnommenen Proben bzw. im Reaktor wurde nach Gleichung 4.3 über die HPLC-Analytik und das jeweilige Volumen berechnet.

$$n_t(C_R) = n_t(C_{Biomasse}) + \sum_0^n c_n(x_t) \cdot V_{R,t} \cdot a_x \quad \text{Gleichung 4.3}$$

$c_n(x_t)$	Konzentration eines Stoffes X zum Zeitpunkt t im Reaktor, mol/L
$V_{R,t}$	Reaktorvolumen zum Zeitpunkt t, L
a_x	Anzahl der Kohlenstoffe des Stoffes X, -
$n_t(C_{Biomasse})$	Stoffmenge der in Biomasse gebundenen Kohlenstoffatome zum Zeitpunkt t, mol

Der Anteil des in der Biomasse fixierten Kohlenstoffs wird mit folgender Formel bestimmt:

$$n_t(C_{Biomasse}) = \frac{c_{BTM} \cdot 0,46}{M_C} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

c_{BTM}	Biotrockenmasse, g/L
M_C	Molare Masse Kohlenstoff; 12 g/mol

0,46 entspricht dem Gewichtsanteil an Kohlenstoff in Bakterien (Chmiel, 2006).

Der Anteil an Kohlenstoff, der als Kohlenstoffdioxid mit dem Abgas entwich, wurde über die Abgasanalytik im 20 Sekunden Takt erfasst, über Intervalle von 30 Minuten berechnet und anschließend aufsummiert:

$$V_{t,CO_2} = \sum_0^t \dot{v} \cdot \Delta t \cdot \frac{\text{Anteil } CO_2}{100} \cdot \frac{p_{Abgas}}{p_0} \quad \text{Gleichung 4.5}$$

V_{t,CO_2}	CO ₂ -Volumen, das der Fermentation bis zum Zeitpunkt t entwichen ist, L
\dot{v}	Volumenstrom, L/min
Δt	Zeitintervall, über das gemittelt wurde, min
$\text{Anteil } CO_2$	Anteil an CO ₂ im Abgas für das jeweilige Intervall (direkter Wert aus der Abgasanalytik), %

4. Material und Methoden

p_{Abgas} Druck im Detektor für das jeweilige Intervall, bar

p_0 Umgebungsdruck, 1,013 bar

Mit Hilfe des idealen Gasgesetzes konnte aus diesem Wert die Stoffmenge berechnet werden:

$$\sum_0^t n_t(C_{CO_2}) = \frac{p \cdot V_{t,CO_2}}{RT} \quad \text{Gleichung 4.6}$$

p Druck, Pa

R Allgemeine Gaskonstante 8,314 J/(mol·K)

T Temperatur, K

Die Stoffmenge an Kohlenstoff, die als verdampftes Lösemittel entwich, wurde über den Compact-GC bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\sum_0^t n_t(C_{LM,verd}) = \sum_0^n \left(\frac{m_{x,t}}{M_x} \cdot a_x \right) \quad \text{Gleichung 4.7}$$

Mit den bis zu den entsprechenden Zeitpunkten aufsummierten verdunsteten Massen der Lösemittel:

$$m_{x,t} = \sum_0^t \rho(\text{Stickstoff}) \cdot \dot{v} \cdot b_x \cdot \Delta t \quad \text{Gleichung 4.8}$$

$m_{x,t}$ Masse des verdampften Lösemittels von Beginn der Fermentation bis zum Zeitpunkt t , g

X Aceton, Butanol oder Ethanol

ρ *Stickstoff* Dichte des Abgases (Stickstoff), g/L

b_x Über Kalibrierung mit Hilfe der GC berechnete Beladung, g_x/g_{Abgas}

Δt Zeitintervall, min

Die Kalibrationsfaktoren [1/Flächeneinheit] wurden beispielhaft zu 0,00667 für Aceton, 0,000323 für Ethanol und 0,00106 für Butanol bestimmt.

Die so ermittelte Stoffmenge an Kohlenstoff wurde auf die zum ersten Zeitpunkt eingesetzte bezogen. Dieses Verhältnis bezeichnet die Wiederfindungsrate. Eine Wiederfindungsrate von 90 % - 100 % des vorgelegten Kohlenstoffs wurde im Rahmen der Messgenauigkeit der kombinierten Verfahren zur Analyse als gut befunden.

Glucoseaufnahmerate

Die Glucoseaufnahmerate Q_S wurde wie folgt definiert:

$$Q_S = \frac{dc(\text{Gluc})}{dt} = \frac{c_{t_1}(\text{Gluc}) - c_{t_2}(\text{Gluc})}{t_2 - t_1} \quad \text{Gleichung 4.9}$$

Q_S Glucoseaufnahmerate, g/(L h)

$c_{t_x}(\text{Gluc})$ Glucosekonzentration zum Zeitpunkt t_x , g/L

Produktivität

Die Butanol Produktivität wurde so definiert:

$$P_{\text{But}} = \frac{dc(\text{But})}{dt} = \frac{n(\text{But}_R) + n(\text{But}_{\text{verd}})}{t} \quad \text{Gleichung 4.10}$$

P_{But} Butanolproduktivität, g/(L·h)

Bei nicht begasten Versuchen konnte die verdunstete Menge an Wasser und Lösemittel wiederum vernachlässigt werden und somit direkt die Konzentrationen anstatt der Stoffmengen zur Berechnung verwendet werden. Die Produktivität wurde nur für Stämme berechnet, die über 9 g/L Butanol produziert hatten. Dies diente dazu, Stämme effektiv vergleichen zu können.

Selektivität

Die Selektivität von Butanol auf Glucose wurde wie folgt definiert:

$$S = \frac{dn(\text{But})}{dn(\text{Gluc})} = \frac{n_{t_1}(\text{But}_R) + n_{t_1}(\text{But}_{verd})}{n_{t_0}(\text{Gluc}) - n_{t_1}(\text{Gluc})} \quad \text{Gleichung 4.11}$$

S Selektivität, mol/mol

$n_{t_x}(\text{But}_R)$ Stoffmenge an Butanol im Reaktor zur Zeit t_x , mol

$n_{t_x}(\text{But}_{verd})$ Verdunstete Stoffmenge an Butanol bis zur Zeit t_x , mol

$n_{t_x}(\text{Gluc})$ Stoffmenge an Glucose zum Zeitpunkt t_x im Reaktor, mol

Bei nicht begasten Versuchen wurde die verdunstete Menge an Wasser und Lösemittel vernachlässigt und somit konnten direkt die Konzentrationen anstatt der Stoffmengen zur Berechnung verwendet werden. Zu Vergleichszwecken wurde die Selektivität zum selben Zeitpunkt wie die Produktivität berechnet.

4.3.4 Parallele Satzkultivierungen in Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab

Für parallele Ansätze wurde ein Reaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab, der am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelt wurde (siehe Kapitel 3.7; Gerätespezifikationen sind im Anhang Kapitel 12.2), verwendet. Der Rührkesselreaktorblock wurde bisher im Rahmen mehrerer Studien verwendet und/oder weiterentwickelt, beispielsweise von Kusterer *et al.* (2008).

Aufbau des Bioreaktorblocks

Im Bioreaktorblock sind acht Reihen mit jeweils sechs Einwegreaktoren aus Polystyrol mit jeweils einem Arbeitsvolumen von 8 - 14 Milliliter angeordnet (siehe Abbildung 4.4). Die Temperaturkontrolle erfolgt über einen Thermostaten, der über einen Temperaturfühler, der im Bioreaktorblock angebracht ist, die Temperatur auf den gewünschten Sollwert (37 °C) regelt. Die magnetisch-induktiven Rührorgane wirken bei ausreichend hohen Drehzahlen (ca. 1700 rpm) gasinduzierend (Hortsch, 2011). Die Rührorgane sind auf Hohlachsen, die direkt an der autoklavierbaren Sterilgasabdeckung befestigt sind, gleitend gelagert und können über ein Steuergerät mit einer definierten Rührerdrehzahl zwischen 200 - 2800 rpm

betrieben werden (siehe Abbildung 4.4, schematische Darstellung in Abbildung 3.11). Eine Rührerausfallerkennung war im Einsatz um einem Ausfall einzelner Rührorgane entgegen zu wirken. Sobald ein Rührer als ausgefallen detektiert worden ist, wurden alle Rührer neugestartet. Fiel ein Rührer öfter als 3-mal nacheinander aus, so wurde er als nicht mehr relevant gekennzeichnet und für den weiteren Versuchsverlauf nicht weiter berücksichtigt. Eine Kopfraumkühlung wurde mit einem separaten Thermostat auf $T = 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und dazu eingesetzt um das Verdunsten von hauptsächlich Lösemittel zu vermindern (siehe Abbildung 4.5). Das hier anfallende Kondensat lief zurück in die einzelnen Reaktoren. Steriles Stickstoff Gas (Airliquide, München; 99,999 %) wurde mit einem zwischen 1 L/h und 99 L/h manuell regelbaren Massedurchflussmesser (Vögtlin Instruments, Aesch, Schweiz) über die Sterilgasabdeckung gleichmäßig auf die Reaktoren verteilt. Zudem war die Sterilgasabdeckung so konstruiert, dass über das ausströmende Gas eine Sterilbarriere nach außen aufrechterhalten werden konnte. Eine über der Sterilgasabdeckung angebrachte Gasabsaugung sorgte dafür, dass während des Betriebs keine Aerosole aus dem Bioreaktorblock entweichen konnten.

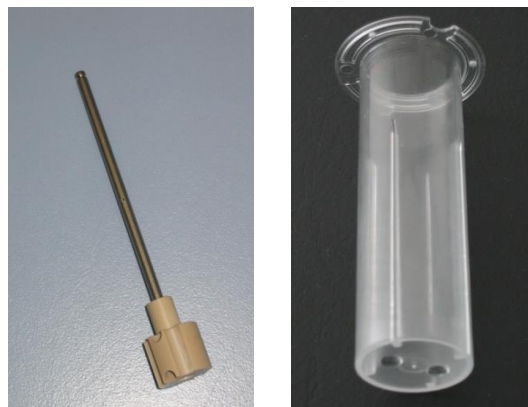


Abbildung 4.4: links: Rührorgan auf einer Hohlachse; rechts: Einwegbioreaktor aus Polystyrol

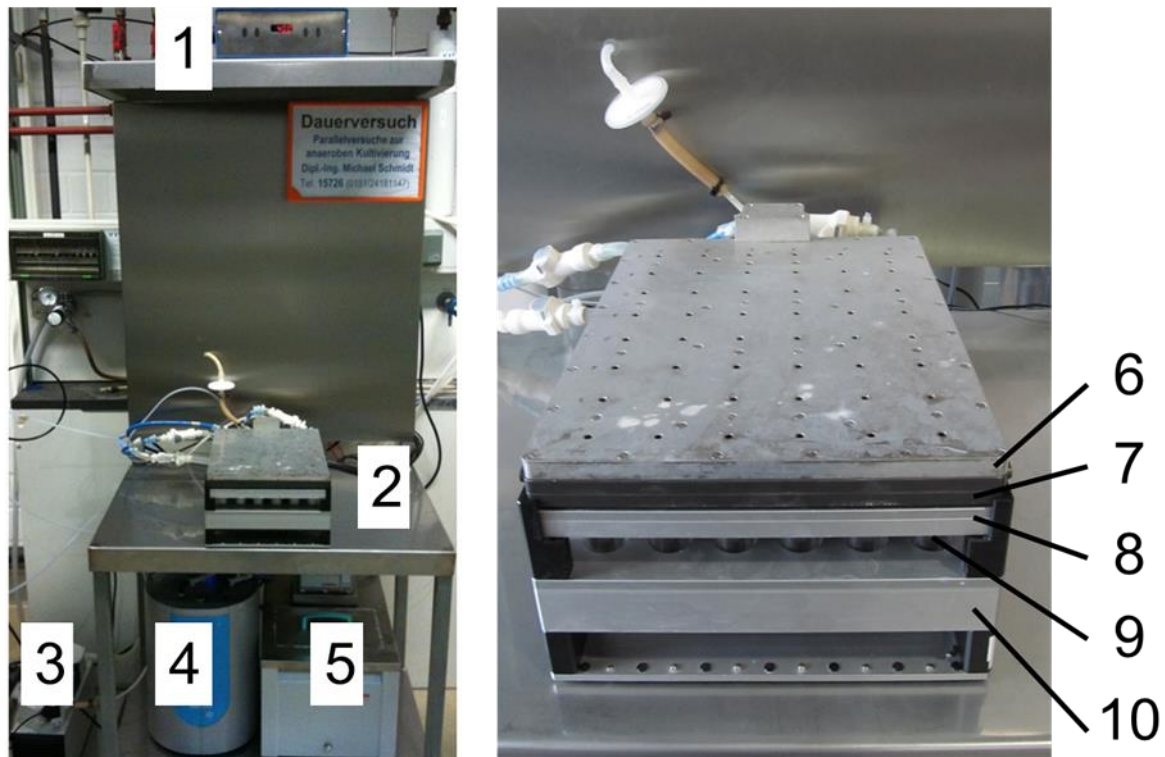


Abbildung 4.5: Aufbau des Bioreaktorblocks für anaerobe Kultivierungen: Links: 1 Steuereinheit; 2 48-fach Bioreaktorblock; 3 Pumpe für die Gasabsaugung; 4 Kühlelement für die Abgaskühlung; 5 Heizelement für die Kultivierung Rechts: 6 Gasabsaugung; 7 Sterilgasabdeckung; 8 Wärmetauscher für die Kopfraumkühlung; 9 Reaktoren; 10 Wärmetauscher zur Temperierung des Mediums.

Anwendung des Bioreaktorblocks für pH-unkontrollierte Satzkultivierungen anaerober Mikroorganismen

Um eine sauerstofffreie Atmosphäre für die Arbeiten mit den strikt anaeroben Mikroorganismen zu gewährleisten, wurden alle Vorbereitungen für Kultivierungen mit dem Rührkesselreaktorblock innerhalb der Anaerobwerkbank durchgeführt. Die Reaktoren aus Polystyrol wurden vor dem Versuch über Nacht unter der Anaerobwerkbank gelagert. Dies führte dazu, dass in den Kunststoff eingelagerter Sauerstoff entfernt wurde. Die Medien konnten bei der anaeroben Atmosphäre offen gehandhabt werden. Animpfvorgänge wurden mit Pipetten, nicht mit Spritzen und Kanülen, direkt in, mit anaeroben Medium gefüllten, Septumflaschen durchgeführt, da das eine genauere Arbeitsweise gewährleistete. Der Schaumbildung wurde mit 100 $\mu\text{L/L}$ Polypropylenglykol (PPG) als Antischaummittel entgegengewirkt. PPG zeigte bei Vorversuchen keinen Effekt auf den Kultivierungen von

Clostridium acetobutylicum. Wie im Liter-Maßstab wurden die Reaktionsansätze mit 0,09 - 0,11 g/L Biomasse angeimpft und der Start-pH, falls nicht extra deklariert, mit 3 M KOH auf 5,5 eingestellt. Als weitere Startbedingungen wurden in allen Versuchen 12 mL Füllvolumen bei einer Rührerdrehzahl von 400 rpm und einer Temperatur von 37 °C eingesetzt. Die Kopfraumkühlung wurde auf 2 °C eingestellt. Nachdem der gesamte Bioreaktorblock vollständig zusammengebaut und ausgeschleust war, wurde er direkt an eine Stickstoffbegasung angeschlossen (1 Stunde bei 48 L/h; 1 Stunde bei 24 L/h; anschließend Betriebsbedingungen), um den Stickstofffluss innerhalb der Sterilgasabdeckung und Gasabsaugung zu stabilisieren. Probenahmen wurden in regelmäßigen Abständen manuell mit Spritzen und langen Kanülen (120 mm) durchgeführt. Die Analyse der Kulturüberstände wurde mit einem Einstrahlphotometer und einem HPLC System durchgeführt. Alle Versuche im Milliliter-Maßstab wurden standardmäßig im Dreifachansatz durchgeführt. Die Bestimmung der Verdunstungsrate von Lösemitteln in diesem System wurde über eine Bilanzierung des eingesetzten und nach einer definierten Betriebszeit im Medium wiedergefunden Lösemittel durchgeführt. Eine online Applikation einer Compact-GC war aufgrund des niedrigen Volumenstromes durch die einzelnen Reaktoren hier nicht möglich.

4.3.5 Leistungseintrag in Rührkesselreaktoren

Für die am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik vorhandenen Reaktortypen wurde diese Charakteristik bereits erstellt und der Leistungseintrag experimentell bestimmt (Hortsch, 2011). In Abbildung 4.6 ist der volumetrische Leistungseintrag für die Rührkesselreaktoren im Bioreaktorblock sowie für einen Rührkessel im Liter-Maßstab mit einer Rushton Turbine über der Rührerdrehzahl dargestellt. Der Leistungseintrag kann für eine Maßstabsübertragung in der Bioverfahrenstechnik einen kritischen Parameter darstellen. Vor allem dann, wenn die Mikroorganismen scherkraftempfindlich sind, wie zum Beispiel Säugerzellen (Chmiel, 2011) oder *Clostridium acetobutylicum*.

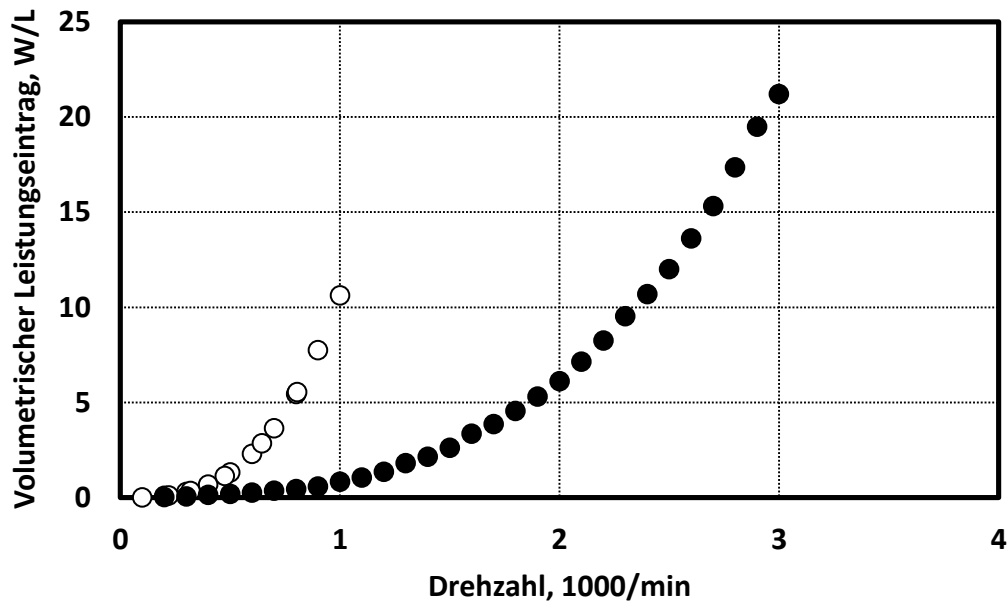


Abbildung 4.6: Volumetrischer Leistungseintrag der gasinduzierenden Rührorgane (schwarze Kreise) und einer Standard Rushton Turbine im Liter-Maßstab (weiße Kreise) (modifiziert von Hortsch, 2011).

4.4 Analysemethoden

4.4.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde photometrisch über die optische Dichte bei 600 nm (OD) von, mit Phosphatpuffersalzlösung (PBS) entsprechend verdünnten, Zellsuspensionen gemessen. Der lineare Messbereich lag zwischen 0,1 und 0,3. Die Absorption des Mediums selbst wurde bei jedem Versuch von den Proben subtrahiert.

Zusätzlich wurden die Biotrockenmassenkonzentrationen für den Referenzprozess im Liter-Maßstab gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden 1,5 mL Eppendorfgefäße vorgetrocknet. Für jeden Messpunkt wurden im Dreifachansatz je 1,5 mL der Probe in die Eppendorfgefäße gegeben. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15000 g, 10 min) vom Überstand getrennt, der Überstand für weitere Analysen verwendet und die Zellpellets in den Eppendorfgefäßen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (80 °C, mindestens 48 h). Die durch erneutes Wiegen bestimmte Gewichtsänderung entsprach der Gesamtbio-trockenmasse in 1,5 mL Volumen.

Die optische Dichte ist linear zur Biotrockenmasse (Gleichung 4.12). Es konnte ein Korrelationsfaktor von näherungsweise 0,44 experimentell bestimmt werden.

$$c_{\text{BTM}} = a_x \times \text{OD}$$

Gleichung 4.12

c_{BTM}	Biotrockenmassekonzentration, g/L
a_x	Korrelationsfaktor, g/L
OD	Optische Dichte (600 nm), -

Es gilt zu beachten, dass leichte Abweichungen für rekombinante Stämme möglich sind.

4.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die gefilterten (0,2 µm; regenerierte Cellulose) Überstandsproben wurden bis zur Analyse bei 4 °C in Rollrandflaschen mit Mikroeinsatz (0,1 mL) gelagert.

Die HPLC Analytik wurde für die Bestimmung der in Lösung vorliegenden Konzentrationen des Substrats Glucose sowie der Produkte Acetat, Butyrat, Aceton, Ethanol, Butanol, Laktat, Acetoacetat und Acetoin verwendet.

Zur Trennung der verschiedenen Stoffe wurde die Methode von Buday *et al.* (1990) weiterentwickelt um bei 40 °C mit einer Aminex HPX-87 H Säule (300 x 7,8 mm) mit 5 mM Schwefelsäure als mobile Phase bei einer Flußrate von 0,6 mL/min und einem Injektionsvolumen von 10 µL zu quantifizieren.

Für die Analyse wurde der Brechungsindex-Detektor für Glucose und die Alkohole Ethanol und Butanol verwendet. Für die Bestimmung der restlichen Metabolitkonzentrationen wurde ein Diodenarraydetektor verwendet.

Aceton und Acetoin wurden bei einer Wellenlänge von 269 nm und Acetat, Butyrat, Acetoacetat und Lactat bei einer Wellenlänge von 210 nm bestimmt. Die ungefähren Retentionszeiten und der jeweils verwendete Detektor sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Detektoren und Retentionszeiten der HPLC Analytik.

Metabolit	Detektor (Wellenlänge)	Retentionszeit, Minuten
Glucose	RI	9,0
Ethanol	RI	21,0
Butanol	RI	36,0
Lactat	DAD (210 nm)	13,5
Acetat	DAD (210 nm)/RI	15/15,1
Acetoacetat	DAD (210 nm)	14,5
Butyrat	DAD (210 nm)	22,5
Acetoin	DAD (269 nm)	18
Aceton	DAD (269 nm)	22,5

Als zu Grunde liegender Standard wurden definierte Gemische verwendet und in vier verschiedenen Konzentrationsstufen gemessen.

4.4.3 Bestimmung der Zusammensetzung des Abgases

Lösemittel:

Zur Bestimmung der flüchtigen Komponenten im Abgas wurde ein Compact-Gaschromatograph der Firma Axel Semrau GmbH (Sprockhöfel, Deutschland) mit einer Dünnschichtkapillarsäule (FS-FFAP-CB-0.5 30 m, 0,44 mm) mit einer Filmdicke von 0,5 µm verwendet. Der Anteil an Aceton, Ethanol und Butanol im Abgas wurde über eine Kalibrierung ermittelt. Genaue Methoden und Betriebsparameter sind im Anhang zu finden (Kapitel 12.1). Ein Flammenionisationsdetektor wurde für die Detektion benutzt. Die für die Analyse notwendige Gasmenge wurde automatisch von einer Pumpe aus dem Abgasstrom angesaugt.

Kohlenstoffdioxid:

Der für die Kohlenstoffbilanzierung wichtige Anteil an Kohlenstoffdioxid im Abgas wurde mittels Gasanalytik von BlueSens (Herten, Deutschland) bestimmt. Hier wurde ein Infrarot Absorptionsdetektor verwendet. Das gesamte Abgas wurde direkt durch die Messkammer geleitet. Zur Auswertung wurde das Programm FermVis verwendet.

4.4.4 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentrationen erfolgte mit einem enzymatischen Test von R-Biopharm (Ammoniak UV Test, Nr. 11112732035) photometrisch bei 340 nm. Bei der Durchführung wurde sich an die beiliegenden Angaben des Herstellers gehalten. Bei einer erhöhten Zahl an Proben wurden die Messungen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden die Volumina entsprechend kleiner gewählt.

4.4.5 Bestimmung der Verdunstungsraten

Für Verdunstungsmessungen an den Rührkesselreaktoren wurden für den Liter- und den Milliliter-Maßstab die gleichen Ausgangsbedingungen gewählt. Dem Standard MS-MES Medium wurden 8 g/L Butanol, 6 g/L Aceton und 2 g/L Ethanol zugefügt. Diese Konzentrationen entsprechen den im realen Prozess zu erwartenden Maximalwerten. Die Begasungsrate im 1 Liter-Maßstab entsprach 170 mL/min. Die Begasungsrate für den Milliliter-Maßstab wurde von Versuch zu Versuch zwischen 2 mL/(mL Reaktor) und 16 mL/(min Reaktor), das entspricht insgesamt 6 L/h und 48 L/h, variiert um vergleichbare Bedingungen zu finden.

Während des Versuches bei 37 °C wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden regelmäßig die Lösemittelkonzentration mittels HPLC analysiert. Die Rührerdrehzahlen wurden nach dem Leistungseintrag (~ 0,2 W/L) auf 200 rpm im Liter-Maßstab und auf 400 rpm im Milliliter-Maßstab eingestellt.

Im Bioreaktorblock wurden hierbei jeweils im Dreifachansatz Proben von zufällig ausgewählten Reaktoren genommen. Die Versuche wurden in jedem System zweimal unabhängig wiederholt.

5. Referenzprozess zur ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

Als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen von Reaktionsbedingungen oder rekombinanten Stämmen wurde zunächst eine Referenzkultivierung mit dem Wildtypstamm *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 im Satzverfahren etabliert. Hierzu wurden die in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Standard Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab verwendet.

5.1 Reproduzierbarkeit

Für die Etablierung eines Referenzprozesses wurden unterschiedliche Ausgangsbedingungen untersucht. Zunächst wird auf die Vorkultur und den Start-pH eingegangen.

Vorkultur

Das Animpfen mit einer durch Zentrifugieren aufkonzentrierten Zellsuspension führte im Vergleich zum Animpfen direkt aus einer anaeroben Septumflasche zu einer Verlängerung der Verzögerungszeit von über 24 Stunden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls konnte keine Vorkultur mit einem Alter von über 20 Stunden verwendet werden, da die Zellen zum Teil nicht mehr anwachsen oder der Wechsel in die Solventogenese nicht mehr erfolgte. Aus diesem Grund wurden die Vorkulturen des Wildtypstamms nach exakt 16 Stunden verwendet.

pH

Bei den Kultivierungen von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 mit einem Anfangs-pH von pH 5,8 in MS-MES Medium trat nicht reproduzierbar ein sog. „acid crash“ auf (siehe Kap. 3.4.3). Der pH sank rapide, die Zellen stellten das Wachstum und die Aufnahme von Säuren ein und der Prozess stagnierte (siehe Abb. 5.1). So konnte der Verlauf der Butanolkonzentration im Rührkessel nicht reproduziert werden. Dieses Problem trat bei einem verringerten Anfangs-pH von pH 5,5 nicht mehr auf, deshalb wurde dieser als Referenzbedingung gewählt.

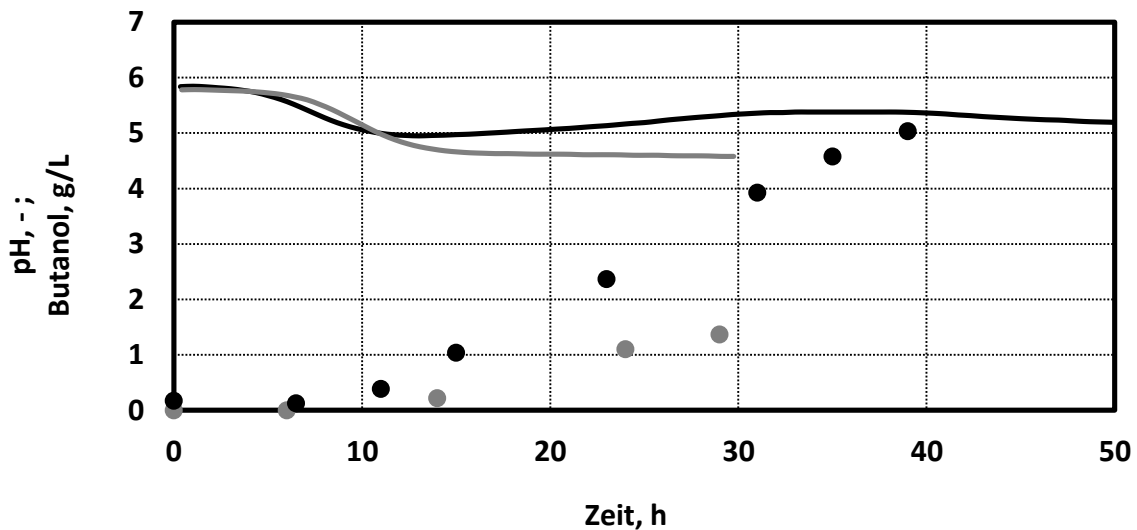


Abbildung 5.1: Zeitverlauf des pH (durchgängige Linien) bei Kultivierungen mit einem Anfangs-pH von 5,8 mit den dazugehörigen Butanolkonzentrationen (Einzelmessungen). Die zugehörigen Messwerte sind farblich identisch. Neben einer „normalen“ Kultivierung (schwarz) ist eine Kultivierung mit einem sogenannten „acid crash“ zu erkennen (grau). (2 L; T = 37 °C; n = 200 rpm; Satzverfahren; MS-MES Medium; *Clostridium acetobutylicum*).

Eine weitere Auffälligkeit war, dass die Verzögerungszeiten bei verschiedenen Reaktionsansätzen stark unterschiedlich waren. Das führte dazu, dass der Zeitpunkt der Erhöhung der Rührerdrehzahl von 50 rpm auf 200 rpm nicht zu einem festgelegten Zeitpunkt durchführbar war, da sich die Zellen sonst zum Zeitpunkt der Erhöhung in nicht vergleichbaren Wachstumsstadien befanden. Um dieses Problem zu umgehen wurde die Erhöhung der Rührerdrehzahl pH gesteuert durchgeführt. Als Grenzwert wurde pH 5,4 gewählt, da bei diesem eine OD von 1 vorlag und sich die Kultur nicht mehr in der Verzögerungsphase befand. Sobald der pH im Reaktor diesen Wert unterschritt, wurde die Rührerdrehzahl automatisch erhöht. Dieser Zeitpunkt wurde als Startzeitpunkt ($t = 0$ h) definiert.

Abbildung 5.2 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Biotrockenmassekonzentration sowie den Verlauf der Glucosekonzentration während der Referenzkultivierung im Rührkesselreaktor. Gezeigt sind die Daten von unabhängigen Satzprozessen. Zum Ende der Fermentation lagen noch gut 10 g/L Glucose im Reaktionsansatz. Die Biotrockenmassekonzentration durchlief ein Maximum. Abbildung 5.2 B zeigt den pH Verlauf beim Referenzprozess. In den Abbildungen 5.2 B und 5.3 A sind die beiden Phasen, Solventogenese und Acidogenese, gut

5. Referenzprozess zur ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

zu erkennen. Bis zu einer Prozesszeit von 10 Stunden wurden Säuren gebildet und der pH sank von pH 5,5 ausgehend auf pH 4,6. Während der anschließenden Solventogenese wurden bis $t = 30$ Stunden Lösemittel gebildet und Säuren wieder aufgenommen (siehe Abb. 5.3).

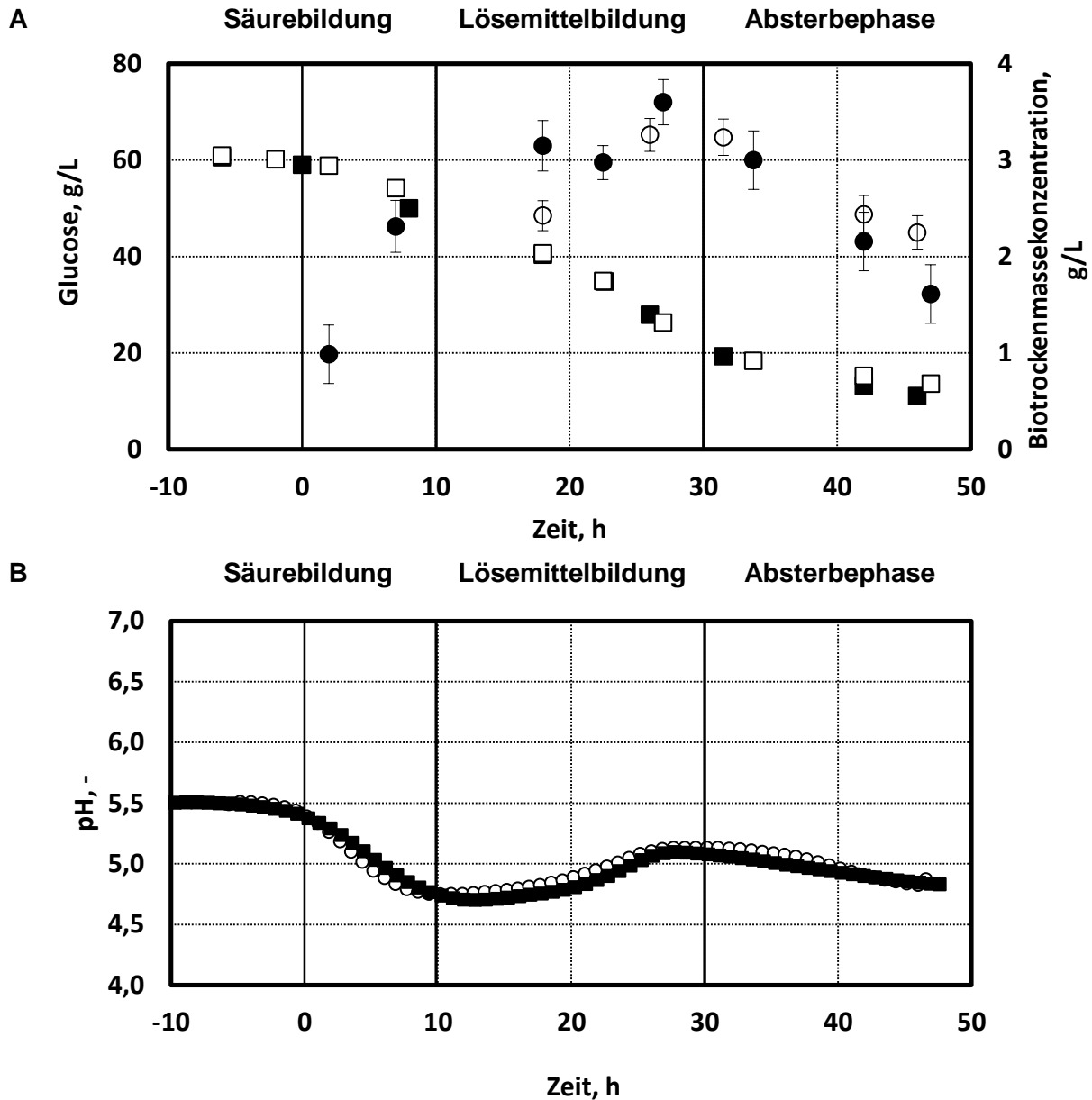


Abbildung 5.2: Referenzprozess, 2-fach durchgeführt (schwarze und weiße Symbole stehen jeweils für einen separaten Versuch): (A) Glucose- (Quadrate) und Biotrockenmasse- (Kreise) konzentrationen, sowie der (B) pH. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Rührerdrehzahl erhöht. ($V = 2$ L; $T = 37$ °C; $n = 200$ rpm; MS-MES Medium; Satzverfahren; *Clostridium acetobutylicum*).

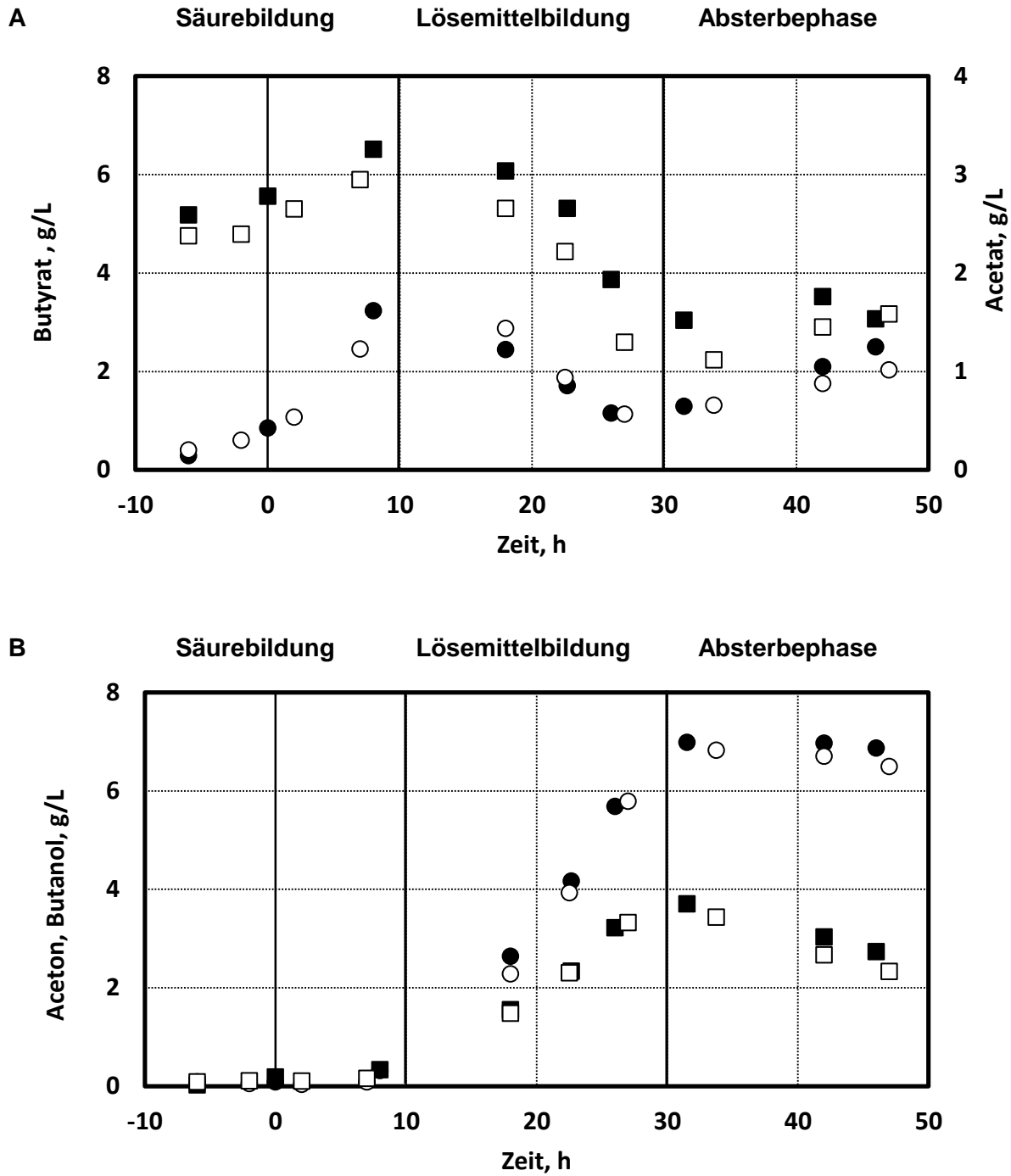


Abbildung 5.3: Referenzprozess, 2-fach durchgeführt (schwarze und weiße Symbole stehen jeweils für einen separaten Versuch): (A) Acetat- (Quadrate) und Butyrat- (Kreise) konzentrationen und (B) Butanol- (Kreise) und Aceton- (Quadrate) konzentrationen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Rührerdrehzahl erhöht. ($V = 2 \text{ L}$; $T = 37 \text{ °C}$; $n = 200 \text{ rpm}$; MS-MES Medium; *Clostridium acetobutylicum*).

5. Referenzprozess zur ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

Bis zum Zeitpunkt der höchsten Butanolkonzentration von 7 g/L nach 31 Stunden wurden 40 g/L Glucose verbraucht. Der Abfall der Butanolkonzentration nach 31 Stunden resultiert aus der Verdunstung, die zu diesem Zeitpunkt bereits höher als die Produktion ist. Die Ethanolkonzentrationen lagen deutlich unter 1 g/L und wurden deshalb nicht eingetragen.

In Tabelle 5.1 sind die Variablen des Referenzprozesses zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Bedingungen für einen Referenzprozess

Medium	MS-MES Medium
Temperatur	37 °C
Rührerdrehzahl	50 rpm; ab einem pH von 5,4: 200 rpm
Start-pH	5,5
Begasungsrate 2L; 1L-Rührkessel	0,265 L/min N ₂ ; 0,170 L/min N ₂
Inokulation	mit einer 16 h alten Vorkultur auf eine OD von 0,18-0,21 (~ c _{BTM} = 0,09-0,11 g/L)

Der so etablierte Referenzprozess wurde als Grundlage für alle Untersuchungen genutzt.

Zusätzlich zum Referenzprozess mit einer Stickstoffbegasung wurde für einen späteren Vergleich der maximal möglichen produzierten Menge an Butanol von verschiedenen Stämmen ein nicht begaster Referenzprozess durchgeführt. Das heißt, dass zum Zeitpunkt der Rührerdrehzahlerhöhung bei diesem Versuch gleichzeitig die Begasung abgebrochen wurde. Bei diesen Bedingungen verdunstet kein Lösemittel.

Abbildung 5.4 zeigt die Lösemittelverläufe bei dieser Kultivierung. Die Butanolkonzentration stieg nach 90 Stunden auf 10,5 g/L. Vergleicht man den Verlauf der Butanolkonzentrationen im begasten Referenzprozesses mit dem Prozess ohne Begasung (siehe Abbildung 5.5), so wird deutlich, dass die Verdunstung bis zur maximalen Butanolkonzentration bei den begasten Versuchen nur geringe Fehler (< 6 %) zeigte und erst in der darauffolgenden Zeit einen größeren Einfluss aufwies. Die Produktivität und die Ausbeute kann bei den nicht begasten Reaktionsansätzen direkt aus den vorliegenden Konzentrationen errechnet werden, da keine Lösemittel verdunsteten. Die volumetrische Produktivität bei dem

5. Referenzprozess zur ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

Referenzprozess ohne Begasung die zum Zeitpunkt $t = 69 \text{ h}$ (9 g/L Butanol) vorlag, betrug $0,13 \text{ g/(L h)}$ und die Ausbeute $0,46 \text{ mol/mol}$ Butanol aus Glucose.

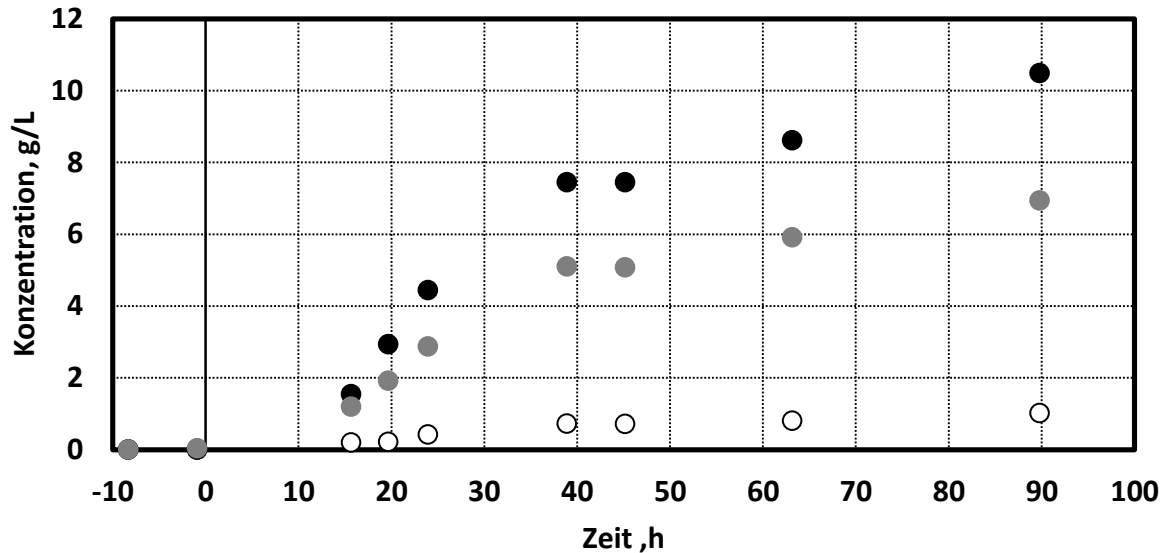


Abbildung 5.4: Verlauf der Lösemittelkonzentrationen (Butanol schwarz, Aceton grau, Ethanol weiß) bei einem Referenzprozess ohne aktive Begasung mit Stickstoff. ($V = 1 \text{ L}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 200 \text{ rpm}$; MS-MES Medium; *Clostridium acetobutylicum*).

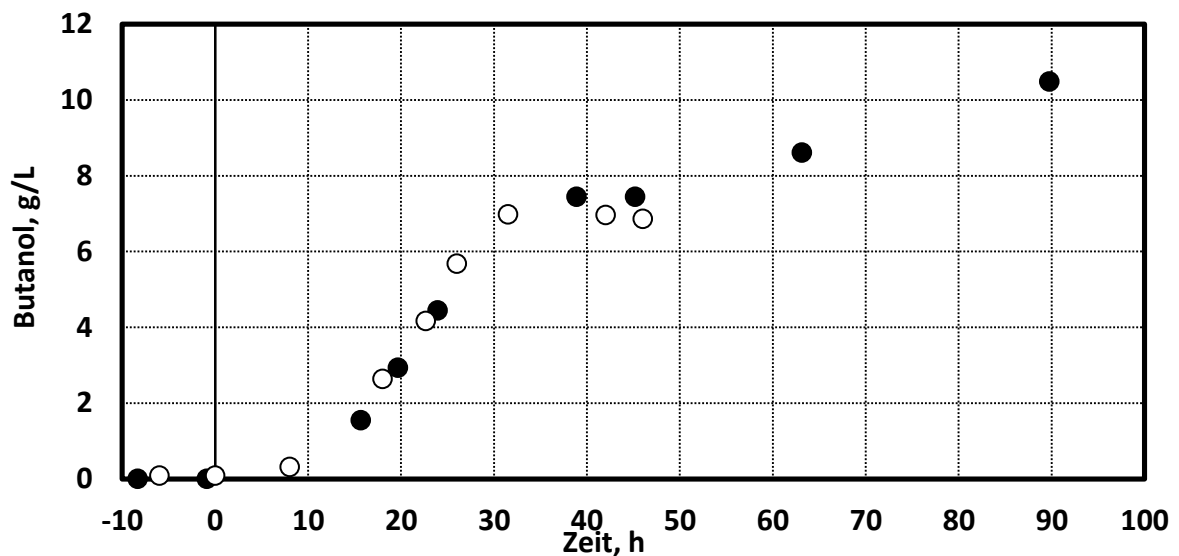


Abbildung 5.5: Vergleich der Butanolkonzentrationen beim Referenzprozess im Satzverfahren im Rührkesselreaktor mit (weiße Symbole) und ohne (schwarze Symbole) Stickstoff Begasung. ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 200 \text{ rpm}$; MS-MES Medium; *Clostridium acetobutylicum*).

5.2 Kohlenstoffbilanz

Der Einsatz eines definierten Mediums ermöglichte eine Kohlenstoffbilanzierung der Kultivierungen im Liter-Maßstab. Da für die Abgasanalytik ein minimaler Abgasstrom von 6 L/h notwendig war, konnte die Bilanzierung nur bei mit Stickstoff begasten Versuchen verwendet werden. Dazu wurde die CO₂-Bildung und das durch Verdunstung entwichene Lösemittel über die Abgasanalytik erfasst. Die Kohlenstoffbilanzen wurden nach Gleichungen aus Kapitel 4.3.3 berechnet und waren in allen Kultivierungen im Laborreaktor zu mindestens 90 % geschlossen. In Abbildung 5.6 wird beispielhaft nur die Kohlenstoffbilanz des Referenzprozesses gezeigt. Der Schluss der Kohlenstoffbilanz belegt, dass mit der genutzten Analytik alle Hauptprodukte quantitativ bestimmt werden konnten.

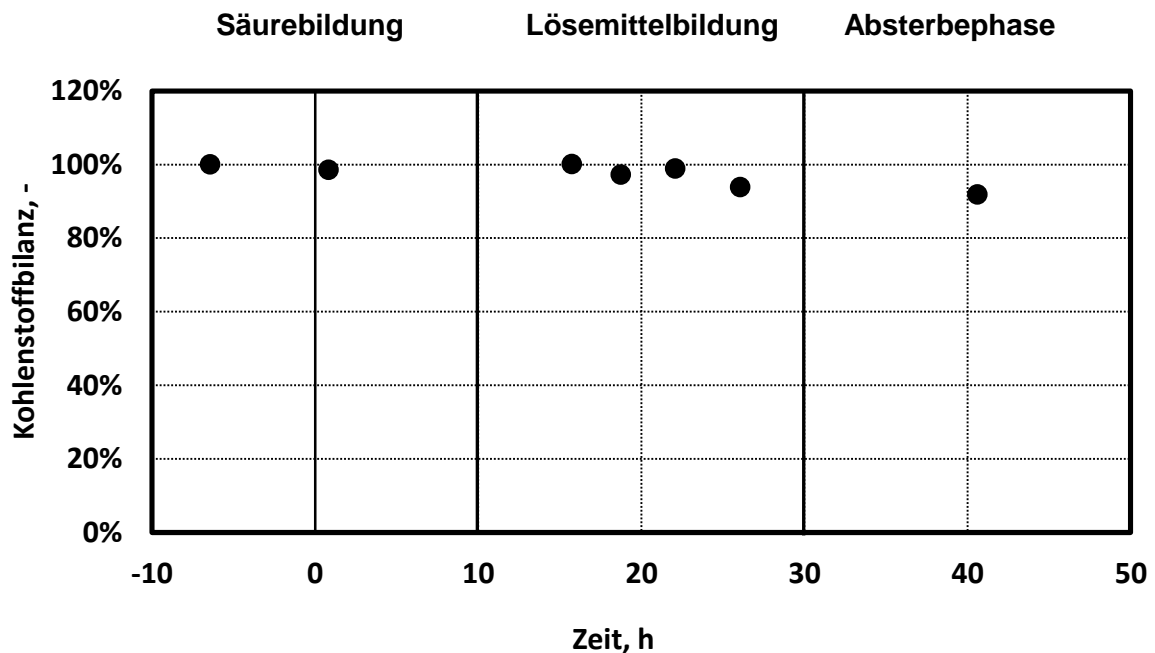


Abbildung 5.6: Integrale Kohlenstoffbilanzen des Referenzprozesses im definierten MS-MES-Medium im Rührkesselreaktor Liter-Maßstab. Die Zeitachse ist normiert auf die Rührerdrehzahlerhöhung ($V = 1 \text{ L}$; $T = 37 \text{ °C}$; $n = 200 \text{ rpm}$; MS-MES Medium; *Clostridium acetobutylicum*).

Diskussion

Der Referenzprozess mit dem Wildtypstamm von *Clostridium acetobutylicum* konnte erfolgreich reproduziert werden. Der erreichte Maximalwert der Butanolkonzentration von 7 g/L ist mit Literaturwerten gut vergleichbar. Berücksichtigt man, dass die auftretende Verdunstung und das Fehlen von Komplexbestandteilen im Medium eine Minderung der Maximalkonzentration verursachen können, ist der Wert sehr gut und kann als Vergleichsbasis für weitere Versuche verwendet werden. Bei den Versuchen ohne Begasung wurde ein Maximalwert von über 10 g/L Butanol erreicht. Die verwendete online Analytik ist für ABE Fermentationen gut einsetzbar. Dies konnte über die erfolgreiche Kohlenstoffbilanzierung gezeigt werden.

6. Maßstabsverkleinerung der ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

6.1 Anaerobe Septumflaschen

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Stämme wurden in anaeroben Septumflaschen kultiviert. Für die Sporen- oder Vorkulturgewinnung sind anaerobe Septumflaschen das Mittel der Wahl. Gegen eine Parallelisierung sprechen jedoch zwei Aspekte: Die Kontrolle verschiedener Prozessparameter kann kaum gewährleistet werden, da in anaeroben Septumflaschen keine *online* Erfassung von Messwerten erfolgen kann. Die im Nachhinein durchgeführte Messung nach Probenahme kann sich als schwierig gestalten, da der pH beispielsweise abhängig von der darüberstehenden CO₂ Atmosphäre ist. Zudem handelt es sich bei den Septumflaschen um Standkulturen, bei denen keine Homogenisierung stattfindet und höhere, nur längere und schwer reproduzierbare Verzögerungszeiten auftreten können (siehe Abbildung 6.1).

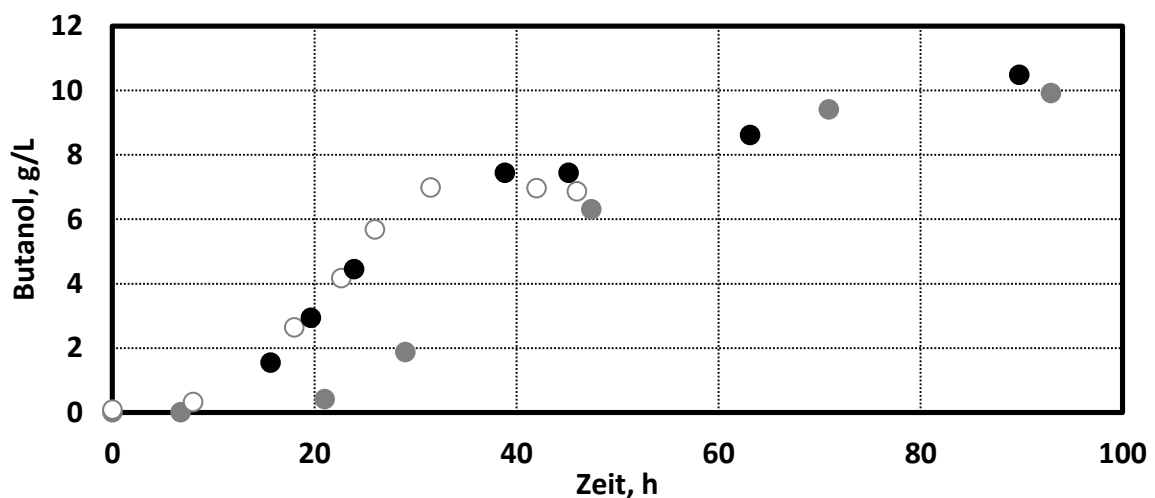


Abbildung 6.1: Vergleich der Verläufe der Butanolkonzentrationen von ABE Fermentationen mit *Clostridium acetobutylicum* in gerührten und nicht gerührten Bioreaktoren (weiß, Rührkesselreaktor mit Begasung im Liter-Maßstab; schwarz, Rührkesselreaktor ohne Begasung im Liter-Maßstab; grau in anaeroben Septumflaschen).

6.2 Anaerobe Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab

6.2.1 Maßstabsübertragung des Referenzprozesses

Zur Maßstabsverkleinerung des Referenzprozesses zur ABE Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* stellten sich drei Kriterien als entscheidend heraus: Da die Mikroorganismen sehr scherkraftempfindlich sind, wurde das Hauptaugenmerk auf den volumetrischen Leistungseintrag gelegt. In der Bioverfahrenstechnik ist diese Prozessgröße neben der Mischzeit eine übliche Vergleichsgröße für eine Maßstabsvergrößerung oder –verkleinerung (Junker *et al.*, 2009; Palmqvist *et al.*, 2011; Delvigne *et al.*, 2009). Zudem musste eine aktive Begasung gewählt werden, da aufgrund der Kürze der Abluftstrecke bei den parallelen Rührkesselreaktoren ansonsten das diffusive Einströmen von Sauerstoff nicht zu verhindern gewesen wäre. Diese musste so gewählt werden, dass die Verdunstungsraten im Milliliter-Maßstab vergleichbar mit den Raten aus dem 1 Liter Rührkesselreaktor waren. Außerdem musste der Gasstrom noch ausreichend groß sein, damit anaerobe Konditionen im Bioreaktorblock vorherrschen.

- Vergleichbarer **Leistungseintrag** in beiden Maßstäben: Die Werte für vergleichbare volumenbezogene Leistungseinträge wurden der Literatur entnommen (Hortsch, 2011). Aus dem im Referenzprozess verwendeten Leistungseintrag im Liter-Maßstab (mit 200 rpm) von 0,2 W/L wurde eine Drehzahl von 400 rpm im Milliliter-Maßstab abgeleitet.

- Ähnliche **Verdunstungsraten** im Liter- wie im Milliliter-Maßstab: Die verschiedenen Verdunstungsraten der Lösemittel im Milliliter-Maßstab wurden unter Betriebsbedingungen nach dem „educated guess“ Verfahren untersucht. Die Kopfraum-Begasungsrate wurde nach und nach auf 6 L/h für alle 48 Reaktoren reduziert. Dies entspricht einer Kopfraum-Begasungsrate von 2,1 mL pro Reaktor und Minute. Abbildung 6.2 zeigt den Verlauf der Konzentrationen der Lösemittel über 24 Stunden bei 37 °C bei einer auf 2 °C eingestellten Kopfraumkühlung. Bei dieser Rate war die Verdunstung der Lösemittel vergleichbar mit der beim Referenzprozess im Liter-Maßstab. Die lineare Approximation der Gelöstkonzentrationen zeigt Verdunstungsraten für Butanol von 0,06 g/(L h), für Aceton von 0,14 g/(L h) und für Ethanol von 0,01 g/(L h) unter den eingestellten Betriebsbedingungen (siehe Abbildung 6.3). Der Fakt, dass vergleichsweise mehr Butanol als Ethanol verdunstet liegt an den Eigenschaften des Stoffgemischs Wasser - Butanol - Ethanol. Die Stoffgemische Wasser-Ethanol und Wasser-Butanol besitzen jeweils ein Minimum Azeotrop, was bei dem

6. Maßstabsverkleinerung der ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

Dreistoffgemisch Wasser - Butanol - Ethanol zu einer Minimum-Grenzdestillationslinie zwischen diesen beiden Gemischen führt. Diese führt wiederum zu dem unerwarteten Verhalten des Gemisches, dass, obwohl reines Ethanol einen niedrigeren Siedepunkt als reines Butanol besitzt, mehr Butanol als Ethanol verdunstet (siehe Kapitel 3.1.1).

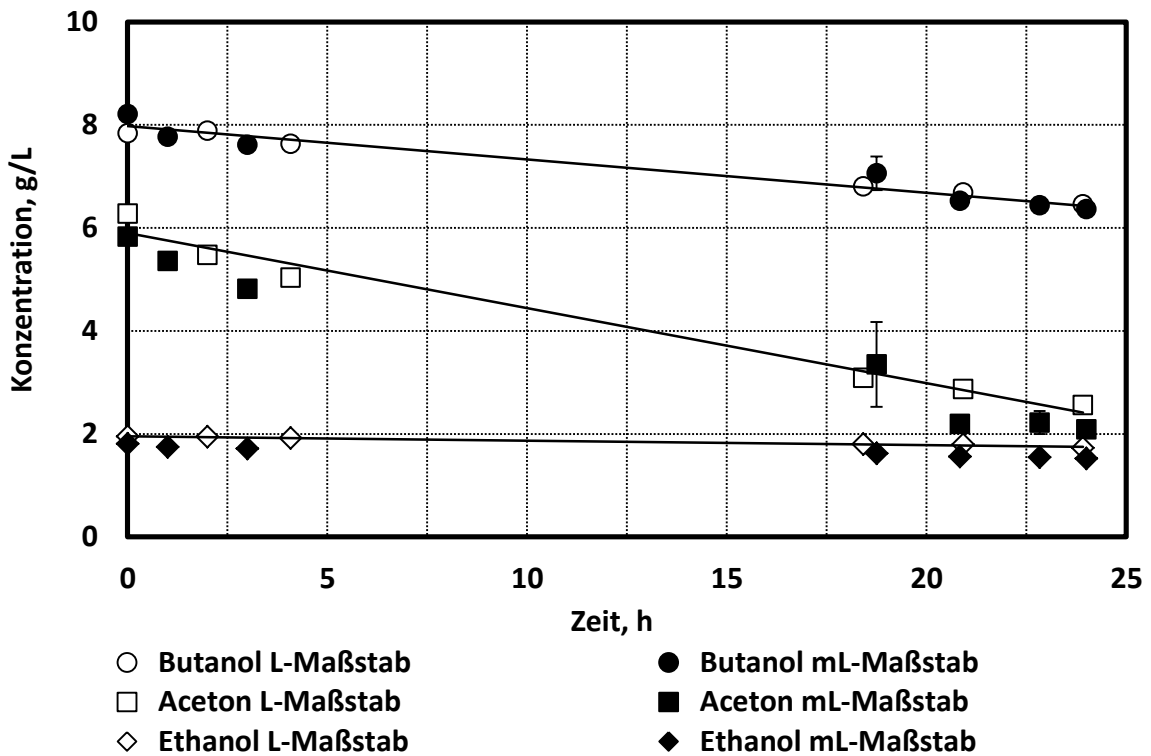


Abbildung 6.2: Vergleichende Charakterisierung der Verdunstung in Rührkesselreaktoren im Liter- und Milliliter-Maßstab bei Betriebsbedingungen von 37 °C und den Kopfraumbegasungsraten von 2,1 mL/min und Reaktor (im Milliliter-Maßstab) und 0,170 L/min (im 1 Liter-Maßstab). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von 3 unterschiedlichen Reaktoren.

Die daraus resultierende volumetrische Begasungsrate ist mit 175 mL/(L min) um 5 mL/(L min) höher als beim Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab.

- **Aufrechterhaltung anaerober Betriebsbedingungen** während der Kultivierung: Diese wurde mit dem Redoxindikator (Resazurin), während der Satzprozesse im Milliliter-Maßstab nachgewiesen.

Wie für den Betrieb des Rührkesselreaktorblocks üblich wurde für Reaktionsansätze im Milliliter-Maßstab Antischaummittel (0,01 % w/w Polypropylenglykol) verwendet. Es wurde dabei weder ein negativer noch ein positiver Effekt auf die Kultivierung nachgewiesen.

Abbildungen 6.3 - 6.5 zeigen vergleichend die Konzentrationsverläufe der verschiedenen Metabolite im Milliliter-Maßstab und im Liter-Maßstab.

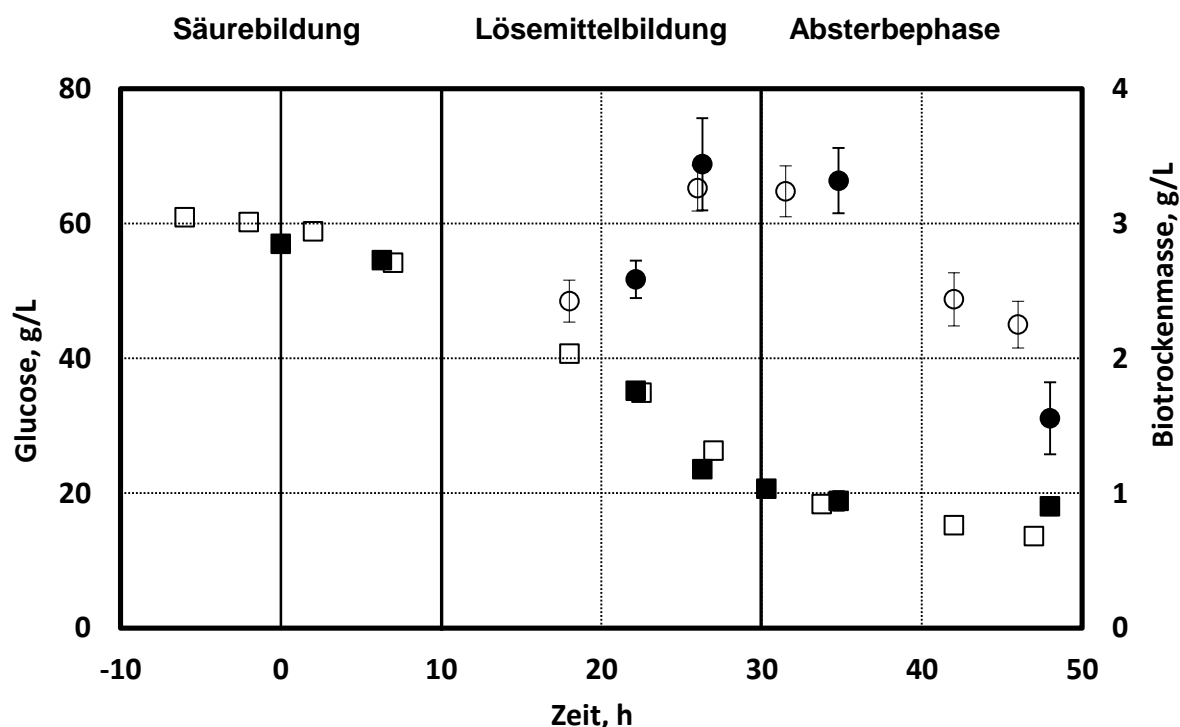


Abbildung 6.3: Biotrockenmasse- (Kreise) und Glucosekonzentration (Quadrate) während einer Satzkultivierung von *Clostridium acetobutylicum* in Milliliter-Rührkesselreaktoren (schwarze Füllung) bei einer Begasung von 2,1 mL/(min Reaktor) im Vergleich zum Referenzprozess im Liter-Maßstab (weiße Füllung). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachansätzen.

Der Vergleich der Glucosekonzentrationen und der Biotrockenmassekonzentrationen (Abbildung 6.3) zeigt eine gute Übereinstimmung in beiden Maßstäben. Auffällig war, dass bei der Kultivierung im Milliliter-Maßstab keine bzw. nur eine sehr kurze Verzögerungsphase auftrat.

6. Maßstabsverkleinerung der ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

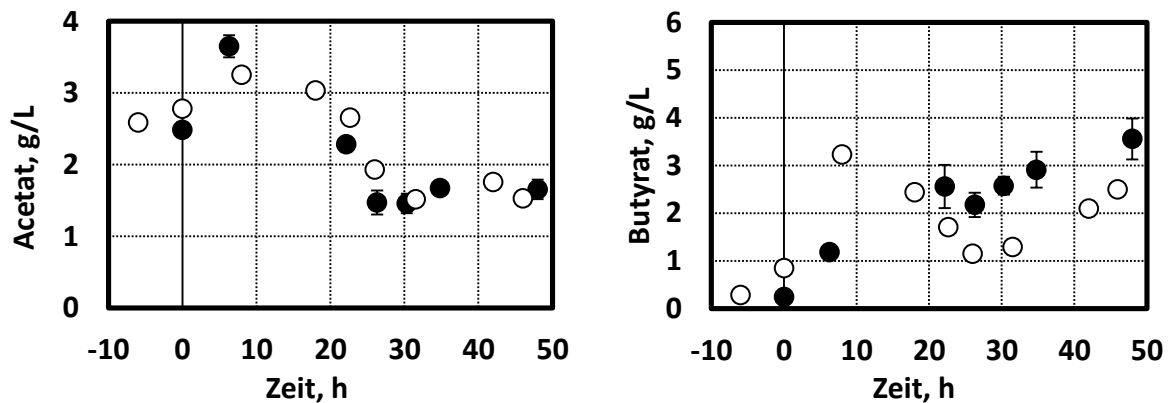


Abbildung 6.4: Acetat- (links) und Butyratkonzentrationen (rechts) während einer Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* in Milliliter-Rührkesselreaktoren bei einer Begasung von 2,1 mL/(min Reaktor) (schwarze Füllung) im Vergleich zum Referenzprozess im Liter-Maßstab (weiße Füllung). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachansätzen.

Vergleicht man die Säurekonzentrationsverläufe (gezeigt in Abbildung 6.4), so waren für Acetat sehr ähnliche Verläufe zu sehen. Die Butyratkonzentrationen waren im Milliliter-Maßstab zu Beginn unter dem des Referenzprozesses und ab $t = 20$ Stunden 1 g/L über den Konzentrationen des Referenzprozesses Liter-Maßstabes. Die Acidogenese war, wie die Solventogenese, sehr gut zu sehen.

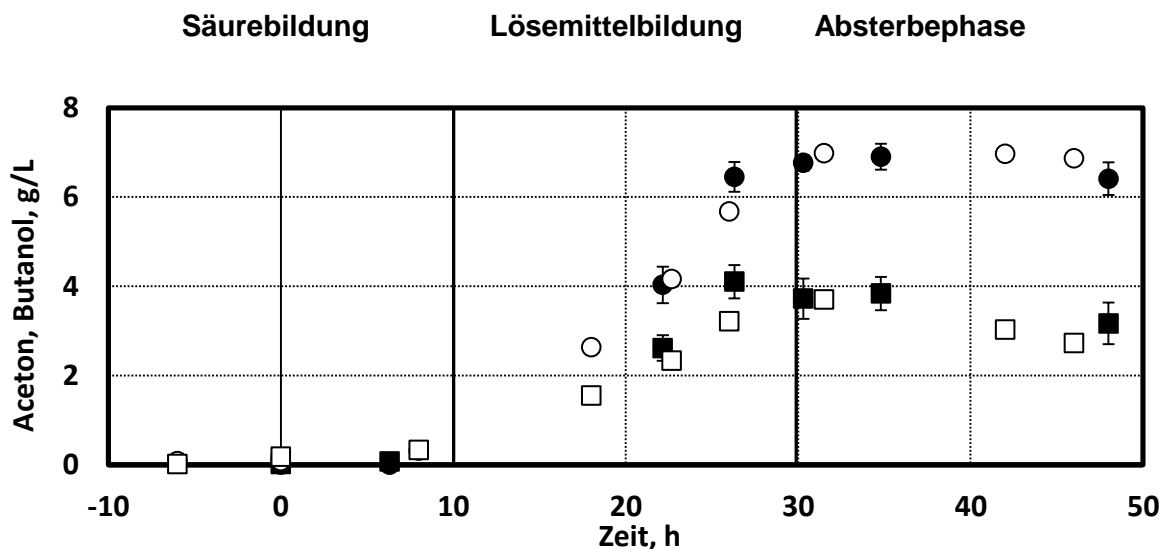


Abbildung 6.5: Butanol- (Kreise) und Acetonkonzentration (Quadrate) während einer Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 in Milliliter-Rührkesselreaktoren bei einer Begasung von 2,1 mL/(min Reaktor) (schwarze Füllung) im Vergleich zum Referenzprozess im Liter-Maßstab (weiße Füllung). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachansätzen.

In Abbildung 6.5 ist der Vergleich der Lösemittelkonzentrationen in den Milliliter-Rührkesselreaktoren zum Referenzprozess im Liter-Maßstab aufgetragen. Der zeitliche Verlauf von Ethanol, dessen Konzentrationen in beiden Maßstäben stets unter 1 g/L war, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Diskussion

Die Skalierbarkeit des ABE Referenzprozesses vom Liter- zum Milliliter-Maßstab konnte für alle bestimmten Metaboliten erfolgreich demonstriert werden. Als ausschlaggebende Kriterien stellten sich der volumetrische Leistungseintrag, die Begasungsrate beziehungsweise die daraus resultierende Verdunstungsrate und das Aufrechterhalten der anaeroben Zustände in den Milliliter-Rührkesselreaktoren heraus. Eine Auffälligkeit war, dass der Referenzprozess im Milliliter-Maßstab nahezu keine Verzögerungszeit aufwies. Das kann daran liegen, dass die Animpfprozedur des Milliliter-Bioreaktorblocks vergleichsweise schonend abläuft. Beim Animpfen im Rührkesselreaktor werden die *Clostridium acetobutylicum* Zellen durch zwei sehr kleine Kanülen mit Hilfe des Überdrucks in der anaeroben Septumflasche in den Reaktor gedrückt. Dieser Vorgang dauert mehrere Minuten. Beim Animpfen des Bioreaktorblocks wird die Vorkultur bei anaeroben Bedingungen direkt von der anaeroben Septumflasche der Vorkultur in eine, mit dem neuen Medium vorbereitete Flasche gekippt und damit vermischt. Das Animpfen findet dann über eine 10 mL Pipette statt und dauert nur wenige Sekunden. Die schonende Animpfprozedur ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass für den Betrieb des Bioreaktorblocks keine niedrigen Drehzahlen zum Beginn der Kultivierung notwendig waren.

6.2.2 Reproduzierbarkeit der ABE Fermentation

Um die Reproduzierbarkeit der Parallelprozesse zu überprüfen, wurde bei einem parallelen Versuchsansatz jeder Rührkesselreaktor mit derselben Vorkultur angeimpft und bei den Standardbedingungen (37 °C; 400 rpm; 2,1 mL/(min Reaktor) Stickstoff Begasung) betrieben. Tabelle 6.1 zeigt die gemittelten Konzentrationen mit den zugehörigen Standardabweichungen, die 31 Stunden nach Inokulation gemessen wurden.

6. Maßstabsverkleinerung der ABE Herstellung mit *Clostridium acetobutylicum*

Tabelle 6.1: Gemittelte Stoffkonzentrationen von 48 identisch betriebenen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab nach einer Kultivierungsdauer von 31 Stunden

	Glucose	Ethanol	Butanol	Acetat	Butyrat	Aceton	Biotrocken- masse
Mittelwerte, g/L	16,55	0,41	6,55	1,39	2,40	3,18	2,56
Standardabweichung, g/L	1,82	0,02	0,28	0,14	0,26	0,21	0,37
Standardabweichung, %	11,0%	5,3%	4,2%	9,8%	11,0%	6,7%	14,5%

Die bei den jeweiligen Produkten erreichten Konzentrationen sind vergleichbar mit denen des Referenzprozesses im Liter-Maßstab und die niedrige Standardabweichung ist mit unter 7 % für die Lösemittel sehr gut. Die Standardabweichung von 15 % für die Biotrockenmasse liegt auch im Rahmen der gravimetrischen Bestimmungsgenauigkeit. Es ist eine sehr gute Reproduzierbarkeit vorhanden.

6.2.3 Sterilität und Kreuzkontamination im Parallelbioreaktorblock

Zur Überprüfung des kontaminationsfreien Betriebs der Parallelreaktoren wurde ein Versuch durchgeführt. Einige Reaktoren wurden mit sterilem Medium gefüllt und ohne Mikroorganismen bei den üblichen Bedingungen betrieben. Es wurde festgestellt, dass in den Reaktoren die ohne Zellen betrieben wurden, kein Anstieg der OD zu beobachten war. Somit sind Kreuzkontaminationen ausgeschlossen und eine parallele vergleichende Kultivierung von verschiedenen Stämmen ist möglich.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

Alle im folgenden Kapitel vorgestellten rekombinanten *Clostridium acetobutylicum* Stämme wurden von den Kooperationspartnern Frau Dr. Lütke-Eversloh, Frau Lehmann und Frau Mann am Institut für Biowissenschaften / Mikrobiologie (Prof. Bahl) der Universität Rostock hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Alle Stämme wurden in Rührkesselreaktoren im 1 Liter-Maßstab und im 12 Milliliter-Maßstab untersucht. Alle Versuche in diesem Kapitel wurden unter Referenzbedingungen (siehe Kapitel 5 und 6) durchgeführt.

7.1 Deletionsstämme

7.1.1 Deletionsmutante *Clostridium acetobutylicum* *hbd::int*

Bei dem Deletionsstamm *C. acetobutylicum hbd::int* ist das Gen für die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase inaktiviert (vgl. Abbildung 7.1; rechts unten). Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Acetoacteyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA und verbraucht dabei ein NADH. Als Konsequenz dieser Deletion sind die Reaktionswege zu den C₄-Körpern Butyrat und Butanol abgeschnitten. Demzufolge sollten weder Butyrat noch Butanol von *C. acetobutylicum hbd::int* gebildet werden können. Dazu gab es Untersuchungen, die vom Kooperationspartner in anaeroben Septumflaschen durchgeführt wurden. Ein Teil der Ergebnisse aus Versuchen in anaeroben Septumflaschen wurde von den Kooperationspartnern in Rostock bereits veröffentlicht. Diese zeigten, dass die Mutante sehr gut überlebensfähig war und in großen Mengen Ethanol (ca. 16 g/L) bilden konnte (Lehmann & Lütke-Eversloh, 2011).

In Abbildung 7.1 sind sämtliche Konzentrationen der Fermentationsprozesse in den Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab, sowie im Milliliter-Maßstab gezeigt. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen für Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 5 Stunden verschoben. Zudem sind für einen charakterisierenden

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

Vergleich Konzentrationsverläufe der Referenzkultivierung mit dem Wildtypstamm aufgetragen.

Zunächst ist festzustellen, dass die Konzentrationsverläufe in beiden Maßstäben sehr ähnlich waren. Die Glucoseaufnahme lief im Vergleich zum Wildtyp sehr schnell ab. So war nach 25 Stunden keine Glucose mehr im Medium vorhanden ($Q_s = 2,2 \text{ g/(L h)}$), beim Wildtypstamm waren es zu dieser Zeit noch 30 g/L, was einer Glucoseaufnahme von 1,2 g/(L h) entspricht. Gleichzeitig war das Wachstum der Zellen sehr ausgeprägt. Statt einer maximalen Biomassekonzentration von knapp 2,8 g/L nach 31 Stunden wie beim Wildtyp, wies dieser Stamm nach 25 Stunden eine Biotrockenmassekonzentration von 4,9 g/L auf. Zum Ende des Satzverfahrens sank die Biotrockenmassekonzentration schließlich wieder auf 3,7 g/L und war damit zu diesem Zeitpunkt, als bereits keine Glucose mehr vorlag, doppelt so hoch wie die des Wildtypstamms, obwohl sich bei der Referenzkultivierung noch Glucose im Medium befand. Die Acetatkonzentration verlief ähnlich zu der, der Referenzkultivierung mit dem Wildtypstamm. Es wurde, wie erwartet, kein Butyrat gebildet. Allerdings wurde mit 18 g/L nach 35 Stunden sehr viel Ethanol und kein Butanol produziert. Im Vergleich mit der Referenzkultivierung wurde mit 2 g/L in etwa die Hälfte der Acetonkonzentration erreicht.

Diskussion:

Die Skalierbarkeit der Satzkultivierung des rekombinanten Stamms *C. acetobutylicum hbd::int* in Rührkesselreaktoren zwischen Liter- und Milliliter-Maßstab, der vergleichsweise hohe Zelldichten und Ethanolkonzentrationen erreichte, konnte sehr gut bestätigt werden. Es konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass der Stamm hohe Mengen an Ethanol produziert, um NADH zu verbrauchen, da kein Butanol gebildet werden konnte. Die Mutation war stabil und es wurde im gesamten Verlauf der Kultivierung weder Butanol noch Butyrat nachgewiesen. Da die inhibierende Wirkung von Butanol und Butyrat ausblieb, konnte der Organismus besser wachsen und die Biotrockenmassekonzentration nahm zum Ende des Satzprozesses auch nicht so stark ab wie bei der Wildtypkultivierung.

Die Ethanolkonzentration konnte mit einem Glucosezulauf in einer separaten Kultivierung noch auf über 35 g/L gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Als Ethanolproduzent ist dieser Stamm jedoch nicht konkurrenzfähig zu Hefen, die Ethanol in einer Konzentration von deutlich über 100 g/L bilden können (Lin & Tanaka, 2006; Jarboe *et al.*, 2007).

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

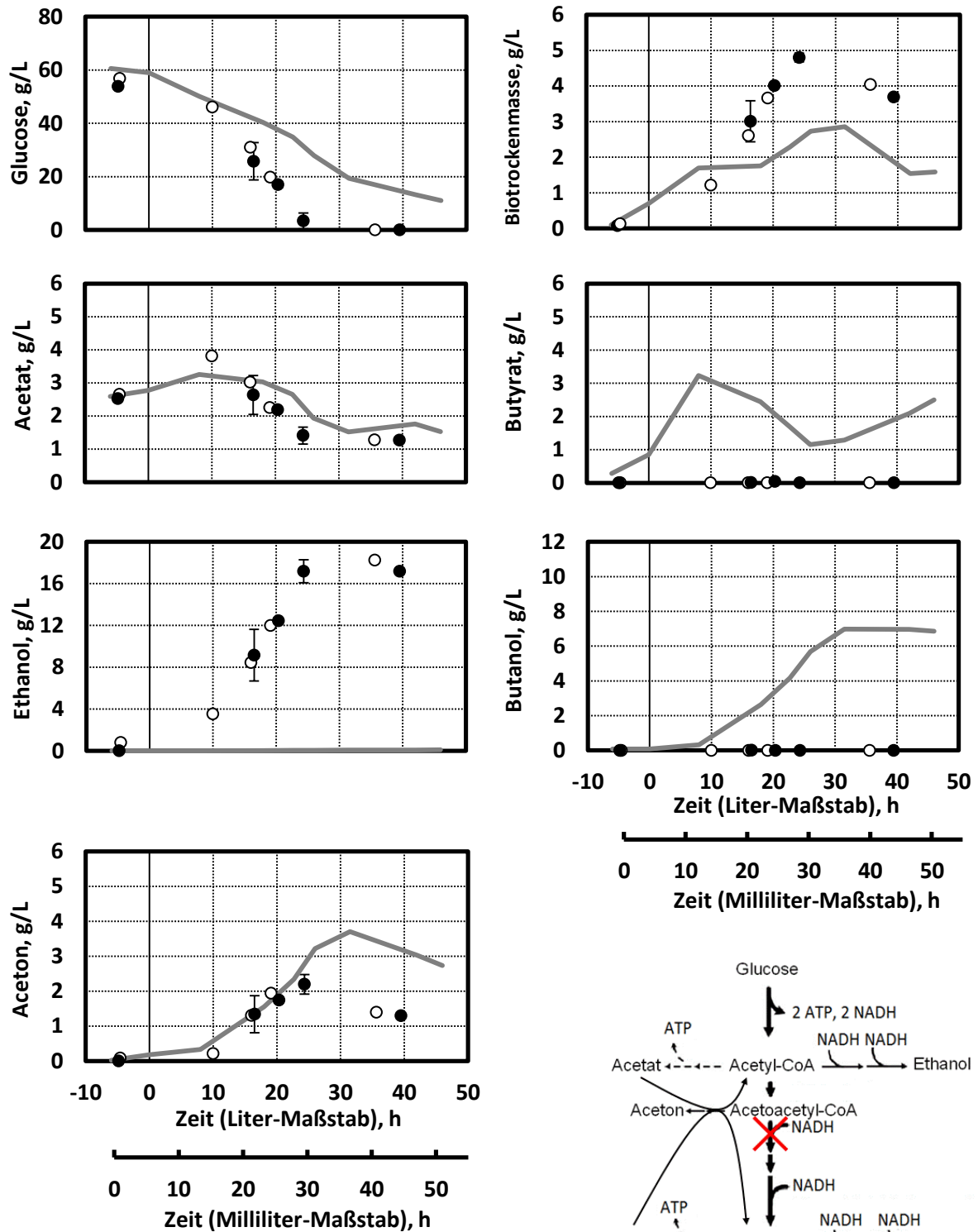


Abbildung 7.1: Charakterisierung von *C. acetobutylicum hbd::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

7.1.2 Deletionsmutante *Clostridium acetobutylicum adhE::int*

Das Gen *adhE* codiert für die Aldehyd Dehydrogenase. Diese setzt unter Verbrauch von einem NADH Acetyl-CoA und Butyryl-CoA zum jeweiligen Aldehyd um (siehe Abbildung 7.2, rechts unten). Die Aldehyde sind die Vorstufen der jeweiligen Alkohole Ethanol und Butanol. Bei einem Stamm mit deletiertem *adhE* Gen, sollte kein Alkohol gebildet werden. Es sollte somit kaum eine solventogene Phase eintreten, da maximal eine geringe Menge Säure wieder aufgenommen werden kann und so Aceton gebildet werden könnte. Da die Enzyme für die Stoffwechselwege zu den Alkoholen jedoch nicht exprimiert werden, sollte die Reassimilation nur in sehr geringem Ausmaß stattfinden. Ziel dieser Deletion war es, zu erfahren wie der Organismus auf diese Veränderung reagiert, also ob weitere Stoffwechselwege bedient werden können. Zudem wurde aus Vorversuchen mit anaeroben Septumflaschen erwartet, dass diese Mutante vergleichsweise schlecht wächst.

Abbildung 7.2 zeigt alle Konzentrationen, die bei der Satzkultivierung von *C. acetobutylicum adhE::int* in Rührkesselreaktoren gemessen wurden. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 2 Stunden verschoben. Es ist zu erkennen, dass die Verläufe im Milliliter-Maßstab sehr ähnlich zu den Verläufen der Kultivierungen im Liter-Maßstab sind.

Die Acidogenese (bis $t = 12$ Stunden) verlief ähnlich zum Wildtyp, mit der Ausnahme, dass keine Lösemittel gebildet wurden. Acetat und Butyrat wurden produziert und Glucose wurde verstoffwechselt. Das Anwachsen des Stamms verlief etwas langsamer als das des Wildtypstamms im Referenzprozess. Im Anschluss an die acidogene Phase wurde kaum noch Glucose aufgenommen, 40 g/L verblieben im Medium. Die Biotrockenmassekonzentration stagnierte bei circa 1,8 g/L. Die Säuren wurden nicht wieder aufgenommen und es kam zu einer Akkumulation von Acetat (knapp 4 g/L) und Butyrat (4,5 g/L) bevor der Stoffwechsel eingestellt wurde und keine Änderungen mehr zu beobachten waren (siehe Abbildung 7.2).

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

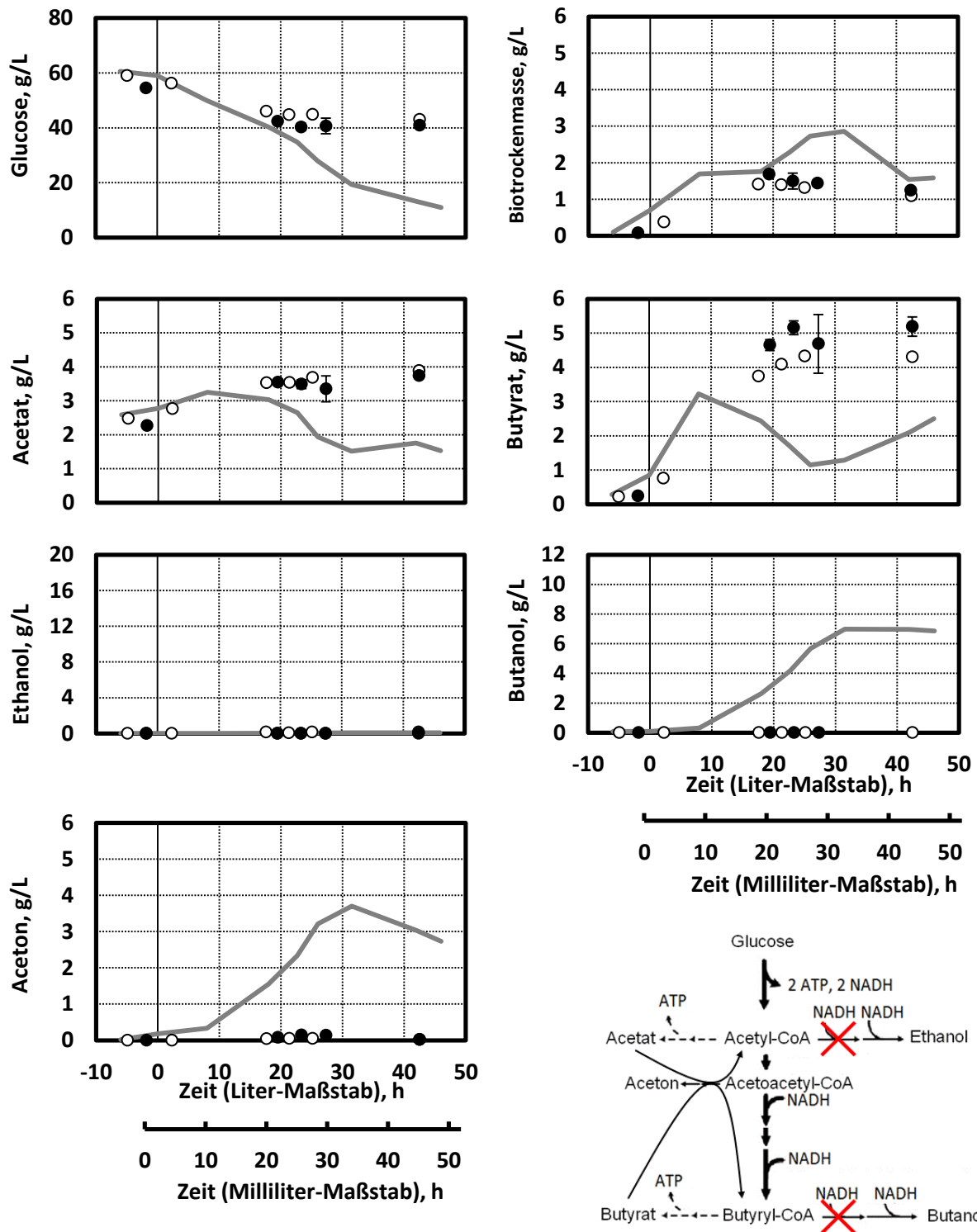


Abbildung 7.2: Charakterisierung von *C. acetobutylicum adhE::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

Diskussion:

Wie erwartet, verhielt sich dieser Stamm während der acidogenen Phase sehr ähnlich zum Wildtypstamm. Im Anschluss bildete er jedoch keine Lösemittel und konnte auch die Säuren nicht wieder aufnehmen. Diese akkumulierten im Medium. Der Stoffwechsel endete dann in einem „acid crash“. Dass kein Aceton gebildet wurde, war ein Resultat aus der nicht vollzogenen Wiederaufnahme der Säuren und entsprach daher den Erwartungen.

Die Skalierbarkeit der Satzkultivierung eines vergleichsweise schlecht wachsenden *Clostridium acetobutylicum* Stamms konnte hiermit auch bestätigt werden.

7.1.3 Deletionsmutante *Clostridium acetobutylicum* *adc::int*

Bei der Deletionsmutante *C. acetobutylicum* *adc::int* wurde das Gen für die Acetoacetat Decarboxylase deletiert (vgl. Abbildung 7.3, rechts unten). Daher kann dieser rekombinante Stamm Acetoacetat nicht zu Aceton decarboxylieren. Ziel dieser Modifikation im Zentralstoffwechsel war es, die Produktselektivität für Butanol zu erhöhen indem das Nebenprodukt Aceton nicht mehr produziert werden kann.

Abbildung 7.3 zeigt den Verlauf der Produktkonzentrationen während Satzkultivierungen von *Clostridium acetobutylicum* *adc::int* in Rührkesselreaktoren im Liter- und im Milliliter-Maßstab im Vergleich zu den jeweiligen Konzentrationen während des Referenzlaufs mit dem Wildtypstamm. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 5 Stunden verschoben. Zunächst ist festzuhalten, dass sich die Konzentrationen in beiden Maßstäben wieder sehr ähneln. Glucose wurde während der Acidogenese in einem, der Referenzkultivierung ähnlichen, Umfang verstoffwechselt und Wachstum fand auch vergleichbar statt. Auch die Säurekonzentrationen verliefen bis $t = 15$ Stunden gleich. Im anschließenden Wechsel in die solventogene Phase wurde weniger Glucose als beim Referenzprozess verstoffwechselt (Restkonzentration von knapp 40 g/L) und das Zellwachstum stagnierte ebenfalls.

Es fand kein Absterben der Zellen zum Ende der Satzkultivierung hin statt. Acetat akkumulierte wie erwartet bis zu einem Endwert von 5,5 g/L. Buttersäure wurde hingegen fast vollständig wieder aufgenommen (< 1 g/L zum Ende der Fermentation). Ethanol wurde, wie bei der Referenzkultivierung kaum gebildet und Butanol wurde über 60 % vermindert gebildet. Wurden bei der Wildtyp Referenzkultivierung noch 7 g/L Butanol gebildet, waren es bei *Clostridium acetobutylicum* *adc::int* nur noch knappe 3 g/L. Aceton wurde in Konzentrationen unter 0,2 g/L gebildet. Acetoacetat akkumulierte nicht (Daten nicht gezeigt) und war nur in Konzentrationen von unter 0,2 g/L nachzuweisen.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

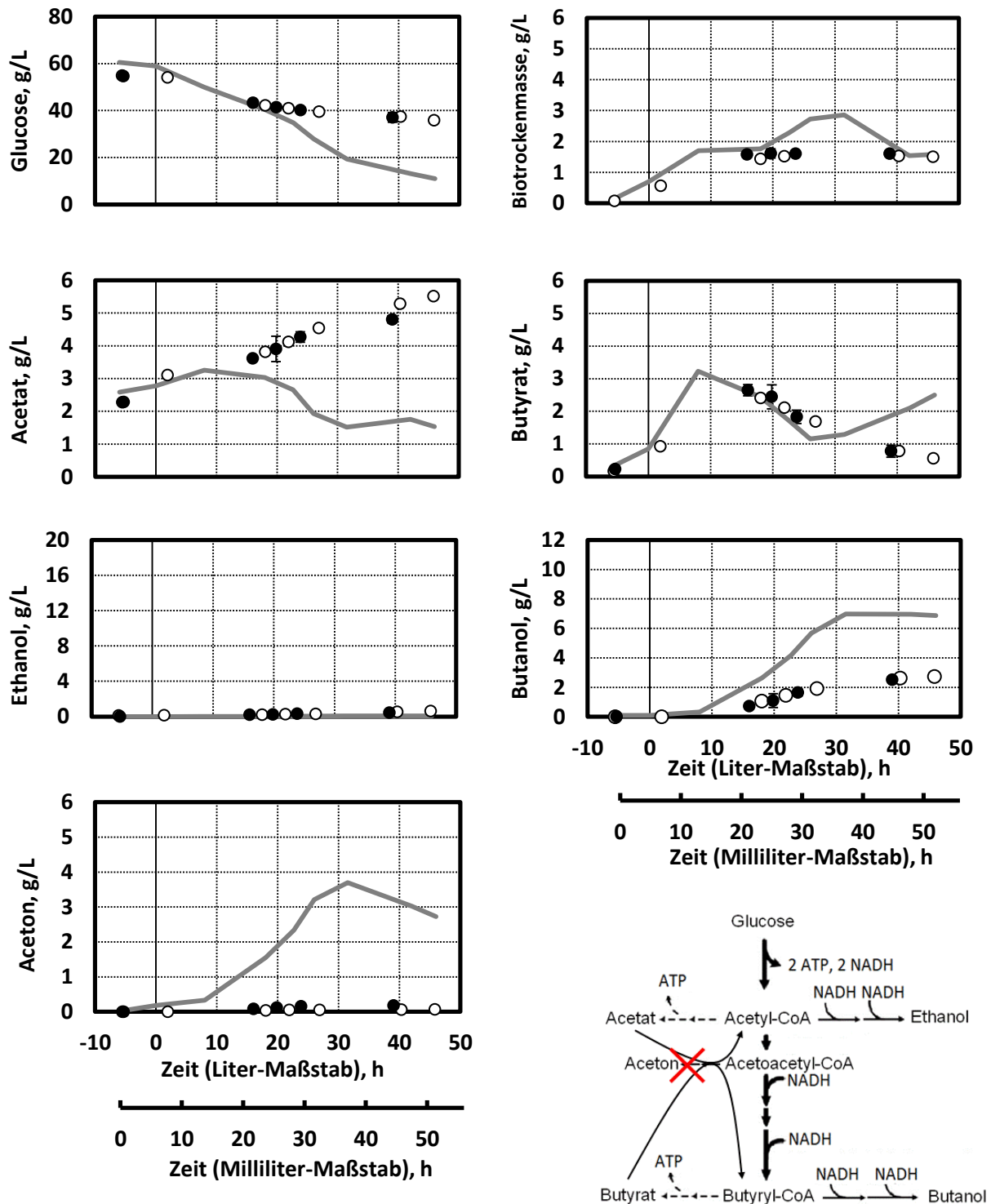


Abbildung 7.3: Charakterisierung von *C. acetobutylicum* *adc::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

Diskussion:

Arbeiten mit einem zu *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ähnlichen und *adc* defizienten Stamm wurden bereits von Jiang *et al.* (2009) veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass kaum Aceton produziert und so die Selektivität für Butanol erhöht wurde. Dabei sank allerdings die Menge an produziertem Butanol um über 40 %.

Ausgehend davon, dass der Abbau von Acetoacetat eine treibende Kraft der Wiederaufnahme der Säuren und somit auch der Solventogenese ist (Gheshlaghi *et al.*, 2009; Jones & Woods, 1986), war von diesem Stamm zu erwarten, dass generell weniger Lösemittel und kaum Aceton produziert wird. Geringe Spuren an Aceton können jedoch anfallen, da Acetoacetat nicht stabil ist und umso schneller zu Aceton und Kohlenstoffdioxid zerfällt, je niedriger der pH ist (Lehmann *et al.*, 2012). Es ist davon auszugehen, dass Acetat und Butyrat nicht wieder aufgenommen werden, da Acetoacetat nicht abgebaut werden kann und so eine Produktinhibierung der Wiederaufnahmereaktion der Säuren hervorruft (Jiang *et al.*, 2009). Diese Annahme gilt nur sofern Acetoacetat nicht ins Medium sekretiert wird. Als Resultat sollten Acetat und Butyrat im Medium akkumulieren.

Die Skalierbarkeit der Satzkultivierung des rekombinanten *Clostridium acetobutylicum* *adc::int* in den Rührkesselreaktor im Milliliter- und Liter-Maßstab konnte erfolgreich bestätigt werden. Wie erwartet wurde Aceton nur in sehr geringen Mengen produziert, was aus dem Zerfall des Acetoacetats resultierte. Acetat akkumulierte wie erwartet, wohingegen Butyrat wieder aufgenommen wurde, was sehr überraschend war. Berücksichtigt man den Fakt, dass kein Acetoacetat akkumulierte, bleibt nur der Schluss, dass die Wiederaufnahme über eine Reversibilität der Enzyme zu Butyrat hin (also *ptb* und *buk*) oder einen unbekanntem Stoffwechselweg ablaufen musste. Diese Beobachtung wurde zusammen mit den Kooperationspartnern während der Durchführung dieser Dissertation veröffentlicht (Lehmann *et al.*, 2012). Die verminderte Produktion von Butanol konnte ebenfalls bestätigt werden. Deshalb und weil kaum Butyrat im Medium vorhanden war, nahm die Konzentration der Biotrockenmasse gegen Ende der Kultivierung nicht ab.

Der Einbruch der Butanolkonzentration spricht im Großen und Ganzen gegen eine Verwendung einer alleinigen Deletion des *adc* Genes bei der Konstruktion eines Produktionsstamms. Viel eher sollte eine Deletion der Acetatbildung versucht werden, da dieses nicht wieder in den Stoffwechsel aufgenommen werden kann, ohne dass als Nebenprodukt Aceton produziert wird.

7.1.4 Deletionsmutante *Clostridium acetobutylicum pta::int*

Im Stamm *C. acetobutylicum pta::int* wurde das Gen *pta*, das für die Phosphotransacetylase codiert, über Integration deletiert. Die Phosphotransacetylase phosphoryliert unter Abspaltung der CoA-Gruppe Acetyl-CoA zu Acetylphosphat, welches anschließend von Acetatkinase zu Acetat verstoffwechselt wird (siehe Abbildung 7.4 rechts unten). Die Phosphotransacetylase ist vor allem in der acidogenen Phase von *C. acetobutylicum* aktiv. Da die Phosphotransacetylase ausschlaggebend bei der Produktion von Acetat ist sollte durch deren Deletion bei der Kultivierung von *C. acetobutylicum pta::int* keine Acetatbildung beobachtet werden können.

In Abbildung 7.4 sind sämtliche Konzentrationen bei Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab, sowie im Milliliter-Maßstab in MS-MES Medium gezeigt. Zudem sind für einen charakterisierenden Vergleich Konzentrationen der Referenzkultivierung mit dem Wildtyp aufgetragen. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 8 Stunden verschoben. Zunächst ist festzuhalten, dass die Konzentrationen bei den Satzkultivierungen in beiden Maßstäben wie erwartet vergleichbar sind. Die Konzentrationen von Glucose sind bis kurz vor dem Prozessende nahezu identisch, nehmen aber dann, verglichen mit dem Referenzstamm, etwas weiter ab (auf 5 g/L statt 10 g/L bei der Wildtypreferenz). Die Biomassekonzentration verlief ebenfalls ähnlich, allerdings lagen in der Schlussphase mit 3 g/L deutlich höhere Konzentrationen vor als bei der Referenzkultivierung mit 1,7 g/L. Eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration ist jedoch zum Ende der Satzkultivierung auch deutlich zu sehen (siehe Abbildung 7.4). Zu Beginn des Prozesses war ein kleiner Anstieg der Acetatkonzentration zu verzeichnen, ansonsten nahm diese nur ab und lag durchgehend unter der Acetatkonzentration des Wildtypprozesses, zum Ende hin unter 1 g/L. Der Konzentrationsverlauf von Butyrat war dem des Referenzprozesses sehr ähnlich. Es wurde Butyrat während der Acidogenese gebildet und während der Solventogenese wieder aufgenommen.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

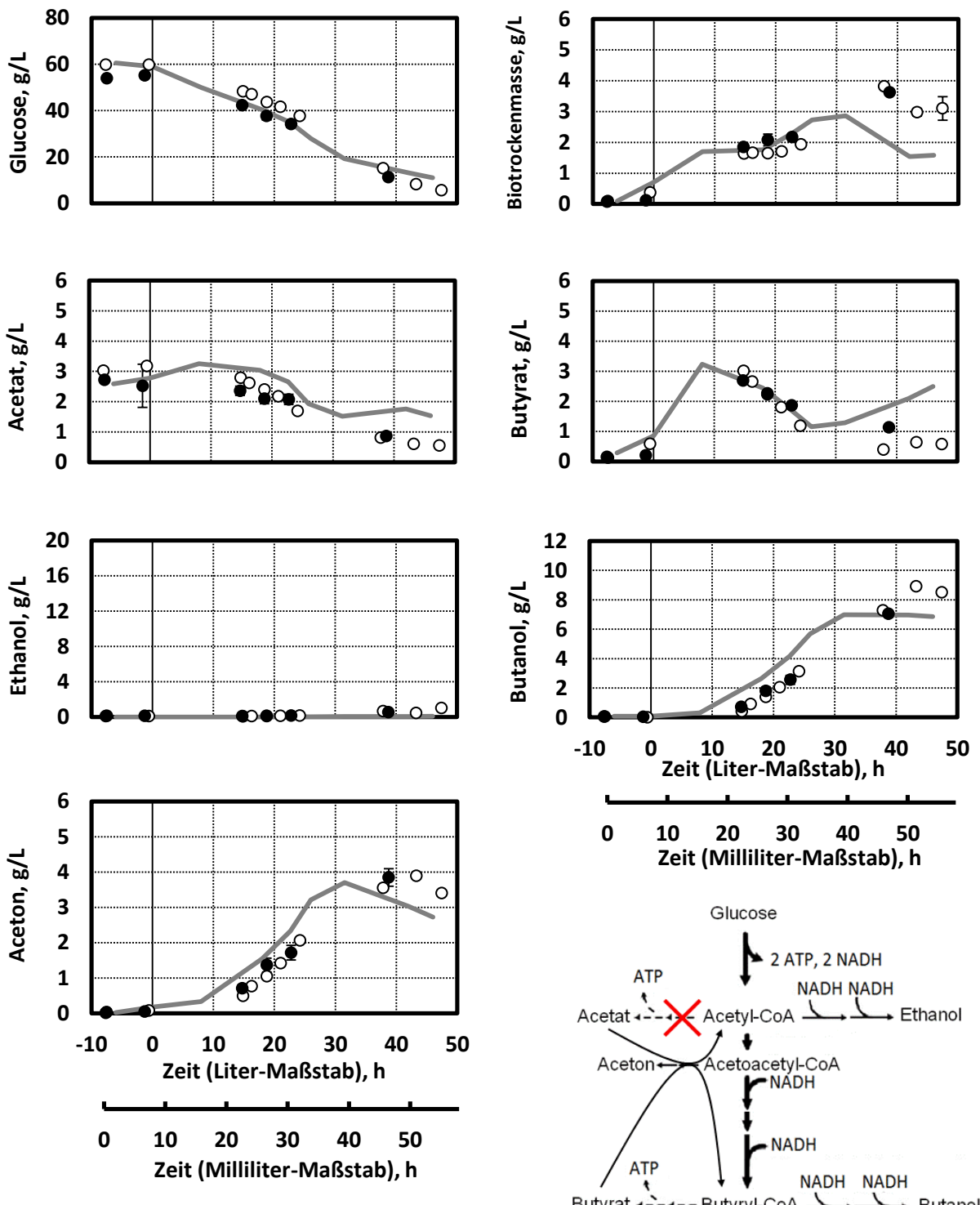


Abbildung 7.4: Charakterisierung von *C. acetobutylicum pta::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

Zum Schluss des Satzprozesses fand jedoch im Gegensatz zum Referenzprozess keine acidogene Phase mehr statt und Butyrat wurde nahezu vollständig wieder aufgenommen. Ethanol wurde wie beim Wildtyp kaum produziert. Die Butanolbildung setzte bei *C. acetobutylicum pta::int* um 5 Stunden verspätet ein, war aber qualitativ bis kurz vor dem Ende der Kultivierung vergleichbar mit der des Wildtypstamms.

Lediglich am Ende wurde im Reaktor über 8,5 g/L Butanol und damit circa 1,5 g/L mehr Produkt als bei dem Referenzprozess festgestellt. Die Acetonbildung war auch leicht verzögert und zum Schluss der Kultivierung wurden geringfügig höhere Konzentrationen gemessen als beim Referenzprozess mit dem Wildtypstamm.

Diskussion:

Im Rahmen der Veröffentlichung mit den Kooperationspartnern (Lehmann *et al.*, 2012) wurde auch die Kultivierung dieses rekombinanten Stamms beschrieben, allerdings ohne die Vorlage von Acetat im Medium. Die Versuche, die hier beschrieben sind, wurden jedoch mit dem standardisierten MS-MES Medium durchgeführt, indem sich 2,3 g/L Acetat befinden. Bei den Versuchen ohne im Medium vorgelegten Acetat verhielt sich der Stamm sehr ähnlich zu dem Wildtypstamm mit der Ausnahme, dass weniger Acetat produziert wurde.

Die Deletion der Phosphotransacetylase hatte im Satzverfahren kaum Auswirkungen auf den Konzentrationsverlauf von Glucose. Das Zellwachstum war zu Beginn der Satzkultivierung auch nicht beeinträchtigt, allerdings lagen zum Ende des Prozesses mit einer Biotrockenmassekonzentration von 3 g/L deutlich mehr Zellen vor als beim Wildtyp mit 1,6 g/L. Das lag sehr wahrscheinlich daran, dass Butanol erst später produziert wurde und somit der inhibierende Effekt auch erst später zum Tragen kam. Zu Beginn wurde etwas Acetat produziert, was daran liegen kann, dass das Enzym Phosphotransbutyrylase auch Aktivität mit Acetyl-CoA als Substrat aufweist (Wiesenborn *et al.*, 1989). Dass zum Schluss des Prozesses hin mehr Butanol gebildet wurde, liegt wahrscheinlich daran, dass bei *C. acetobutylicum pta::int* keine zweite Acidogenese eingeleitet wurde. Das kann aus der Deletion des Enzymes resultieren. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht belegt werden. Es ist festzuhalten, dass eine leichte Steigerung der Butanolkonzentration mit Hilfe dieser Deletion erreicht werden konnte und dass das Nebenprodukt Acetat deutlich vermindert produziert wurde. Die Butanolproduktion setzte allerdings im Vergleich zum Wildtypstamm circa fünf Stunden verspätet ein.

7.1.5 Doppeldeletion: *Clostridium acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int*

In dem Stamm *Clostridium acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* war zunächst das Gen *adc* deletiert. Um einen effektiven Selektionsmarker in Form einer Erythromycin Resistenz zu erhalten, musste die Erythromycin-Resistenz-Kassette (RAM) der ersten Deletion inaktiviert werden. Die darauf erfolgende Deletion des Genes *pta* brachte dann wieder eine Resistenz ein. Die gleichzeitige Deletion von *pta* und *adc* sollte eine starke Inhibierung der Acetat- und Acetonproduktion zur Folge haben (siehe Abb. 7.5, rechts unten). Butyrat könnte über den, unter Kapitel 7.1.3 beschriebenen Stoffwechselweg wieder aufgenommen werden.

Abbildung 7.5 zeigt die Produktkonzentrationen während der Satzkultivierungen von *Clostridium acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* in Rührkesselreaktoren im Liter- und im Milliliter-Maßstab im Vergleich zu den jeweiligen Konzentrationen während des Referenzlaufes mit dem Wildtypstamm. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 5 Stunden verschoben. Die Konzentrationen ähneln sich in beiden Maßstäben sehr. Im Vergleich zum Wildtyp (mit 1,2 g/(L h)) zeigte *C. acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* mit 0,9 g/(L h) eine geringere Aufnahmerate von Glucose und ein leicht eingeschränktes Wachstum, vor allem während der Solventogenese. So lagen zum Schluss noch 30 g/L Glucose im Medium vor. Da kein Absterben der Zellen zum Ende der Kultivierung stattfand, stieg die Konzentration der Biotrockenmasse stetig bis auf einen Endwert von 2 g/L. Acetat wurde aktiv produziert und akkumulierte schließlich bis zu 4,5 g/L. Butyrat wurde zunächst bis zu 2 g/L produziert und im Anschluss fast vollständig wieder aufgenommen. Mit 2,5 g/L wurde deutlich mehr Ethanol als beim Wildtyp gebildet. Butanol hingegen wurde nur vermindert bis zu 3,5 g/L produziert. Aceton und Acetoacetat wurde nur in Spuren produziert.

Diskussion:

Es zeigte sich, dass die Unterbindung der Acetonproduktion durch die Deletion des Gens *adc* die Unterbrechung der Reassimilation von Acetat, nicht jedoch von Butyrat zur Folge hatte und kein Acetoacetat akkumulierte. Die geringe Konzentration von Aceton resultierte aus dem Zerfall des Acetoacetats. Von diesem Stamm wurde mehr Acetat gebildet, was auf der Aktivität des Enzyms Phosphotransbutyrylase mit dem Substrat Acetyl-CoA begründet werden kann (Wiesenborn *et al.*, 1989). Die Akkumulation beruht auf der Deletion des *adc* Genes, somit war die Wiederaufnahme unterbrochen.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

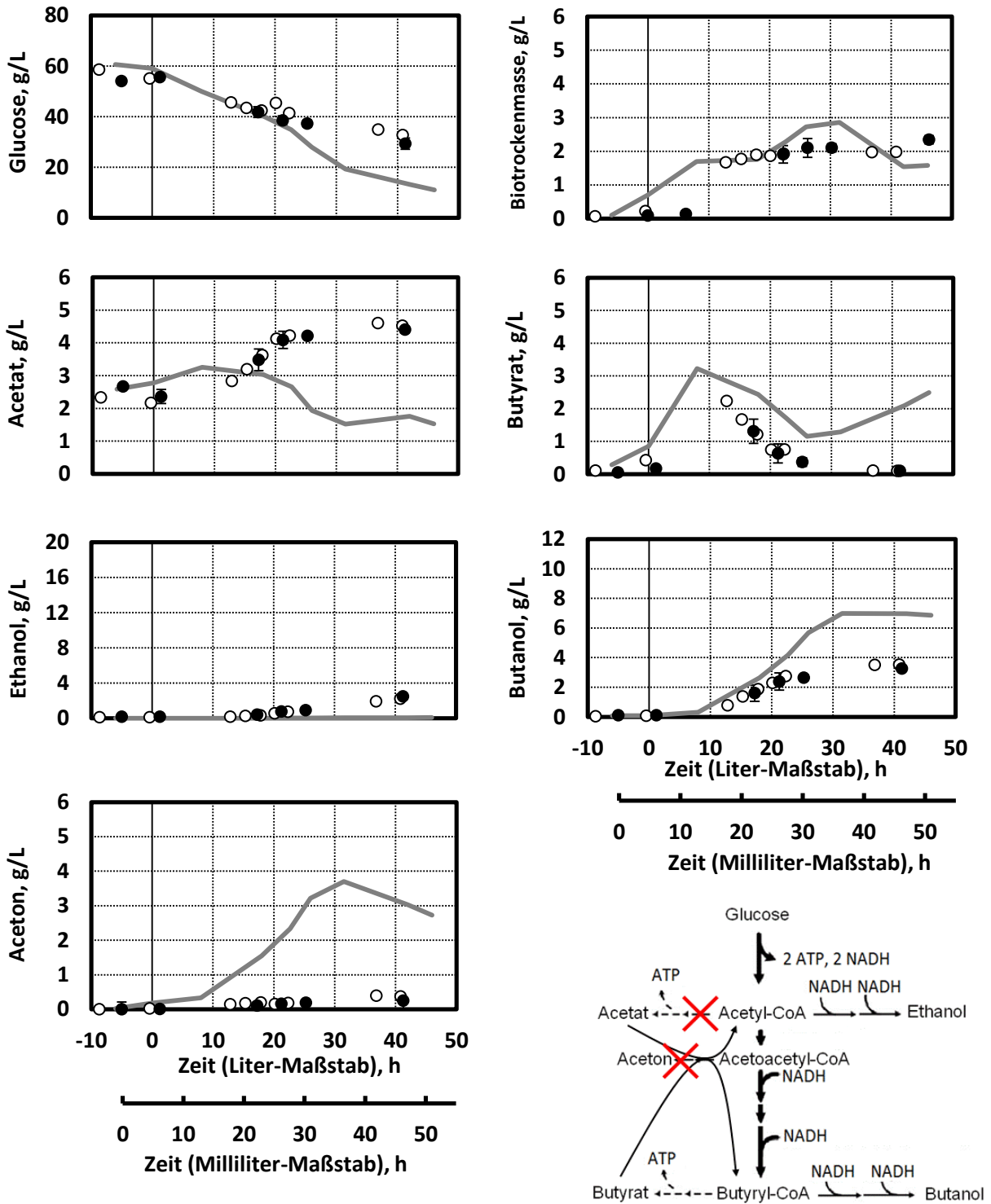


Abbildung 7.5: Charakterisierung von *C. acetobutylicum* *adc::intΔRAM-ptg::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

7.1.6 Doppeldeletion: *Clostridium acetobutylicum pta::intΔRAM-adc::int*

Im Stamm *C. acetobutylicum pta::intΔRAM-adc::int* wurden, ähnlich wie in *C. acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* die Gene *pta* und *adc* abgeschaltet, jedoch in umgekehrter Reihenfolge. Das bedeutet, dass auch die Lage der Erythromycin Resistenz im Genom eine andere ist und zudem die inaktivierte Erythromycin Resistenz an einer anderen Position im Genom liegt. Es kann trotzdem vermutet werden, dass keine phänotypischen Unterschiede auftreten, ebenfalls keine Acetonproduktion und eine dem anderen Stamm *C. acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* ähnliche Acetatproduktion zu beobachten sein sollte.

In Abbildung 7.6 sind sämtliche Konzentrationen bei Satzkultivierungen in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab, sowie im Milliliter-Maßstab in MS-MES Medium gezeigt. Zudem sind für einen charakterisierenden Vergleich Konzentrationsverläufe der Referenzkultivierung mit dem Wildtyp aufgetragen. Zunächst ist wieder festzuhalten, dass die Konzentrationen während der Satzkultivierung in Rührkesselreaktoren in beiden Maßstäben sehr gut vergleichbar sind.

Die Glucoseaufnahme sowie das Wachstum von *C. acetobutylicum pta::intΔRAM-adc::int* waren deutlich gehemmt gegenüber dem Wildtyp. Am Ende der Satzkultivierung lagen noch circa 40 g/L Glucose vor und insgesamt wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 1,5 g/L nicht überschritten. Es wurde kein Acetat gebildet, da die Acetatkonzentration auf der Anfangskonzentration stagnierte. Butyrat wurde bis zu 4 g/L gebildet und dann ansatzweise wieder aufgenommen. Im Verlauf der Kultivierung wurde kein Ethanol produziert, Butanol wurde, im Vergleich mit dem Wildtypstamm, nur in sehr geringem Umfang von 2 g/L produziert. Aceton wurde ebenfalls kaum gebildet. Alle gemessenen Konzentrationen lagen hier unter 0,3 g/L.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

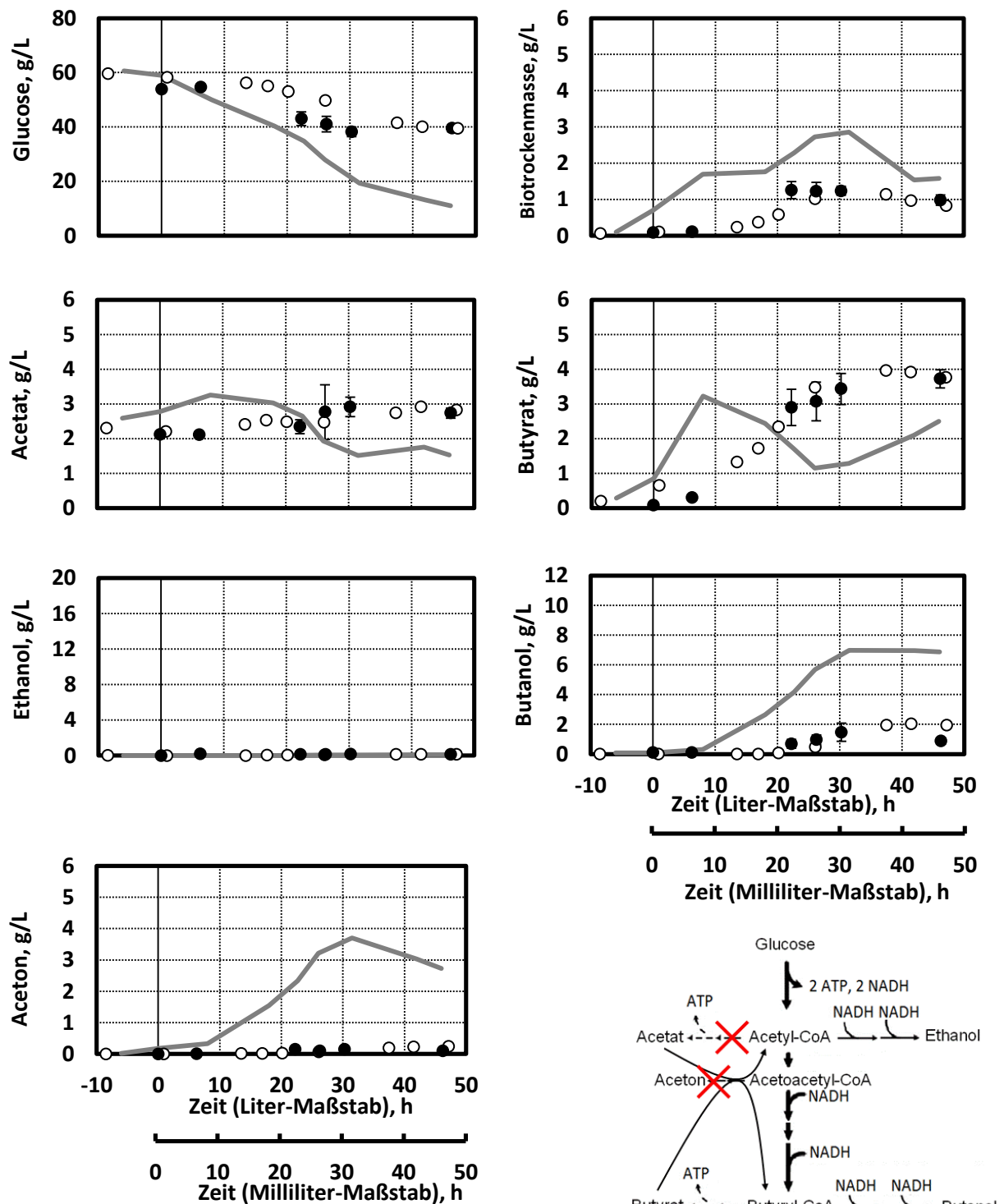


Abbildung 7.6: Charakterisierung von *C. acetobutylicum* *pta::intΔRAM::adc::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

Diskussion:

Es fällt auf, dass die rekombinanten Stämme *Clostridium acetobutylicum pta::intΔRAM- adc::int* (kurz: pta_adc Integrate in dieser Diskussion), sowie *Clostridium acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int* (kurz: adc_pta Integrate in dieser Diskussion) zwar beide kein Aceton produzieren, ansonsten jedoch große Unterschiede aufweisen. Da die adc_pta Integrate in eine solventogene Phase eintritt, zu erkennen an der ausgeprägten Aufnahme von Butyrat und signifikanten Produktion von Butanol, und die pta_adc Integrate nicht in eine solventogene Phase eintritt, kann der Unterschied an dem Fortschritt der jeweiligen Kultivierung liegen. Dafür spricht auch, dass die pta_adc Integrate vergleichsweise langsam anwächst und nur eine sehr geringe Biotrockenmassekonzentration von unter 1,5 g/L erreicht. Damit lassen sich auch die niedrigen Ethanol- und Butanolkonzentrationen von pta_adc Integrate im Vergleich zur adc_pta Integrate im Verlauf der Kultivierung erklären.

Von den beiden Stämmen konnten keine Sporensuspension erhalten und eingefroren werden. Die Stammhaltung erfolgte daher auf anaeroben Agarplatten. Eine mögliche Ursache dafür sind die wenig ausgeprägten solventogenen Phasen und somit auch eine fehlende Sporulation.

Festzuhalten ist, dass die Richtung der Doppeldeletion starke Auswirkungen auf die jeweiligen rekombinanten Stämme haben kann.

Da die Doppeldeletion von *adc* und *pta* zu keiner Erhöhung der Butanolkonzentration führte, wurde eine weitere Doppeldeletionsmutante untersucht. Aus den Erkenntnissen, dass eine einfache Deletionsmutante von *pta* in einer leichten Erhöhung der Butanolkonzentration resultierte, die von *adc* jedoch in einer niedrigeren, wurde versucht, den Stoffwechselweg zu Aceton über das davor stehende Enzym *ctfAB* zu verhindern.

7.1.7 Doppeldeletion: *Clostridium acetobutylicum pta::intΔRAM-ctfA::int*

Im Stamm *C. acetobutylicum pta::intΔRAM-ctfA::int* war sowohl die Expression von Phosphotransacetylase über eine Deletion von *pta* als auch die Expression von Coenzym A Transferase (ctfAB) über eine Deletion der *ctfA* unterbrochen. *ctfA* ist Teil des Sol-Operons, das für Enzyme der solventogenen Phase von *C. acetobutylicum* codiert und auf dem Megaplasmid pSOL1 liegt. ctfAB katalysiert die Bildung von Acetoacetat unter Übertragung der CoA-Gruppe auf Butyrat oder Acetat (siehe Abbildung 7.7, rechts unten). CtfAB ist essentiell für die Bildung von Aceton, verbunden mit der Aufnahme von Acetat und Butyrat während der solventogenen Phase. Durch die gleichzeitige Ausschaltung von *pta* und *ctfA* sollte nach dem bekannten Stoffwechselschema (siehe auch Abbildung 7.7) eine Einschränkung der Aceton- und Acetatproduktion vorliegen. Butyrat sollte nach den bisher gewonnenen Ergebnissen aus Kapitel 7.1.3 wieder aufgenommen werden können.

Abbildung 7.7 zeigt alle Konzentrationen bei der Satzkultivierung von *C. acetobutylicum pta::intΔRAM-ctfA::int*. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse der Fermentation in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab sehr ähnlich zu den Ergebnissen im Liter-Maßstab sind.

Die Glucoseaufnahme ist, ebenso wie das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, sehr eingeschränkt. Zum Ende der Satzkultivierung verblieben noch 40 g/L Glucose im Medium und eine Biotrockenmassekonzentration von 1,5 g/L wurde nicht überschritten. Acetat wurde während der Satzkultivierung des Stamms weder gebildet noch aufgenommen und die Konzentration blieb konstant. Butyrat hingegen wurde bis zu 4 g/L produziert, jedoch nicht wieder aufgenommen. Es war kein Übergang in eine solventogene Phase zu erkennen, da weder Ethanol noch Aceton produziert wurden und Butanol auch nur in sehr geringen Konzentrationen von unter 1 g/L vorlag. Acetoacetat konnte im Fermentationsüberstand ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

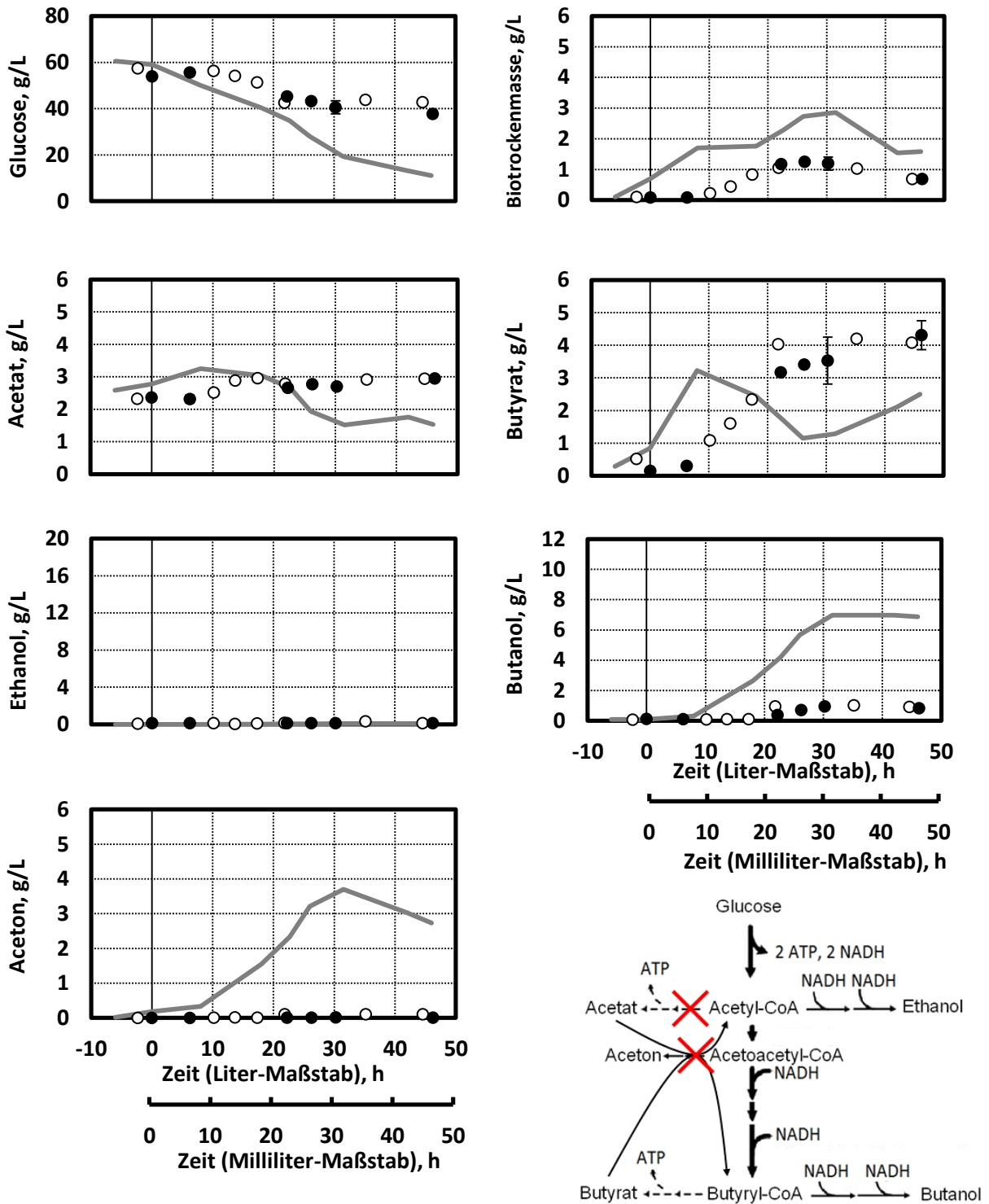


Abbildung 7.7: Charakterisierung von *C. acetobutylicum pta::intΔRAM::ctfA::int* im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Deletion im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden bei Referenzbedingungen statt

Diskussion:

Die Ausschaltung der Produktion mehrerer Nebenprodukte auf genetischem Wege, war auf diese Weise nicht möglich. Zwar zeigte der rekombinante Stamm *Clostridium acetobutylicum pta::intΔRAM-cffA::int* die verminderte Produktion von Acetat und Aceton, jedoch brach damit verbunden auch die produzierte Butanolkonzentration ein. Das schlechte Wachstum des Stamms kann als Grund dafür gesehen werden. Dass der Stamm nicht aktiv in die solventogene Phase eingetreten ist, kann aus dem beobachteten Wachstumsverhalten geschlossen werden.

Dieser Stamm bildete, wie auch die anderen beiden Doppeldeletionsmutanten (*C. acetobutylicum pta::intΔRAM-adc::int* und *C. acetobutylicum adc::intΔRAM-pta::int*), unter den standardisierten Bedingungen keine Sporen und die Stammhaltung musste daher auf Agarplatten erfolgen. Dass keine Sporulation initiiert wurde kann wiederum ein Resultat aus der fehlenden solventogenen Phase sein.

7.2 Überexpressionsstämme

7.2.1 Überexpressionsstamm *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd*

Im Stamm *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* war die Expression der Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*) erhöht. Das Gen *bcd* ist neben *crt*, *ctfAB* und *hbd* ein Teil des BCS Operons (Boynton *et al.*, 1996). Das von dem Gen *bcd* codierte Enzym ist die Butyryl-CoA Dehydrogenase (*bcd*). Diese katalysiert die Reaktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA. Diese Reaktion ist über den ETF (Electronen Transfer Flavoprotein) gekoppelt mit der Reduktion von NADPH oder FADH₂ (Gheshlaghi *et al.*, 2009). Als Ergebnis dieser Überexpression könnte theoretisch ein verstärkter Fluss von Kohlenstoff in die Produktion von C₄-Körpern erfolgen. Also wurde eine erhöhte Produktion von Butyrat während der Acidogenese als auch von Butanol während der Solventogenese erwartet.

Abbildung 7.8 zeigt alle Produktkonzentrationen während der Satzfermentation in Rührkesselreaktoren von *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* im Vergleich zum Wildtyp. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 10 Stunden verschoben. Die Konzentrationen waren wieder in allen Maßstäben vergleichbar. Die vorhandene Glucose wurde bereits nach 20 Stunden komplett verstoffwechselt, was einer Glucoseaufnahmerate von 2,4 g/(L h) entspricht. Beim Wildtypstamm war diese Rate 0,9 g/(L h) bei 20 Stunden und nach knapp 50 Stunden lag noch ein Rest von 10 g/L vor. Die maximale Biotrockenkonzentration von *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* lag mit ungefähr 4 g/L nach 15 Stunden vor, war damit ungefähr 35 % höher als beim Wildtyp und lag 10 Stunden vor dem Maximum des Wildtypstamms vor. Die maximalen Säurekonzentrationen wurden nicht aufgezeichnet, allerdings sind die qualitativen Verläufe etwas niedriger als beim Wildtypstamm, was für eine verbesserte Reassimilation spricht. Ethanol wurde mit 1 g/L etwas mehr als bei der Referenzkultivierung mit dem Wildtypstamm produziert.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

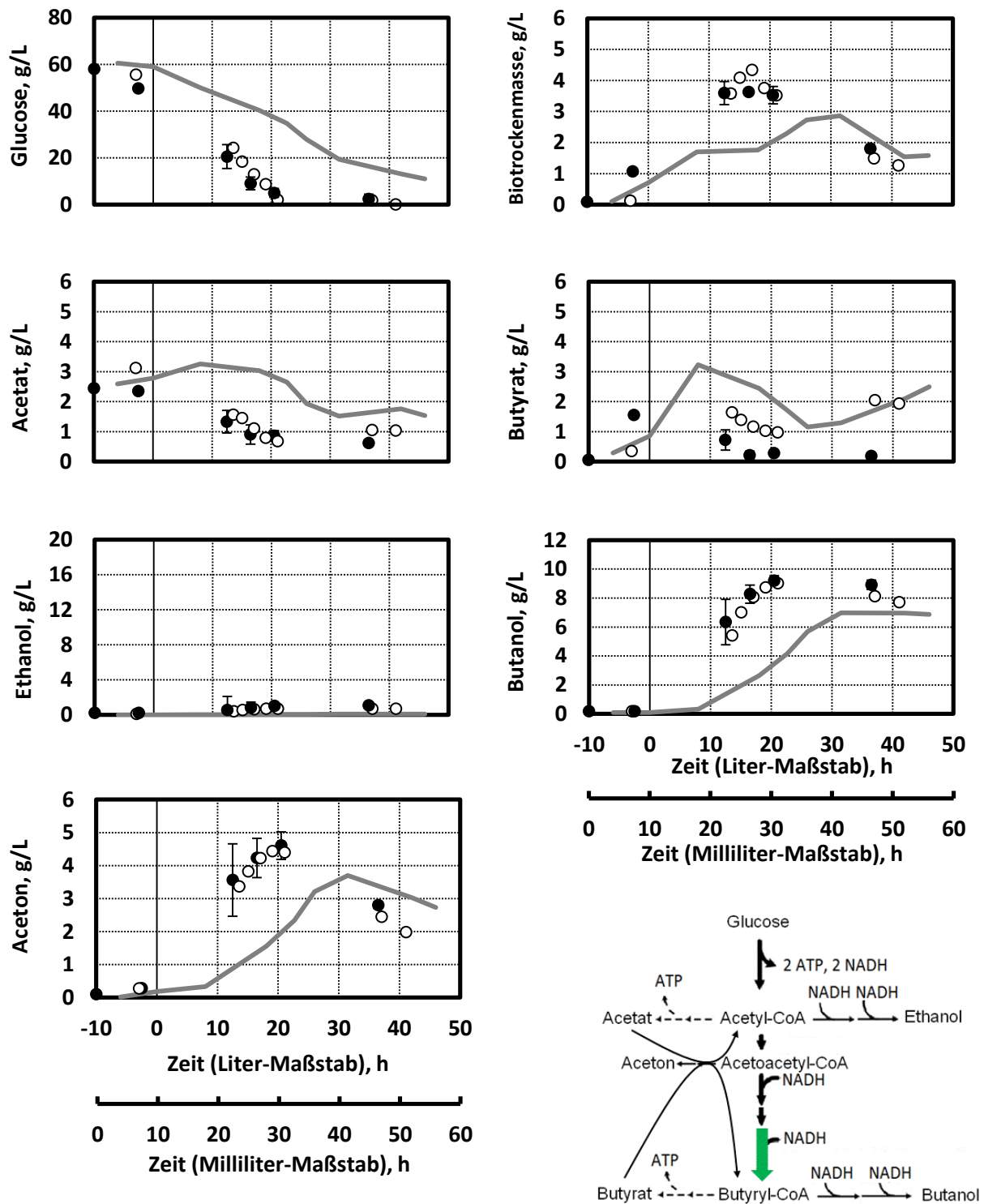


Abbildung 7.8: Charakterisierung von *C. acetobutylicum* ÜE-pT::bcd im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Überexpression im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

Es war auch zu beobachten, dass die Butanolproduktion signifikant früher einsetzte und in einem höheren Maximalwert resultierte. So lagen nach circa 13 Stunden bereits 6 g/L Butanol bei dem Überexpressionsstamm vor, während bei einer Wildtypkultivierung noch unter 2 g/L produziert wurde. Die maximale Butanolkonzentration betrug 9 g/L nach 20 Stunden. Die Acetonkonzentration verlief qualitativ ähnlich. Die Produktion setzte früher ein und das Maximum lag nach bereits 20 Stunden bei 4,4 g/L. Mit dem Wildtypstamm wurden knapp 4 g/L nach 31 Stunden erreicht. Auffällig ist der, dem Wildtypstamm ähnliche, Abfall der Zellkonzentration (c_{BTM}) ab dem Erreichen der maximalen Butanolkonzentration.

Diskussion

Die Überexpression des Gens *bcd* in *Clostridium acetobutylicum* resultierte in einer Beschleunigung des Wachstums und einer schnelleren Lösemittelproduktion, vor allem von Butanol. Eine höhere Konzentration bei nicht begasten Kultivierungen kann nicht unbedingt erwartet werden, da bei dem Erreichen der maximalen Butanolkonzentration bereits keine Glucose mehr im Medium vorlag. Der starke Abfall der Biotrockenmassekonzentration ab dem Maximum der Butanolkonzentration deutet auf ein plötzliches Ende der Produktion hin. Ein beschleunigter Stofffluss in C₄-Produkte konnte jedoch eindeutig bestätigt werden.

7.2.2 Überexpressionsstamm *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt*

Im Stamm *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* war das Gen *crt* überexprimiert. Das Gen *crt* codiert für Crotonase. *crt* ist das erste Gen des postulierten Transkriptionsstartpunkts im BCS-Operon (Boynton *et al.*, 1996). Das Enzym katalysiert unter Abspaltung von Wasser die Umwandlung von 3-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA (Gheshlaghi *et al.*, 2009).

Wie auch bei dem in Kapitel 7.2.1 beschriebenen Stamm *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* könnte diese Überexpression in einem verstärkten Kohlenstofffluss hin zu den C₄-Körpern resultieren, der sich in einer erhöhten Butyrat- und Butanol Produktion zeigen könnte.

Abbildung 7.9 zeigt die Konzentrationen während der Satzfermentation in Rührkesselreaktoren von *C. acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* im Vergleich zum Wildtyp. Die Dauer der Verzögerungsphase im Milliliter-Maßstab konnte aufgrund der fehlenden pH Messung in den Milliliter-Rührkesselreaktoren nicht exakt bestimmt werden. Für den Vergleich der Konzentrationen aus beiden Maßstäben wurden die Zeitachsen der Konzentrationen im Milliliter-Maßstab um 7 Stunden verschoben. Die vorgelegte Glucose wurde im Gegensatz zum ÜE-pT::*bcd* Stamm nach circa 20 Stunden nicht gänzlich verstoffwechselt, jedoch lagen zu dieser Zeit nur noch 6 g/L Glucose vor und damit deutlich weniger als beim Wildtypstamm mit 35 g/L. Die Glucoseaufnahmerate in den ersten 20 Stunden war bei diesem Stamm mit 2,3 g/(L h) um 250 % höher als die des Wildtypstamms. Der Stamm erreichte während der Satzkultivierung in Rührkesselreaktoren eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 4 g/L nach 20 Stunden und wuchs somit deutlich schneller und höher als der Wildtypstamm (knapp 3 g/L nach 30 Stunden). Die maximale Butyratkonzentration lag, vergleichbar mit dem Wildtypstamm, bei knapp 3 g/L bevor die Wiederaufnahme begann. Ein Unterschied ist die deutlich erhöhte Acetatkonzentration mit 5 g/L statt 3 g/L bevor die Wiederaufnahme in der solventogenen Phase begann.

Die Solventogenese lief vergleichbar mit dem anderen Überexpressionsstamm ab. So wurde bis zu 1 g/L Ethanol produziert und verbunden mit einer frühen Butanolproduktion resultierte ein Maximalwert von 9 g/L Butanol nach 20 Stunden. Zu derselben Zeit lagen etwa 4,3 g/L Aceton in der Fermentationslösung vor.

7. Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *Clostridium acetobutylicum*

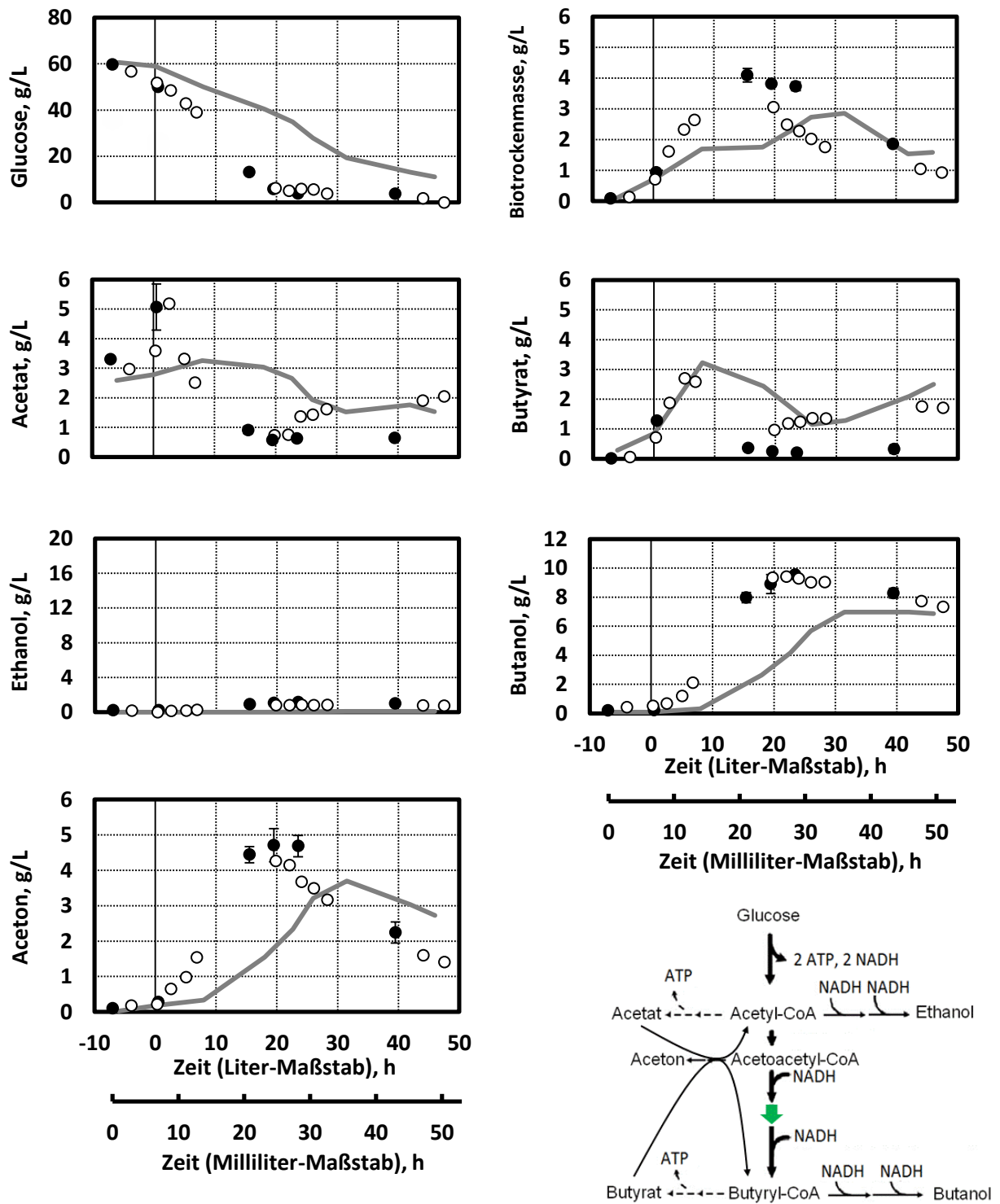


Abbildung 7.9: Charakterisierung von *C. acetobutylicum* UE-pT::crt im Satzverfahren im Liter- (weiße Kreise) und Milliliter-Rührkesselreaktor (schwarze Kreise; Standardabweichung aus drei Prozessen) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linie). Aufgelistet sind die Konzentrationsverläufe aller Produkte und eine vereinfachte Darstellung der Überexpression im Stoffwechsel (rechts unten). Die Versuche fanden unter Referenzbedingungen statt.

Diskussion:

Die Überexpression des Genes *crt* in *Clostridium acetobutylicum* resultierte, ähnlich zu der Überexpression des *bcd* Genes, in einer Beschleunigung des Wachstums und einer schnelleren Lösemittelproduktion. Der beschleunigte Stofffluss hin zu C₄ Produkten konnte hier eindeutig bestätigt werden.

Die Skalierbarkeit der Kultivierung konnte anhand der gemessenen Konzentrationen in Abbildung 7.9 bestätigt werden. Lediglich eine Abweichung der Säurekonzentrationen zum Ende der Kultivierung hin wurde beobachtet. Diese resultiert sehr wahrscheinlich aus einem Unterschied der Glucosekonzentration von ungefähr 3 g/L nach 25 Stunden. Die verbleibende Glucose konnte noch zu Säuren umgesetzt werden bevor der Prozess zum Erliegen kam.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden sieben Deletionsmutanten, darunter zwei Doppeldeletionsmutanten, reaktionstechnisch charakterisiert. Alle vorgenommenen Deletionen waren stabil und zeigten typische Charakteristika bei der Satzkultivierung des jeweiligen Stamms. Eine Erhöhung der maximalen Butanolkonzentration konnte nur bei einem Stamm, nämlich *Clostridium acetobutylicum pta::int*, gezeigt werden. Allerdings war die erreichte Steigerung, von 7 g/L (Wildtyp) auf 8,5 g/L, vergleichsweise gering und zusätzlich verbunden mit einer Verzögerung des Maximums der Butanolkonzentration um fünf Stunden. Das führte dazu, dass dieser Ansatz nur bedingt weiter verfolgt wurde. Bei der Einführung weiterer Deletionen brach die Butanolproduktion bei jedem Stamm ein.

Die Überexpressionsmutanten hingegen zeigten eine weitaus schnellere Produktion von Butanol, mit einer Erhöhung der maximalen Butanolkonzentration von 7 g/L auf knapp 10 g/L und das bei einer Verkürzung der Prozesszeit bis zum Erreichen des Maximums um 30 %. Diese Stämme wurden als vielversprechend eingestuft.

Die Skalierbarkeit der Satzkultivierungen in Rührkesselreaktoren konnte für alle sieben Deletionsstämme, sowie für die beiden Überexpressionsstämme sehr gut gezeigt werden. Damit ist belegt, dass der Bioreaktorblock sehr gut für eine Charakterisierung von anaeroben *Clostridium acetobutylicum* Stämmen zu verwenden ist.

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Reaktionstechnische Analysen wurden mit dem Wildtypstamm durchgeführt, um positive Effekte, vor allem von Medienkomponenten, auf den Verlauf der Kultivierung ausfindig zu machen. Diese Erkenntnisse sollten im Anschluss auf den oder die besten rekombinanten Stämme im Satzverfahren angewendet werden. Für die reaktionstechnischen Untersuchungen wurde in den meisten Fällen der unter Kapitel 6 validierte und etablierte Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab verwendet.

8.1 Anfangs-pH

Da der pH das Einleiten der Solventogenese beeinflusst wurde der Anfangs-pH variiert. Ausgehend von dem definierten MS-MES Standardmedium wurde untersucht, welcher pH zu der schnellsten und besten Lösemittelproduktion führt. Hierzu wurden die gleich angeimpften Medien mit Schwefelsäure und Kaliumhydroxid auf den gewünschten pH zwischen pH 4,75 und pH 6,00 in Schritten von pH 0,25 eingestellt. Anschließend wurden zu verschiedenen Prozesszeiten Proben genommen und analysiert.

Abbildung 8.1 zeigt die Glucosekonzentrationen, die nach 0 h, 28 h, 34 h und 46 h in den Rührkesselreaktoren bestimmt wurden. Zunächst war die Aufnahme des Zuckers relativ ähnlich, nur die Ansätze mit niedrigen Anfangs-pH zeigten eine leicht verlängerte Verzögerungsphase. Die meiste Glucose wurde im Standardansatz mit einem Start-pH von pH 5,5 verstoffwechselt ($Q_s = 0,85 \text{ g}/(\text{L h})$ in den ersten 28 Stunden). Die Werte nach 34 und 46 Stunden verhielten sich ähnlich zu den jeweiligen vorherigen. Auffällig war, dass bei hohen Start-pH, ab pH 5,75, zum Ende der Satzkultivierung weniger Glucose verstoffwechselt wurde. Der Ansatz mit pH 5,5 zeigte den ausgeprägtesten Verbrauch von Glucose mit einer durchschnittlichen Glucoseaufnahme von $1 \text{ g}/(\text{L h})$. Die Ansätze mit den Anfangs-pH 5,00 und pH 5,25 kamen dieser Rate mit $0,93 \text{ g}/(\text{L h})$ noch nahe, alle anderen waren deutlich geringer.

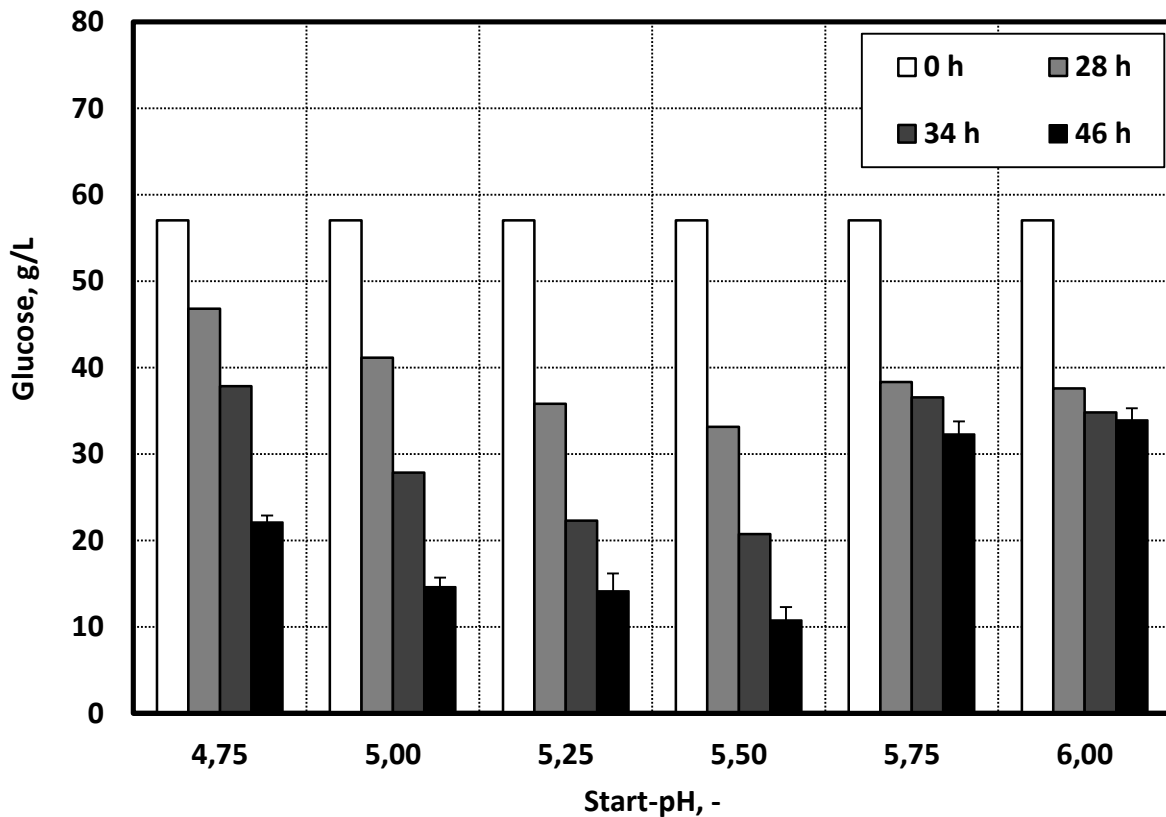


Abbildung 8.1: Glucosekonzentration nach 0 h, 28 h, 34 h und 46 h bei ABE Fermentationen in Milliliter-Rührkesselreaktoren im Satzverfahren bei verschiedenen eingestellten pH zu Versuchsbeginn. Alle anderen Prozessgrößen entsprechen dem Referenzversuch. Die Standardabweichung von 46 Stunden wurde aus der Bestimmung von drei Reaktoren durchgeführt. Alle anderen Werte sind Mittelwerte aus Zweifachansätzen.

Die zu den gleichen Zeitpunkten bestimmten Butanolkonzentrationen sind in Abbildung 8.2 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die schnellste Produktion von Butanol ebenfalls im Ansatz mit einem Start-pH von 5,5 erfolgte. Bei höheren pH fand nahezu kaum Butanolproduktion statt und die erreichten Endkonzentrationen lagen auch jeweils unter 3 g/L. Bei den niedrigeren Anfangs-pH lagen die Endkonzentrationen relativ ähnlich bei ungefähr 6 g/L. Der höchste Wert der Butanolkonzentration wurde bei einem Anfangs-pH von 5,0 gemessen. Allerdings zeigte dieser Ansatz, wie auch der von pH 4,75, eine große Zunahme an Butanol zwischen $t = 34$ Stunden und $t = 46$ Stunden im Gegensatz zu dem mit pH 5,5.

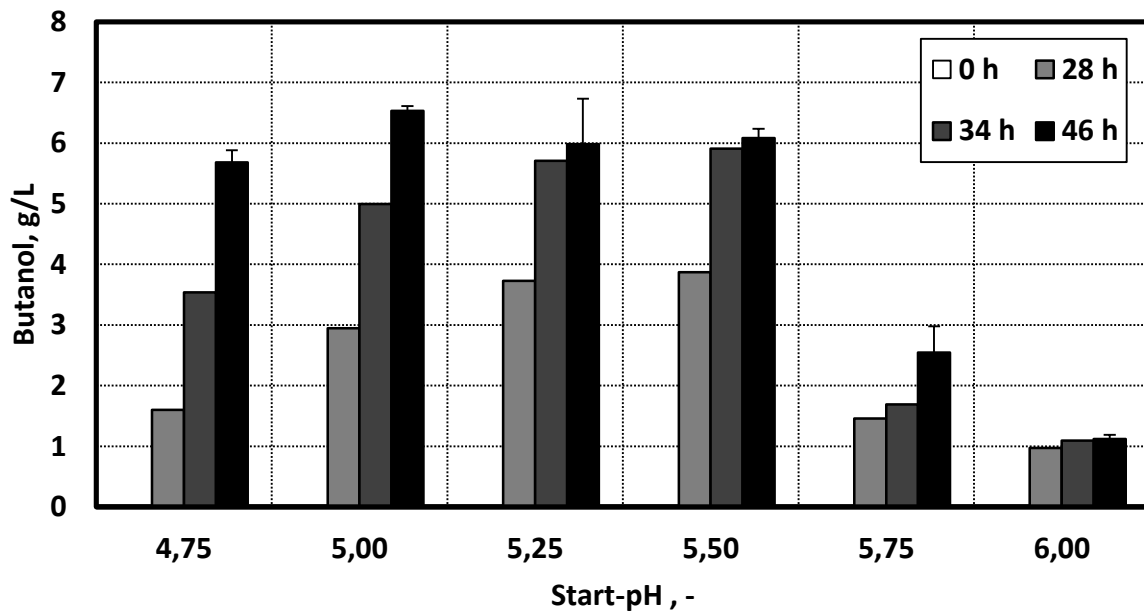


Abbildung 8.2: Auftragung der gebildeten Butanolkonzentrationen nach 0 h, 28 h, 34 h und 46 h bei ABE Fermentationen in Milliliter-Rührkesselreaktoren im Satzverfahren bei verschiedenen eingestellten pH zu Versuchsbeginn. Alle anderen Prozessgrößen entsprechen dem Referenzversuch. Die Standardabweichung von 46 Stunden wurde aus der Bestimmung von drei Reaktoren durchgeführt. Alle anderen Werte sind Mittelwerte aus Zweifachansätzen.

Diskussion:

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Anfangs-pH über pH 5,5 zu einer sehr geringen Lösemittelproduktion führt. Das lag daran, dass unter diesen Bedingungen keine Solventogenese initiiert wurde, sondern hauptsächlich Säuren gebildet (nicht gezeigt) und kaum Glucose aufgenommen wurde. In der Literatur ist beschrieben, dass bei einer entsprechend hohen Vorlage von Acetat und Butyrat die Solventogenese auch bei neutralem pH initiiert werden kann (Holt *et al.*, 1984), jedoch niedrige pH zwischen pH 4,5 und pH 5,5 zu weit höheren Lösemittelkonzentrationen führen. Bei niedrigeren Start-pH als pH 5,5 war der Wechsel in die Solventogenese gut sichtbar. Auffällig war, dass die Verzögerungsphase umso länger war, je niedriger der Anfangs-pH gewählt wurde. Sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Butanolproduktion waren beim Ansatz mit einem Anfangs-pH von pH 5,5 zu Beginn am schnellsten. Lediglich bei dem Produktendwert waren die niedrigeren Ansätze etwas besser. Aus dieser Charakterisierung wurde der beste Anfangs-pH für den Satzprozess mit pH 5,5 bestätigt.

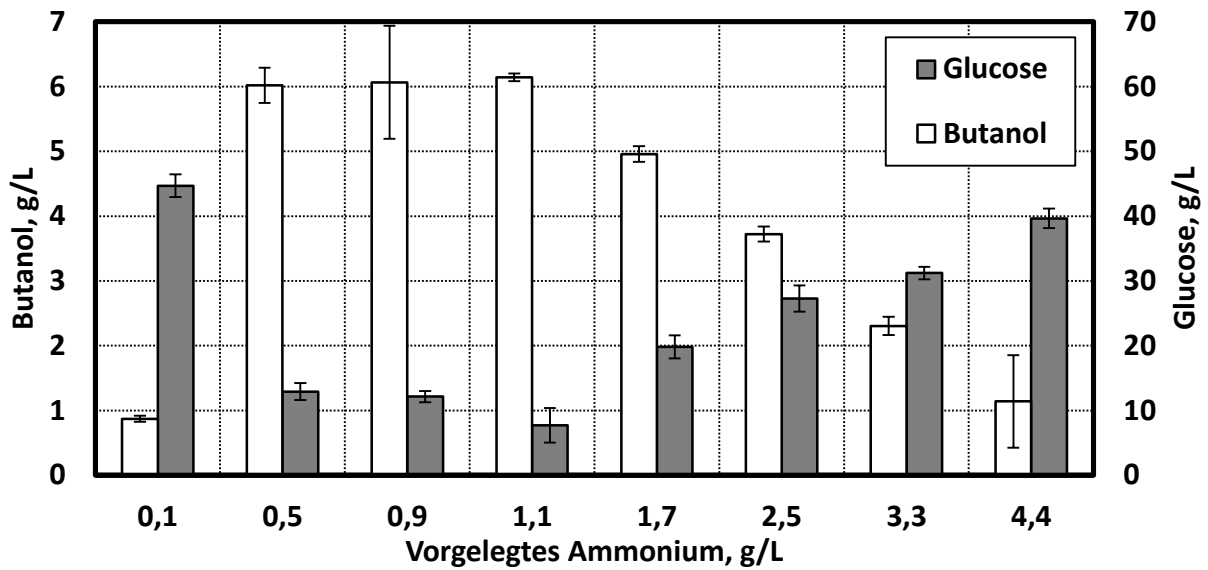
8.2 Ammonium

Ammonium stellt in MS-MES Medium die einzig vorhandene Stickstoffquelle dar. Stickstoff ist in allen Mikroorganismen ein essentielles Element für das Wachstum und den Stoffwechsel. Bei *Clostridium acetobutylicum* funktioniert die Aufnahme, wie bei den meisten anderen Mikroorganismen, die keinen molekularen Stickstoff aufnehmen können über anorganische Stickstoffquellen, wie z.B. Ammonium- oder Nitratverbindungen.

Deshalb wurde mit dem Bioreaktorblock der Einsatz verschiedener Anfangs Ammoniumkonzentrationen im Medium auf das Wachstumsverhalten und die Lösemittelproduktion mit *Clostridium acetobutylicum* im Satzverfahren untersucht. Hierzu wurde Ammoniumsulfat verwendet, da sich Sulfationen bereits im Medium befanden. Alle genannten Konzentrationen bezogen sich rein auf Ammonium. Bei dem Versuch wurden die Konzentrationen von 0,1 g/L; 0,5 g/L; 0,9 g/L (entspricht in etwa dem Standard MS-MES Medium mit 0,8 g/L); 1,1 g/L; 1,7 g/L; 2,5 g/L; 3,3 g/L und 4,4 g/L Ammonium eingesetzt. Um den genauen Wert der Anfangskonzentration zu erhalten wurde eine Ammoniumbestimmung durchgeführt.

Abbildung 8.3 A zeigt die Glucose- und Butanolkonzentrationen nach 48 Stunden in den verschiedenen Ansätzen. Es ist erkennbar, dass in den Ansätzen zwischen 0,5 g/L und 1,1 g/L Ammonium mit circa 6 g/L am meisten Butanol produziert und Glucose aufgenommen wurde. In höher konzentrierten Ansätzen fiel die Butanolkonzentration ab. Bei der niedrigsten Ammoniumkonzentration wurde nur unter 1 g/L Butanol produziert. Die Glucosekonzentrationen verliefen reziprok. Je mehr Butanol produziert wurde, desto mehr Glucose wurde aufgenommen. Abbildung 8.3 B zeigt die bei dem Versuch bestimmten Säurekonzentrationen nach 48 Stunden. Im Ansatz mit dem wenigsten vorgelegten Ammonium, waren mit circa 3 g/L Acetat und Butyrat vergleichsweise hohe Säurekonzentrationen im Medium vorhanden. Bei den Ansätzen bis 1,7 g/L waren die Konzentrationen nahezu vergleichbar mit etwa 2 g/L Buttersäure und 1 g/L Acetat. In den weiteren Ansätzen stiegen mit der Konzentration des vorgelegten Ammoniums beide Säurekonzentrationen stetig bis 2,5 g/L an.

A



B

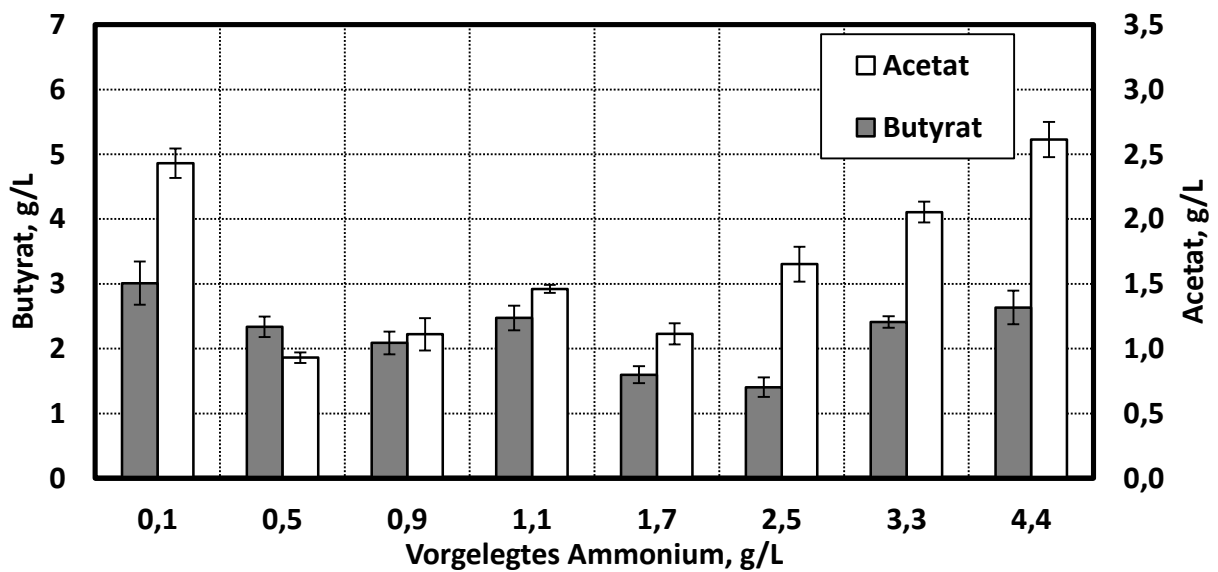


Abbildung 8.3: Auftragung der Butanol-, Glucose- (A) sowie Butyrat- und Acetatkonzentrationen (B) nach 48 Stunden von ABE Fermentationen im Satzprozess in Milliliter-Rührkesselreaktoren bei verschiedenen Anfangs Ammoniakkonzentrationen. Die anderen Prozessparameter entsprachen dem Referenzprozess. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Konzentrationen aus jeweils drei verschiedenen Reaktoren.

Diskussion:

Wie bereits bei Acetat in Kapitel 8.4 beschrieben, wird in der Literatur meist der Einfluss von Ammoniumacetat untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass das Verhältnis von Ammonium zu Glucose einen Einfluss auf die Kultivierung hat. Es hat sich gezeigt, dass umso mehr Säuren gebildet werden, desto höher dieses Verhältnis ist (Roos *et al.*, 1985). Diese Versuche wurden allerdings nur mit niedrigen Glucosekonzentrationen und unter Einsatz von Komplexmedienbestandteilen durchgeführt. Eine direkte Vergleichbarkeit war somit nicht gegeben. Gu beschreibt, dass Ammoniumacetat einen positiven Einfluss auf die Lösemittelproduktion in *Clostridium acetobutylicum* EA2018, einem dem Wildtyp sehr ähnlichen Stamm, besitzt (Gu *et al.*, 2009). Hierbei wurden nur Untersuchungen bis 1,1 g/L Ammonium durchgeführt und der Einsatz von Ammoniumacetat brachte zusätzlich Acetat ins Medium ein.

Am schlechten Ergebnis, bezogen auf die Butanolkonzentration, für die niedrigste eingesetzte Ammoniumkonzentration war erkennbar, dass eine gewisse Mindestmenge an Ammonium notwendig für die Zellen ist. Aufgrund der hohen Säurekonzentrationen und der hohen Glucosekonzentration in der Fermentationslösung war davon auszugehen, dass für die Zellen mitten in der Acidogenese eine Stickstofflimitation auftrat und der Stoffwechsel eingestellt wurde. Ein Optimum für die Butanolkonzentration konnte von 0,5 g/L bis 1,1 g/L Anfangs Ammoniumkonzentration ausgemacht werden. Bei höheren Ammoniumkonzentrationen setzte eine vermehrte Säureproduktion ein und eine Verminderung der Produktion von Lösemitteln konnte beobachtet werden. Auch konnte die Ammoniumkonzentration des Standard MS-MES Mediums, also 0,8 g/L, bestätigt werden.

8.3 Zusätzliche Spurenelemente und Ergänzungsstoffe

Bei allen weiteren untersuchten Anfangskonzentrationen von Medienkomponenten, beispielsweise Glucose, Eisensulfat Heptahydrat oder Acetat, die untersucht wurden, stellte sich heraus, dass die im Standardmedium eingesetzten Konzentrationen optimal waren. Auch die Untersuchung des volumetrischen Leistungseintrags ergab, dass bereits der optimale Wert eingesetzt wurde.

Deshalb wurde nicht weiter nach Verbesserungsansätzen, sondern nach dem Einfluss von zusätzlichen Spurenelementen, Zusätzen oder Substraten gesucht. Hierzu wurde in diversen

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Anaerobiermedien nach weiteren Zusätzen und die eingesetzten Konzentrationen für das MS-MES Medium recherchiert.

So wurden folgende Zusatzstoffe und Spurenelemente dem Standard MS-MES Medium hinzugefügt:

Tabelle 8.1: Spurenelemente und Zusätze (beispielsweise aus dem DSMZ Medium 135 (Wolin *et al.*, 1963) oder dem DSMZ Medium 141)

Zusatzstoff	c, g/L	Zusatzstoff	c, g/L	Zusatzstoff	c, g/L
Hefeextrakt	4	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,01	NaCl	0,011 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,001	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05 g/L
Pepton	10	Natriumthiosulfat	0,035	Asparagin·H ₂ O	2,273 g/L
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,001	Liponsäure	0,0005	Pantothenat	0,0005 g/L
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,018				

Die nach 30 und 48 Stunden im Satzverfahren im Milliliter-Rührkesselreaktor bestimmten Butanolkonzentrationen sind in Abbildung 8.4 aufgetragen. Die niedrige Butanolkonzentration von nur gut 5 g/L, die der Wildtypstamm in der Zeit produzierte, lag an der sehr langen Vorbereitungszeit. Einen signifikant negativen Effekt, also niedrigere Butanolkonzentrationen, zeigten Pepton und Asparagin bei den verwendeten Bedingungen. Zudem wurde bei diesen beiden Zusätzen eine starke Säureakkumulation beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da diese beiden Stoffe vergleichsweise viel Stickstoff in organisch gebundener Form enthalten, wurde geschlossen, dass derselbe Effekt wie bei zu hohen Ammoniumkonzentration aufgetreten war (siehe Kapitel 8.2). Im Medium wurden standardmäßig 0,8 g/L Ammoniumionen vorgelegt. Diese beiden Zusatzstoffe steigern den Stickstoffgehalt darüber hinaus beträchtlich. CaCl₂·2H₂O und MnSO₄·H₂O zeigten bei den angewendeten Konzentrationen einen leicht negativen Effekt auf die Butanolproduktion. Kupfer ist dafür bekannt, in höheren Konzentrationen antibakteriell zu wirken. In der verwendeten Konzentration zeigte sich kein Effekt, ebenso wie bei der Liponsäure und Natriumchlorid. Cobaltchlorid zeigte einen leicht positiven Effekt, was vermutlich daher stammt, dass Cobalt ein wichtiger Bestandteil von Vitamin B₁₂ ist.

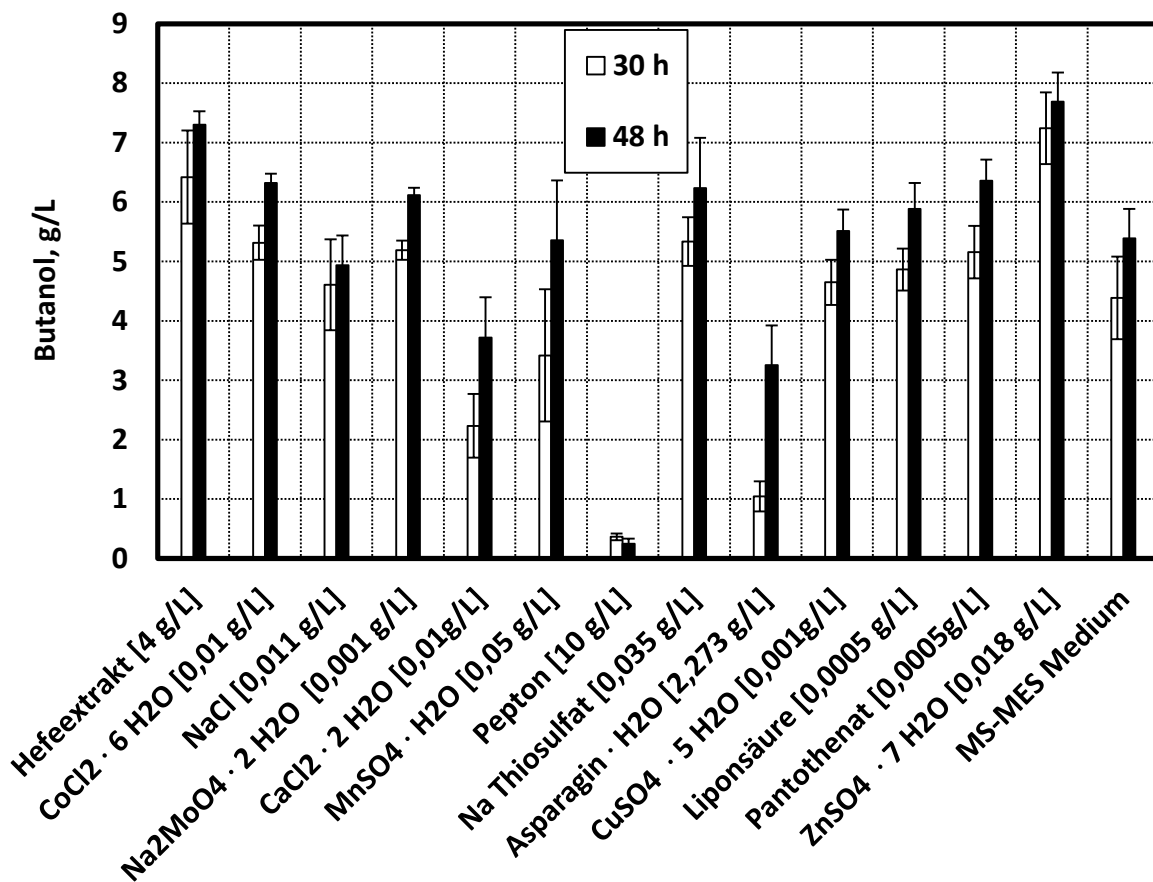


Abbildung 8.4: Vergleich der erreichten Butanolkonzentrationen bei einer Satzkultivierung von *C. acetobutylicum* in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab nach 30 Stunden und nach 48 Stunden. Dem Standard MS-MES Medium wurden zusätzliche Medienkomponenten hinzugefügt. Die weiteren Prozessparameter wurden dem Referenzprozess entsprechend gewählt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Konzentrationen aus drei verschiedenen Reaktoren dar.

Zu einem ähnlich positiven Effekt führte die Zugabe von Na₂MoO₄·2 H₂O, Natriumthiosulfat und Pantothenat, das ein Bestandteil von Coenzym A ist. Mit einem Blick auf die Standardabweichung aus einem Dreifachansatz ist festzustellen, dass diese Effekte nicht signifikant waren. Signifikante Verbesserungen wurden mit Hefeextrakt (über 7 g/L Butanol nach 48 Stunden) und Zinksulfat (über 7,5 g/L nach 48 Stunden) in den verwendeten Konzentrationen erzielt. Es wurde in beiden Ansätzen nicht nur mehr, sondern auch deutlich schneller Butanol produziert, was an den Vergleichswerten nach 30 Stunden zu erkennen ist.

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Diskussion:

Der Effekt, den Hefeextrakt hervorruft, beruht wahrscheinlich auf der universellen Erhöhung von Fettsäuren, Aminosäuren und diversen Vitaminen, die darin enthalten sind. Da Hefeextrakt im Vergleich zum Produkt Butanol teuer ist, wurde die Zugabe dieses Stoffs nicht weiter untersucht. Der Effekt, den Zinksulfat hervorruft, wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Es ist bekannt, dass Zinksulfat eine positive Auswirkung auf Hydrolysereaktionen haben kann (Coleman, 1998). Außerdem sind Zinkionen in verschiedenen DNA-bindenden Enzymen zu finden (Nies, 1999). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Stämme von *Clostridium beijerinckii*, die zu *C. acetobutylicum* nah verwandt sind, Zinkionen als aktive Zentren in deren Alkoholdehydrogenasen enthalten (Ismail et al., 1993). Welcher Effekt schlussendlich zum Tragen kommt, konnte nicht bestimmt werden.

Zur Validierung dieses Effekts und zur Untersuchung weiterer potentiell interessanter Spurenelemente wurde ein weiterer Versuch mit dem Parallelbioreaktorblock durchgeführt.

Tabelle 8.2: Weitere Spurenelemente und Konzentrationsstufen (beispielsweise aus dem DSMZ Medium 141)

Zusatzstoff	c, g/L	Zusatzstoff	c, g/L	Zusatzstoff	c, g/L
Thiamin	0,0005	Nicotinsäure	0,0005	KAl(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O	0,002
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,0004	Borsäure	0,001	NaCl	0,1
Pyridoxin-HCl	0,001	FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0,008	Na ₂ SeO ₄	0,0002
NaHCO ₃	10				
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,006	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,018	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,054

Der Effekt weiterer Spurenelemente und verschiedener Konzentrationsstufen (siehe Tabelle 8.2), sowie der Effekt einer Kombination aus den vielversprechenden Spurenelementen (CoCl₂·6 H₂O [0,01 g/L], Na₂MoO₄·2 H₂O [0,001 g/L], Natriumthiosulfat [0,035 g/L], Pantothenat [0,0005g/L], ZnSO₄·7 H₂O [0,018 g/L]) wurden auf deren Einfluss auf die Butanolproduktion von *Clostridium acetobutylicum* untersucht.

Die Butanolkonzentrationen nach 30 sowie 48 Stunden sind in Abbildung 8.5 gezeigt. Es trat eine verlängerte Verzögerungszeit auf, wahrscheinlich wieder aufgrund der langen

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Vorbereitungszeit für den Parallelansatz. Deshalb wuchsen alle Ansätze, inklusive der Referenz im MS-MES Medium langsamer.

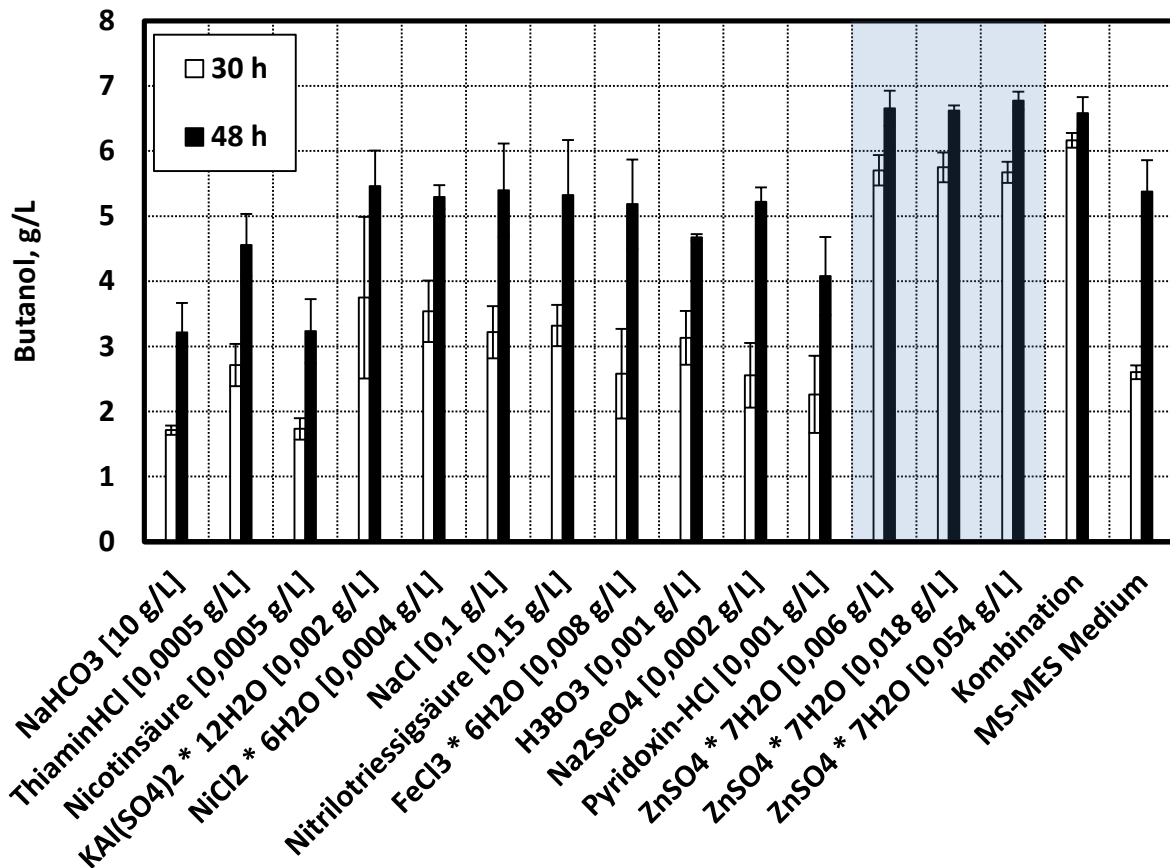


Abbildung 8.5: Vergleich der erzielten Butanolkonzentrationen bei Satzkultivierungen von *C. acetobutylicum* in Milliliter-Rührkesselreaktoren nach 30 Stunden und nach 48 Stunden. Dem Standard MS-MES Medium wurden zusätzliche Medienkomponenten hinzugefügt. Alle anderen Parameter wurden identisch zum Referenzprozess gehalten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Konzentrationen aus drei verschiedenen Reaktoren dar.

Alle zusätzlich untersuchten Spurenelemente zeigten keine Verbesserung bezüglich der Butanolproduktion. Die Zugabe von Zinksulfat zum MS-MES Medium zeigte in den drei verwendeten Konzentrationsstufen erneut eine deutliche Erhöhung der Butanolkonzentration (knapp 7 g/L) im Vergleich zum Standardmedium mit 5,5 g/L nach 48 Stunden. Die Produktion setzte auch schneller ein, erkennbar am Wert nach 30 Stunden der mit knapp 6 g/L über dem Wert von 3 g/L im MS-MES Medium liegt. Alle drei eingesetzten Konzentrationen von Zinksulfat zwischen 6 und 54 mg/L resultierten in denselben Butanolkonzentrationen. Die Kombination aus den verschiedenen Spurenelementen brachte

ähnlich gute Ergebnisse wie die alleinige Addition von Zinksulfat zum MS-MES Medium, lediglich der Wert nach 30 Stunden ist etwas höher. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung wurde diese Verbesserung jedoch vernachlässigt.

Daraus wurde geschlossen, dass Zinksulfat hauptsächlich für den positiven beschleunigenden Effekt verantwortlich war. Im Produktspektrum konnten bei den positiv auffallenden Spurenelementen keine weiteren Effekte außer einer Beschleunigung ausgemacht werden.

8.4 Validierung der Zinksulfatzugabe im Liter-Maßstab

8.4.1 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Der positive Effekt, der aus der Zugabe von $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ zum MS-MES Medium bei der Satzkultivierung von *Clostridium acetobutylicum* resultiert, sollte durch eine Bestätigung im Rührkessel im Liter-Maßstab validiert werden. Hierzu wurden dieselben Bedingungen wie bei dem Referenzprozess verwendet. Zusätzlich wurden 18 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ins MS-MES Medium gegeben. Da diese Untersuchung im Hinblick auf realistische Prozessbedingungen erfolgen sollte, wurde der Versuch ohne Begasung durchgeführt und anschließend auch mit der Referenzkultivierung ohne Begasung verglichen.

Abbildung 8.6 zeigt den Verlauf der Glucosekonzentrationen bei diesem Vergleich. In beiden Ansätzen waren knapp 60 g/L Glucose vorgelegt worden. Die Glucoseaufnahme lief bei der Kultivierung mit dem Additiv Zinksulfat etwas schneller ab. Die finale Konzentration nach 65 Stunden war jedoch vergleichbar bei 10 g/L. Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration bestätigt das. Die Zellen im Ansatz mit Zinksulfat wuchsen schneller an, erreichten dasselbe Maximum von 2,4 g/L und starben früher ab. Nach 130 Stunden lag in beiden Ansätzen die gleiche Biotrockenmassekonzentration von 0,6 g/L vor (Daten nicht gezeigt).

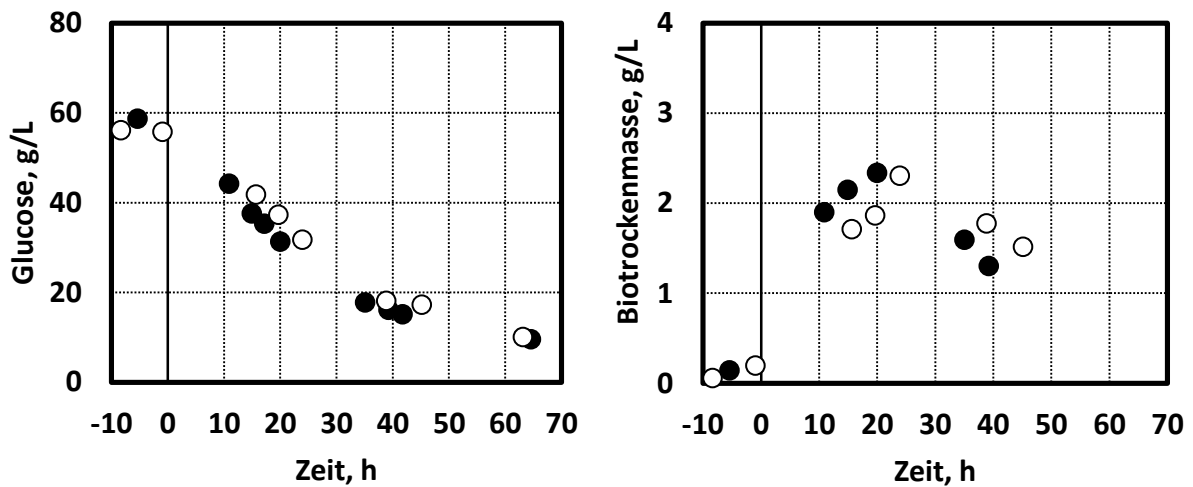


Abbildung 8.6: Verlauf der Glucosekonzentration (links) und der Biotrockenmassekonzentration (rechts) bei dem nicht begasten ABE Referenzprozess mit *Clostridium acetobutylicum* (weiße Kreise) im Vergleich zum Versuch mit 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat im Medium (schwarze Kreise). Alle anderen Parameter wurden gleich gehalten. Die Zeit ist normiert auf die Erhöhung der Rührerdrehzahl.

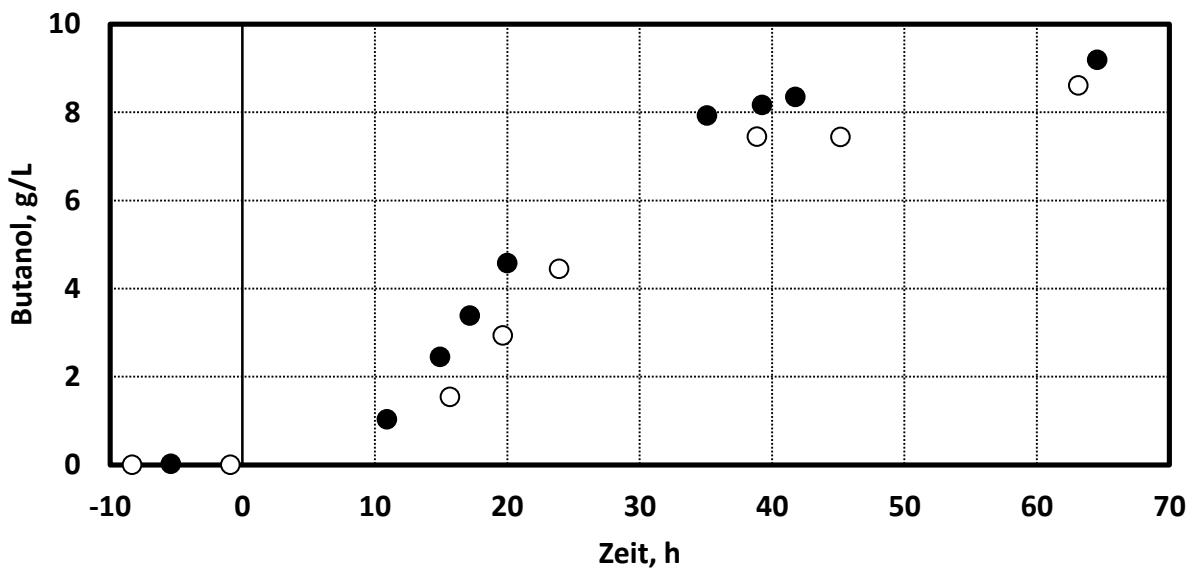


Abbildung 8.7: Verlauf der Butanolkonzentration bei dem nicht begasten ABE Referenzprozess mit *Clostridium acetobutylicum* (weiße Kreise) im Vergleich zum Versuch mit 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat im Medium (schwarze Kreise). Alle anderen Parameter wurden gleich gehalten. Die Zeit ist normiert auf die Erhöhung der Rührerdrehzahl.

Abbildung 8.7 zeigt den Vergleich der Verläufe der Butanolkonzentration bei diesen Kultivierungen. Es ist deutlich erkennbar, dass im Ansatz mit vorgelegtem Zinksulfat schneller Butanol produziert wurde und auf den Zeitpunkt $t = 65$ Stunden bezogen auch $0,5 \text{ g/L}$ mehr Produkt vorlag. Das schnellere Absterben der Zellen kann mit der früher ansteigenden Butanolkonzentration im Ansatz mit Zinksulfat begründet werden. Die jeweilige Produktivität zu den Zeitpunkten, an denen 9 g/L vorlagen, waren im Referenzprozess $0,13 \text{ g/(L h)}$ und im Ansatz mit Zinksulfat $0,15 \text{ g/(L h)}$ bei jeweils einer gleichen Selektivität von $0,46 \text{ mol/mol}$.

8.4.2 *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::bcd

Zusätzlich wurde der Effekt von Zinksulfat auf die Kultivierung des vielversprechenden Überexpressionstamms *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::bcd untersucht. Der Versuch verlief vergleichbar zu den begasten Prozessen im Liter-Maßstab (analog zu Kapitel 7.2.1) mit dem Unterschied, dass für die Vergleichskultivierung 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat zusätzlich ins MS-MES Medium gegeben wurde.

Abbildung 8.8 zeigt den Vergleich der Glucose- und der Butanolkonzentrationen der jeweiligen Ansätze.

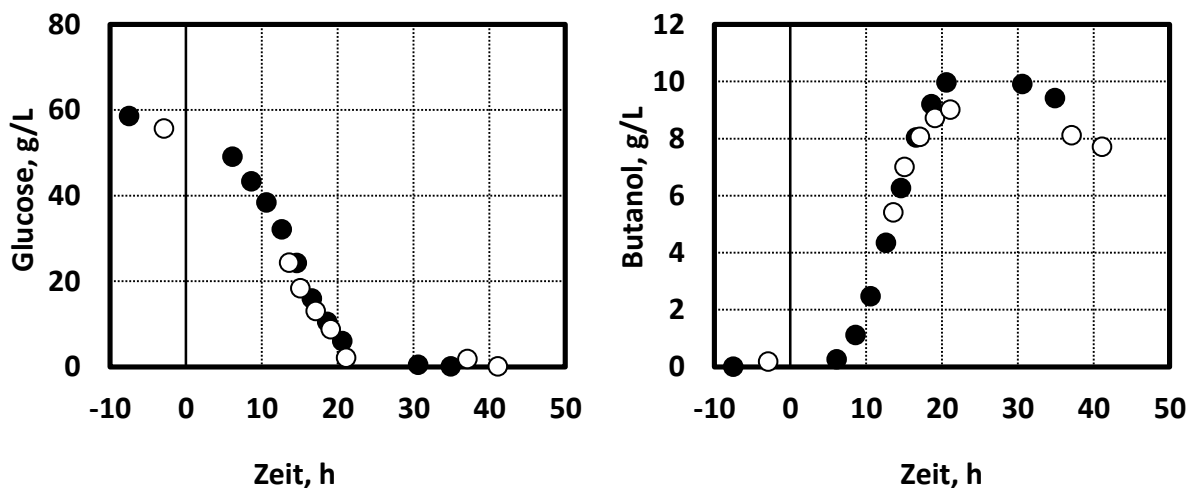


Abbildung 8.8: Darstellung des Effektes von Zinksulfat auf die Satzkultivierung des Überexpressionstamms *C. acetobutylicum* ÜE-pT::bcd. Aufgezeigt sind die Verläufe der Glucosekonzentration (links) und der Butanolkonzentration (rechts) von Satzkultivierungen in Rührkesselreaktoren bei Referenzbedingungen (weiße Kreise) im Vergleich zu Kultivierungen mit zusätzlichen 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat (schwarze Kreise) im MS-MES Medium im Liter-Maßstab.

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Bei dem Vergleich der Satzkultivierungen des Stamms *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* mit und ohne Zinksulfat fällt bei der Glucosekonzentration auf, dass beide Verläufe ähnlich sind (Abbildung 8.8, links). Der einzige Unterschied war, dass bei dem Ansatz mit Zinksulfat nach 30 Stunden noch 0,5 g/L Glucose im Medium waren, während bei dem Ansatz ohne Zinksulfat nach knapp 40 Stunden knapp 2 g/L Glucose im Medium vorlagen. Bei der Betrachtung der Butanolkonzentration (siehe Abbildung 8.8 rechts) war auffällig, dass bei dem Ansatz mit Zinksulfat zwar eine höhere Butanolkonzentration erreicht wurde, eine beschleunigte Produktion war jedoch nicht zu beobachten.

Diskussion:

Derselbe beschleunigende Effekt wie beim Wildtypstamm, beschrieben unter Kapitel 8.4.1, war nicht zu beobachten. Allerdings produzierte der Überexpressionsstamm *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* in der Anwesenheit von Zinksulfat auch eine leicht erhöhte Konzentration an Butanol von 10 g/L statt 9 g/L in dem beobachteten Zeitraum. Der positive Effekt von Zinksulfat hängt deshalb wahrscheinlich mit der verbesserten Glucoseaufnahme zusammen. Das konnte jedoch nicht sicher belegt werden.

8.4.3 *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt*

Der Effekt von Zinksulfat auf die Kultivierung des zweiten Überexpressionstamms *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* wurde ebenfalls untersucht. Der Versuch verlief vergleichbar zu den begasten Prozessen im Liter-Maßstab (analog zu Kapitel 7.2.2) mit dem Unterschied, dass für die Vergleichskultivierung 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat zusätzlich im MS-MES Medium vorgelegt wurde.

Abbildung 8.9 zeigt den Vergleich der Glucose- und der Butanolkonzentrationsverläufe der jeweiligen Ansätze.

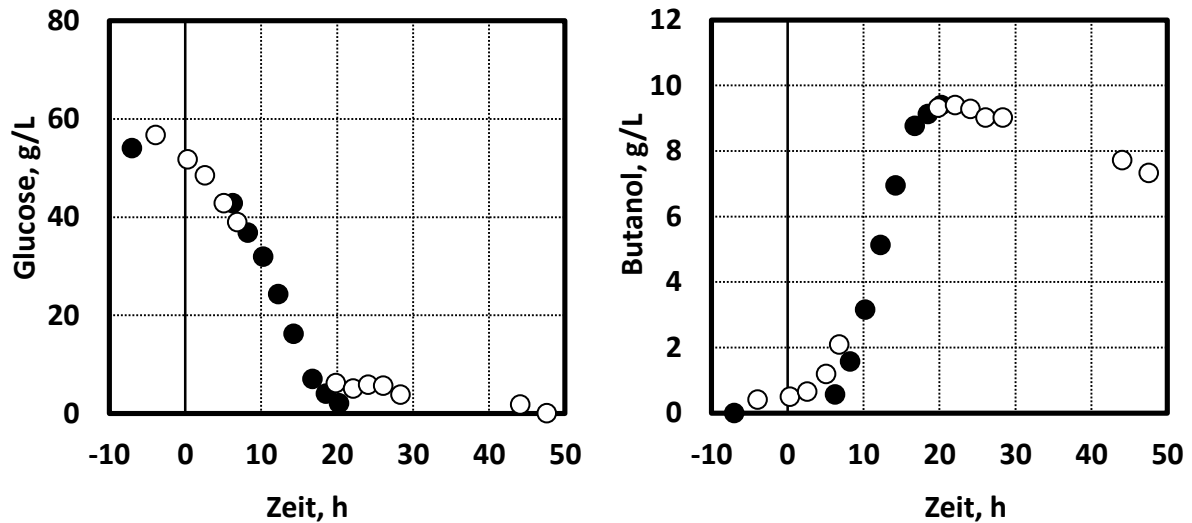


Abbildung 8.9: Darstellung des Effektes von Zinksulfat auf die Satzkultivierung des Überexpressionsstamms *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::crt im Rührkessel. Aufgezeigt sind die Verläufe der Glucosekonzentration (links) und der Butanolkonzentration (rechts) von Satzkultivierungen bei Referenzbedingungen (weiße Kreise) im Vergleich zu Satzkultivierungen mit zusätzlichen 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat (schwarze Kreise) im MS-MES Medium im Liter-Maßstab.

Auch bei diesem Überexpressionsstamm war keine schnellere Glucoseaufnahme oder Butanolproduktion zu erkennen. Beide Kultivierungen waren vergleichbar (siehe Abbildung 8.9). Auffällig war erneut, dass im Ansatz ohne Zinksulfat zwischen 20 und 27 Stunden noch 5 g/L Glucose im Medium nahezu stationär vorlagen, bevor diese auch noch verstoffwechselt wurden. Im Ansatz mit Zinksulfat wurde die Glucose auf Anhieb ohne eine Zwischenphase verstoffwechselt. Der Verlauf der Butanolkonzentrationen war ebenfalls ähnlich. Zwar produzierten die Zellen im Ansatz ohne Zinksulfat minimal schneller (siehe Abbildung 8.9), doch wurden die Maximalkonzentrationen nach 20 Stunden gleichzeitig erreicht. Bei diesem Stamm war weder eine Verbesserung, noch eine Verschlechterung der Butanolproduktion zu erkennen.

8.5 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurde keine signifikante Verbesserung der Butanolproduktion durch die Änderung der Ausgangskonzentrationen im Medium und der Prozessparameter wie Rührerdrehzahl oder Anfangs-pH gefunden. Das war keine Überraschung, da dieses Medium bereits seit 1982 bekannt ist und stetig verbessert wurde. Deshalb wurde der Effekt von Spurenelementen und weiteren Medienkomponenten im Satzverfahren untersucht (ebenfalls Anfangsreaktionsbedingungen). So wurden 23 verschiedene Spurenelemente und Zusatzstoffe aus diversen Anaerobiermedien zum Teil in verschiedenen Konzentrationen auf deren Effekte auf die Kultivierung des Wildtypstamms hin untersucht.

Es zeigte sich, dass lediglich Zinksulfat und Hefeextrakt, welches industriell jedoch nicht rentabel bei der ABE Fermentation einsetzbar ist, einen deutlichen positiven Effekt auf die Kultivierung des Wildtypstamms *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 aufwies (siehe Abbildung 8.8 und 8.9). Der Effekt von Zinksulfat wurde im Liter-Maßstab bestätigt (siehe Abbildung 8.7). Die Produktivität zu dem Zeitpunkt an dem 9 g/L Butanol vorlagen, konnte bei gleichbleibender Selektivität von ca. 0,13 auf 0,15 g/(L h) erhöht werden, allerdings war die erreichte Maximalkonzentration nahezu gleich, was vermutlich an der Inhibierung der Mikroorganismen durch Butanol liegt.

Der Effekt von Zinksulfat auf die Überexpressionsstämme wurde ebenfalls untersucht. Der Einfluss von Zinksulfat auf die Kultivierung des Stamms *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* zeigte sich nicht in einer Beschleunigung der Produktion, jedoch wurde eine leichte Erhöhung der Butanolkonzentration bei begasten Versuchen verzeichnet, was auf eine Verlängerung der Produktion hindeutet. Das konnte auch durch die aufgenommene Glucose bestätigt werden. Auf den Stamm *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* zeigte die Zugabe von Zinksulfat keinen Effekt.

Es zeigte sich, dass für jeden Stamm eigens eine Prozessanalyse durchgeführt werden sollte, da sich die positiven Effekte von zusätzlichen Spurenelementen nicht pauschal von einem Stamm auf einen anderen Stamm übertragen ließen.

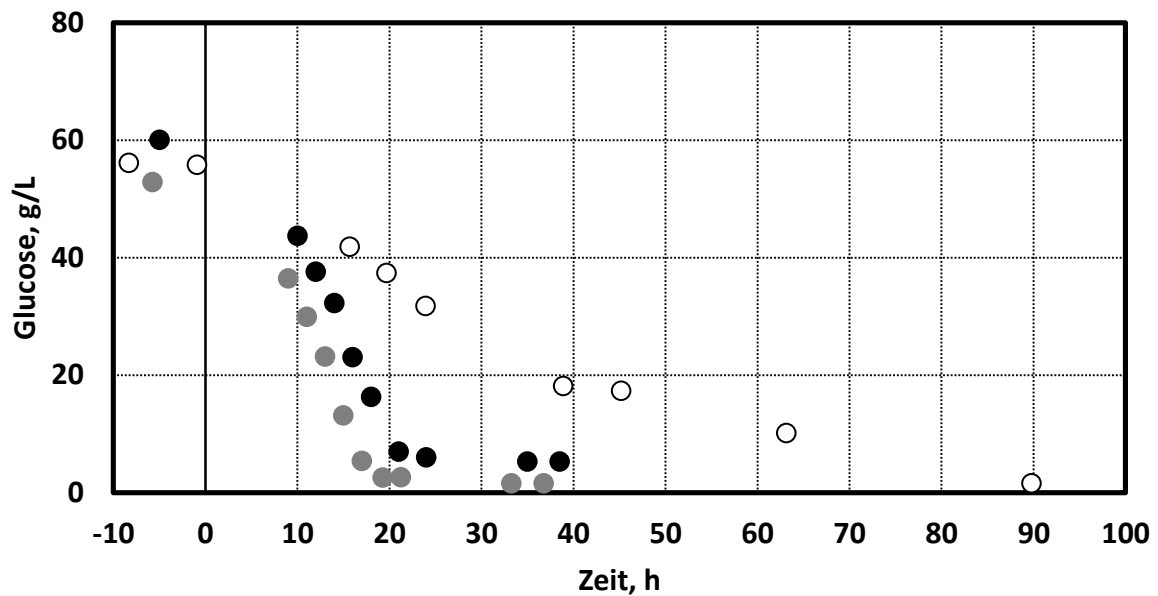
8.6 Vergleichende Butanolproduktion im Liter-Maßstab

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen zu den rekombinanten Stämmen (Kapitel 7) und der reaktionstechnischen Prozessanalysen (Kapitel 8) wurden die beiden Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtypstamm mit Zusatz von Zinksulfat im Medium ohne Begasung vergleichend untersucht.

Abbildung 8.10 zeigt den Vergleich der Butanolkonzentrationen des Referenzstamms mit den Überexpressionsstämmen *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* mit Zugabe von 18 mg/L ZnSO₄·7H₂O.

Es ist zu erkennen, dass beide Überexpressionsstämme deutlich schneller Glucose aufnahmen (siehe Abbildung 8.10 A). Für *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* wurde eine Glucoseaufnahme rate von 2,65 g/(L h) und für *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* wurde eine Glucoseaufnahme rate von 2,5 g/(L h) nach 20 Stunden bestimmt. Bei dem Wildtypstamm *Clostridium acetobutylicum* wurde die Rate zu 0,95 g/(L h) bestimmt. Auch die Butanolproduktion setzte bei den beiden Überexpressionsstämmen deutlich früher ein. Die maximalen Butanolkonzentrationen wurden bereits nach circa 30 Stunden erreicht (siehe Abbildung 8.10 B).

A



B

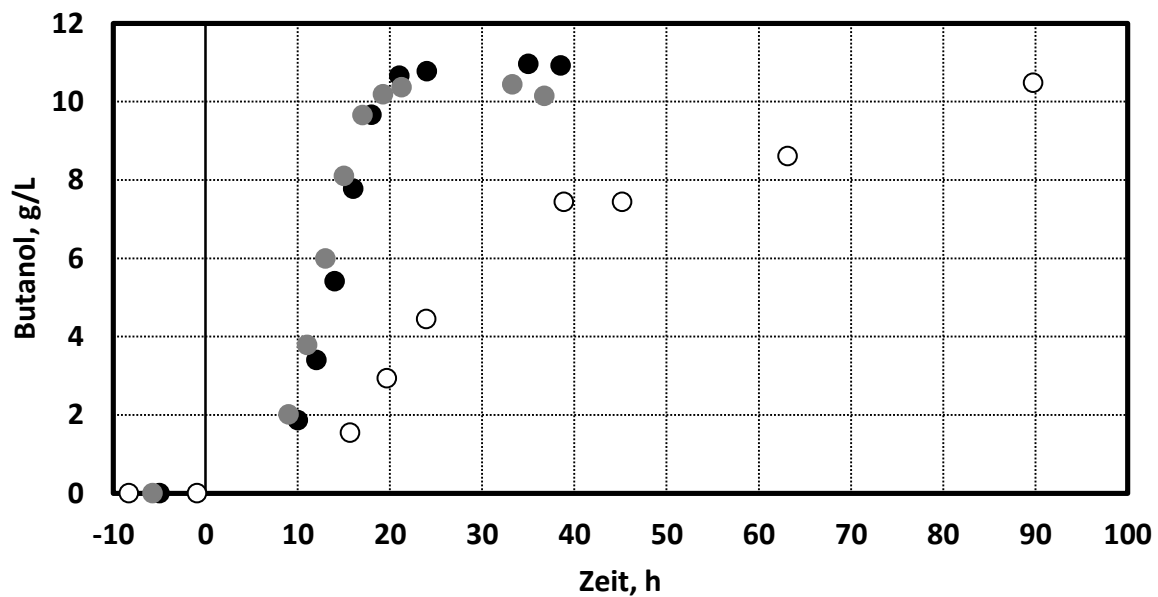


Abbildung 8.10: Vergleich der Verläufe der Glucose- (A) und Butanolkonzentrationen (B) bei nicht begasten Satzkultivierungen von *Clostridium acetobutylicum* (Referenzprozess; weiße Kreise), *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::crt (schwarze Kreise) und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::bcd (graue Kreise) im Rührkesselreaktor Liter-Maßstab. Die Zeitachse wurde auf den Zeitpunkt der Rührerdrehzahlerhöhung normiert.

8. Reaktionstechnische Charakterisierung der Anfangsreaktionsbedingungen

Es konnte keine signifikante Erhöhung der maximalen Konzentration an Butanol mit dem Überexpressionsstamm erreicht werden, allerdings wurde die volumetrische Produktivität deutlich erhöht (siehe Tabelle 8.3).

Tabelle 8.3: Vergleich von volumetrischer Produktivität, Selektivität und maximaler Butanolkonzentration bei Satzprozessen mit unterschiedlichen *C. acetobutylicum* Stämmen (ohne Begasung). Volumetrische Produktivität und Selektivität wurden bis zu dem Zeitpunkt bestimmt, an dem 9 g/L Butanol im Satzverfahren im Medium gemessen wurden.

Stamm	Produktivität _g , g/(L h)	Selektivität, mol _{BuOH} /mol _{Glu}	C _{max,Butanol} , g/L (Zeit,h)
<i>C. acetobutylicum</i> (wt)	0,13	0,46	10,5 (90)
<i>C. acetobutylicum</i> ÜE-pT:: <i>bcd</i> +ZnSO ₄	0,56	0,50	10,4 (21)
<i>C. acetobutylicum</i> ÜE-pT:: <i>crt</i> +ZnSO ₄	0,53	0,54	11 (35)

Verglichen werden die volumetrischen Produktivitäten, Selektivitäten und Maximalkonzentrationen der besten Stämme mit dem Referenzstamm bis zu dem Zeitpunkt an dem 9 g/L Butanol im Satzverfahren im Medium gemessen wurden (ohne Begasung). Die volumetrische Produktivität konnte mit Hilfe der Stämme *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* nahezu verfünffacht werden. Die Selektivität wurde leicht verbessert von 0,46 auf 0,50. Die Ursachen für die verbesserten Produktivitäten sind hauptsächlich in den rekombinanten Stämmen mit Überexpressionen zu suchen, die sich bei der Charakterisierung auch schon gezeigt hatten (Kapitel 7.2). Die Verbesserung der Selektivitäten resultiert aus der besseren Wiederaufnahme der Säuren. Zum Ende der Versuche mit den Überexpressionsstämmen *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* lagen Acetat und Butyrat jeweils unter 1,0 g/L vor. Eine weitere Erhöhung der Glucosekonzentration zu Beginn der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* auf 80 g/L resultierte ebenfalls bei einer maximalen Butanolkonzentration von knapp 11 g/L und eine erhöhte Produktivität konnte nicht bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

9. Zusammenfassung und Ausblick

Butanol stellt einen vielversprechenden Biokraftstoff dar. Die positiven Stoffeigenschaften, die Butanol im Vergleich zum derzeit wichtigsten Biokraftstoff Ethanol mit sich bringt, wären ein deutlicher Fortschritt auf dem Gebiet der Biokraftstoffe. Die Nachteile der mikrobiologischen Herstellung von Butanol sind ungenügende Ausbeuten, niedrige volumetrische Produktivitäten, geringe erzielbare Butanolkonzentrationen und die Bildung vieler Nebenprodukte. Erst seit kurzem sind die molekularbiologischen Werkzeuge zur gezielten Veränderung des Stoffwechsels (*metabolic engineering*) von Clostridien verfügbar, so dass aktuell versucht wird, einige dieser Nachteile durch die Stoffwechsel optimierte Produktionsstämme zu überwinden.

Zur vergleichenden Charakterisierung der Stoffwechseleigenschaften von rekombinanten Clostridien wurden bisher überwiegend anaerobe Septumflaschen im Parallelansatz eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen in anaeroben Septumflaschen zeigen allerdings nur wenig Relevanz für technische Prozesse. Daher müssen letztendlich Labor-Rührkesselreaktoren zur technisch relevanten Prozesscharakterisierung eingesetzt werden. Ein zentrales Problem stellt hierbei die häufig zu beobachtende fehlende Reproduzierbarkeit der Satzverfahren dar. Als wesentliche Ursache für diese fehlende Reproduzierbarkeit wurden unterschiedliche Verzögerungszeiten identifiziert. Daher wurde zunächst, sobald die Zellen nicht mehr in der Verzögerungsphase waren, der Leistungseintrag im Rührkesselreaktor definiert erhöht. Das Ende der Verzögerungsphase wurde über den pH Verlauf der säurebildenden Zellen definiert. Sobald der pH, ausgehend von pH 5,5 nach der Inokulation auf pH 5,4 gefallen war, wurde der volumetrische Leistungseintrag von 0,05 W/L auf 0,2 W/L erhöht. Der Zeitpunkt der Erhöhung des Leistungseintrags wurde als Beginn ($t = 0$ h) der sequentiell durchgeführten Fermentationen festgelegt. Damit konnte eine exakte sequentielle Reproduzierbarkeit der Satzverfahren im Rührkesselreaktor erzielt werden. Der so etablierte 'Referenzprozess' zeigte mit *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 eine maximale Butanolkonzentration von 7 g/L nach 31 Stunden. Aufgrund der Lösemittelverdunstung durch die zur Aufrechterhaltung anaerober Verhältnisse eingeführte kontinuierliche Stickstoffbegasung sank die Butanolkonzentration im weiteren Verlauf der

Fermentation wieder ab. Unter Berücksichtigung der Verdunstungsraten konnte die integrale Kohlenstoffbilanz am Ende des Prozesses zu 92 % geschlossen werden.

Eine direkte vergleichende Charakterisierung unterschiedlicher Stämme bei variierenden Reaktionsbedingungen erfordert jedoch den Einsatz vieler parallel betreibbarer Rührkesselreaktoren. Bei dem am TUM - Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelten Bioreaktorblock mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im 12 Milliliter-Maßstab werden Einwegreaktionsgefäße aus gasdurchlässigem Kunststoff eingesetzt und der Kopfraum der parallelen Rührkesselreaktoren steht in direktem Kontakt mit der Außenluft. Um die parallelen Rührkesselreaktoren auch zur reaktionstechnischen Charakterisierung von strikt anaeroben Mikroorganismen in aerober Laborumgebung nutzen zu können, wurden die Kopfräume aller Parallelreaktoren mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom überlagert. Es zeigte sich, dass ein Stickstoffstrom von 2,1 mL/min pro Reaktor ausreichend war, um ausreichend anaerobe Reaktionsbedingungen für *Clostridium acetobutylicum* im Bioreaktorblock aufrecht erhalten zu können.

Die Maßstabsverkleinerung des zuvor im Litermaßstab zur Herstellung von Butanol mit *Clostridium acetobutylicum* etablierten Satzverfahrens ('Referenzprozess') gelang, indem die Stickstoffbegasungsrate im Millilitermaßstab so eingestellt wurde, dass die volumenbezogenen Lösemittelverdunstungsraten in beiden Maßstäben identisch waren. Die Verdunstungsraten im Liter-Maßstab wurden zu 0,14 g/(L h) für Aceton, 0,06 g/(L h) für Butanol und 0,01 g/(L h) für Ethanol bestimmt und konnten mit einer Begasungsrate von 2,1 mL/min in jedem Rührkesselreaktor im Milliliter-Maßstab erreicht werden. Aufgrund der hohen Scherkraftempfindlichkeit von *Clostridium acetobutylicum* stellte sich der volumetrische Leistungseintrag als ein weiteres Skalierungskriterium heraus. Während beim Referenzprozess im 1 Liter-Rührkesselreaktor bei einer Drehzahl von 200 rpm ein Leistungseintrag von 0,2 W/L erreicht wurde, musste die Rührerdrehzahl im Milliliter-Maßstab auf 400 rpm erhöht werden, um denselben Leistungseintrag zu erzielen. Unter diesen Skalierungsbedingungen (Stickstoffbegasung zur Anaerobisierung, konstanten Verdunstungsraten und konstantem Leistungseintrag gelang die Maßstabsverkleinerung der ABE-Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* (siehe Abbildung 9.1) (Schmidt & Weuster-Botz, 2012). Anaerobe Parallelexperimente konnten damit problemlos außerhalb der Anaerobarbeitsbank durchgeführt werden, was vor allem die Probenahme vereinfachte.

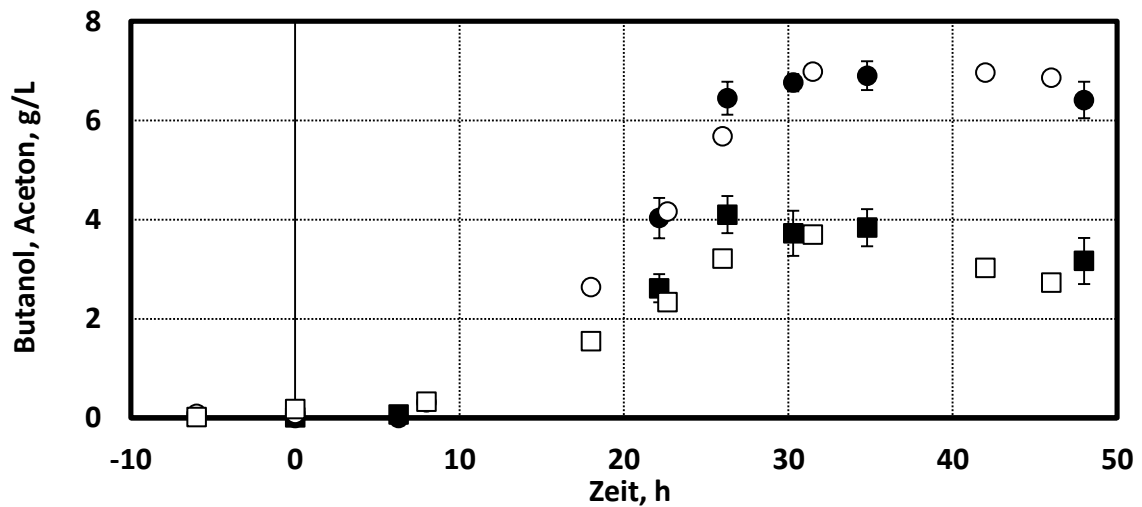


Abbildung 9.1: Butanol- (Kreise) und Acetonkonzentration (Quadrate) während eines Satzprozesses in Rührkesselreaktoren mit *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 im Milliliter-Maßstab (schwarze Füllung) im Vergleich zum Referenzprozess im Liter-Maßstab (weiße Füllung). Die Zeitachse wurde auf die Erhöhung der Rührerdrehzahl im Liter-Maßstab normiert um die Verzögerungszeit auszublenden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachansätzen.

Um Einblicke in den Stoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum* unter technisch relevanten Bedingungen zu erhalten wurden neun rekombinante Stämme, die von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden, reaktionstechnisch in den Rührkesselreaktoren im Liter- und im Milliliter-Maßstab untersucht. Unter den neun rekombinanten Stämmen befanden sich sieben Deletionsstämme, bei denen gezielt Gene ausgeschaltet waren, die im Stoffwechsel zur Bildung von Nebenprodukten, wie Acetat und Aceton, führen. Im Vergleich zum Wildtyp unter Referenzprozessbedingungen zeigte keiner dieser Stämme eine signifikant erhöhte Butanolproduktivität. Alle Deletionsstämme, ausgenommen des *pta*-Deletionsstamms, bei dem ein Gen ausgeschaltet wurde, welches einen Zwischenschritt im Metabolismus zur Produktion von Acetat darstellt, produzierten im Gegensatz zum Wildtyp deutlich weniger Butanol. Mit jeder Deletionsmutante konnte allerdings die Bildung des entsprechenden Nebenprodukts signifikant verringert werden.

Bei der reaktionstechnischen Charakterisierung des Deletionsstamms *Clostridium acetobutylicum* *adc::int* konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass bei der Wiederaufnahme von Butyrat während der solventogenen Phase ein alternativer Stoffwechselweg genutzt wird, da Butyrat ohne die Bildung von Aceton wieder aufgenommen

wurde. Dies entspricht nicht den bislang in der Literatur beschriebenen Stoffwechselschemen von *Clostridium acetobutylicum*.

Bei den beiden Überexpressionsstämmen (*Clostridium acetobutylicum* ÜE-pt::*bcd* und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pt::*crt*) wurde jeweils ein Gen des Hauptstoffwechsels verstärkt exprimiert. Daraus resultierte eine fast fünffach erhöhte Produktivität von Butanol bei leicht erhöhter molarer Selektivität (siehe auch Tabelle 9.1). Beide Überexpressionen führten zu einer generellen Beschleunigung des Stoffwechsels.

Um die Anfangsreaktionsbedingungen, vor allem die Zusammensetzung des Reaktionsmediums, zu untersuchen wurden mit dem Bioreaktorblock Prozessanalysen mit dem Wildtypstamm *Clostridium acetobutylicum* durchgeführt. Da durch Variation der Konzentrationen der ursprünglichen Medienkomponenten keine Verbesserung der Butanolproduktion beobachtet werden konnte, wurden zusätzlich 23 Spurenelemente und Zusätze, die in anderen Medien für die Kultivierung anaerober Mikroorganismen verwendet werden, auf positive Einflüsse auf die Butanolproduktion untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von 18 mg/L Zinksulfat-Heptahydrat zu einer 15 %-igen Erhöhung der Butanolproduktivität von 0,13 g/(L h) auf 0,15 g/(L h) bei gleichbleibender Selektivität und gleicher maximaler Butanolkonzentration führte. In Kombination mit den optimalen Bedingungen für den Wildtypstamm mit 18 mg/L Zinksulfat Heptahydrat im Medium wurde abschließend eine Satzkultivierung ohne Begasung mit den beiden Überexpressionsstämmen durchgeführt. In Tabelle 9.1 ist der Vergleich der volumetrischen Produktivitäten, Selektivitäten und Maximalkonzentrationen der Stämme für den Satzprozess im Rührkesselreaktor im Liter-Maßstab jeweils ohne Begasung gezeigt. Die volumetrische Produktivität konnte mit den Stämmen *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*crt* und *Clostridium acetobutylicum* ÜE-pT::*bcd* nahezu verfünffacht werden (siehe Tabelle 9.1). Die Selektivität wurde von 0,46 auf 0,50 bzw. 0,54 mol/mol leicht verbessert, was vorrangig in der besseren Wiederaufnahme der Säuren begründet ist, die dem Hauptstoffwechsel zugeführt wurden und zu Butanol weiter verarbeitet werden konnten. Eine signifikante Erhöhung der maximalen Butanolkonzentration konnte hingegen nicht erzielt werden.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Tabelle 9.1: Vergleich von volumetrischer Produktivität, Selektivität und maximaler Butanolkonzentration bei Satzprozessen in Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab mit unterschiedlichen *C. acetobutylicum* Stämmen (ohne Begasung). Volumetrische Produktivität und Selektivität wurden zu dem Zeitpunkt bestimmt, an dem 9 g/L Butanol in der Reaktionslösung vorlag.

Stamm	Produktivität, g/(L h)	Selektivität, mol _{BuOH} /mol _{Glu}	C _{max,Butanol} , g/L (Zeit,h)
<i>C. acetobutylicum</i> (wt)	0,13	0,46	10,5 (90)
<i>C. acetobutylicum</i> ÜE-pT:: <i>bcd</i> +ZnSO ₄	0,56	0,50	10,4 (21)
<i>C. acetobutylicum</i> ÜE-pT:: <i>crt</i> +ZnSO ₄	0,53	0,54	11 (35)

Ausblick

Die mikrobielle Produktion von Butanol wird mit steigenden Kosten für fossile Energien/Brennstoffen und neuen Verbesserungsansätzen für Produktionsstämme (Stichwort „*metabolic engineering*“) zunehmend attraktiver. Solche Stämme sollten zum einen eine schnellere Produktion oder höher Selektivität aufweisen, denkbar wären hier zum Beispiel die Deletion der Phosphotransacetylase (*pta*) und die Überexpressionen, der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (*bcd*) oder einer Alkoholdehydrogenase (*bdhAB*). Zum anderen sollte das Substratspektrum der Produktionsstämme auf diverse Bioabfälle oder Lignocellulose ausgeweitet werden. Des Weiteren sollte die Butanoltoleranz der Stämme verbessert werden, um höhere Butanolkonzentrationen zu erreichen.

Bei der Prozessführung sollten verschiedene Möglichkeiten für eine *in-situ* Abtrennung im Zusammenhang mit neuen Produktionsstämmen untersucht werden. Gelänge es, einen Produktionsstamm, durch geeignete Zulaufstrategien andauernd in der Phase der höchsten Produktivität zu halten indem gebildetes Butanol *in-situ* abgetrennt würde, könnte die Leistung des Prozesses enorm verbessert werden.

10. Literaturverzeichnis

- Alsaker, K. V., Paredes, C. & Papoutsakis, E. T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(6), 1131–47.
- Alsaker, K. V., Spitzer, T. R. & Papoutsakis, E. T. (2004). Transcriptional analysis of spo0A overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress. *Journal of bacteriology*, 186(7), 1959–71.
- Amador-Noguez, D., Brasg, I. A., Feng, X.-J., Roquet, N. & Rabinowitz, J. D. (2011). Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 7984–97.
- Andrade, J. C., & Vasconcelos, I. (2003). Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilisation. *Biotechnology Letters*, 25(2), 121–5.
- Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J. Y. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabolic Engineering*, 10(6), 305–11.
- Baer, S. H., Blaschek, H. P., & Smith, T. L. (1987). Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2854–61.
- Bahl, H., Gottwald, M., Kuhn, A., Rale, V., Andersch, W., & Gottschalk, G. (1986). Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 52(1), 169–72.
- Bahl, H., Andersch, W., & Gottschalk, G. (1982) Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 15(4), 201–205.
- Berezina, O. V., Zakharova, N. V., Brandt, A., Yarotsky, S. V., Schwarz, W. H., & Zverlov, V. V. (2010). Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 635–46.
- Betts, J. I., & Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial cell factories*, 5, 21.

10. Literaturverzeichnis

- Bond-Watts, B. B., Bellerose, R. J., & Chang, M. C. Y. (2011). Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nature chemical biology*, 7(4), 222–7.
- Bowles, L. K., & Ellefson, W. L. (1985). Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(5), 1165–70.
- Boynton, Z. L., Bennett, G. N., & Rudolph, F. B. (1996). Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and environmental microbiology*, 62(8), 2758–66.
- Bukold, Steffen (2008): Öl im 21. Jahrhundert Band 2: Alternative Strategien. Oldenbourg Wissenschaftsverlag
- Buday, Z., Linden, J., & Karim, M. (1990). Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(1), 24–27.
- Buschhorn, H., Dürre, P., & Gottschalk, G. (1989). Production and Utilization of Ethanol by the Homoacetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1835–40.
- Chmiel H. (2006). Bioprozesstechnik. Elsevier GmbH, München.
- Coleman, J. E. (1998). Zinc enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 2(2), 222–34.
- Dabrock, B., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1233–9.
- Delvigne, F., Boxus, M., Ingels, S., & Thonart, P. (2009). Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a *prpoS::GFP* reporter gene in *E. coli*. *Microbial cell factories*, 8, 15.
- Demain, A. L. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(3), 319–32. doi:10.1007/s10295-008-0521-8
- Demler, M., & Weuster-Botz, D. (2011). Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2), 470–4.
- Dennewald, D., Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2012). Evaluation of parallel milliliter-scale stirred-tank bioreactors for the study of biphasic whole-cell biocatalysis with ionic liquids. *Journal of biotechnology*, 157(1), 253–7.

- Desai, R. P., & Papoutsakis, E. T. (1999). Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 936–45.
- Donaldson G. K., Huang L. L., Maggio-Hall L. A., Nagarajan V., Nakamura C. E., Suh W. 2007. Fermentative production of four carbon alcohols. International Patent WO2007/041269
- Dürre, P. (2005). *Handbook on Clostridia. Methods*; Verlag: Crc Pr Inc;
- Dürre, P. (2007). Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal*, 2(12), 1525–34.
- Dürre, P. (2008). Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 353–62.
- Dürre, P, Kuhn, A., Gottwald, M., & Gottschalk, G. (1987). Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 268–272.
- Eckert, G., & Schügerl, K. (1987). Continuous acetone-butanol production with direct product removal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(3)
- Evans, P. J., & Wang, H. Y. (1988). Enhancement of Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum* in the Presence of Decanol-Oleyl Alcohol Mixed Extractants. *Applied and environmental microbiology*, 54(7), 1662–7.
- Ezeji, T C, Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2004). Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6), 653–8.
- Ezeji, T C, Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2005). Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of biotechnology*, 115(2), 179–87.
- Ezeji, T., Milne, C., Price, N. D., & Blaschek, H. P. (2010). Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1697–712.
- Ezeji, Thaddeus C, Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2004). Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *Chemical record (New York, N.Y.)*, 4(5), 305–14.

10. Literaturverzeichnis

- Ezeji, T.C., Qureshi, N. & Blaschek, H. P. (2003). Production of acetone, butanol, and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19:595-603
- Falbe J. 1970. Carbon monoxide in organic synthesis. Berlin-Heidelberg- New York: Springer Verlag
- Fernandes, P., & Cabral, J. M. S. (2006). Microlitre/millilitre shaken bioreactors in fermentative and biotransformation processes – a review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(4), 237–252.
- Fischer, U. (2002): Vitamin-Lexikon, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 3
- Formanek, J., Mackie, R., & Blaschek, H. P. (1997). Enhanced Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* BA101 Grown in Semidefined P2 Medium Containing 6 Percent Maltodextrin or Glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2306–10.
- Fortman, J. L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T. S., Steen, E., & Keasling, J. D. (2008). Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends in biotechnology*, 26(7), 375–81.
- Gabriel, C. L. (1928). Butanol Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry*, 20(10), 1063–1067.
- Gabriel, C. L., & Crawford, F. M. (1930). Development of the Butyl-Acetic Fermentation Industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, 22(11), 1163–1165. doi:10.1021/ie50251a014
- Gebhardt, G., Hortsch, R., Kaufmann, K., Arnold, M., & Weuster-Botz, D. (2011). A new microfluidic concept for parallel operated milliliter-scale stirred tank bioreactors. *Biotechnology progress*, 27(3), 684–90. doi:10.1002/btpr.570
- Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology advances*, 27(6), 764–81.
- Green, E. M., & Bennett, G. N. (1996). Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied biochemistry and biotechnology*, 57-58, 213–21.
- Green, E. M., Boynton, Z. L., Harris, L. M., Rudolph, F. B., Papoutsakis, E. T., & Bennett, G. N. (1996). Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 8, 2079–86.

- Grimmler, C., Janssen, H., Krausse, D., Fischer, R.-J., Bahl, H., Dürre, P., Liebl, W., et al. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 20(1), 1–15.
- Groot, W. J., Qever, C. E., & Kossen, N. W. F. (1984). Pervaporation for simultaneous product recovery in the butanol/isopropanol batch fermentation. *Biotechnology Letters*, 6(11), 709–714.
- Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., Yang, S., et al. (2009). Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(9), 1225–32.
- Harris, L M, Blank, L., Desai, R. P., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2001). Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated solR gene. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 27(5), 322–8.
- Harris, L M, Desai, R. P., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2000). Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnology and bioengineering*, 67(1), 1–11.
- Harris, L. M., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2002). Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of spo0A Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3586–3597.
- Hastings, J. J. (1971). Development of the fermentation industries in Great Britain. *Advances in applied microbiology*, 14, 1–45.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P. (2007). The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 452–64.
- Hoefel, T., Faust, G., Reinecke, L., Rudinger, N., & Weuster-Botz, D. (2012). Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnology journal*.
- Holt, R. A, Stephens, G. M., & Morris, J. G. (1984). Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(6), 1166–70

10. Literaturverzeichnis

- Hortsch, R. 2011. Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen Dissertation. TU München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
- Hortsch, R., Stratmann, A., & Weuster-Botz, D. (2010). New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3), 443–51.
- Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2010a). Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 73, 61–82.
- Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2010b). Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnology Progress*, 26(2), 595–9.
- Hortsch, R., & Weuster-Botz, D. (2011). Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(1), 69–76.
- Hungate, R. E.; Macy, J. (1973). The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bull. Ecol. Res. Comm.*, 17(17), 123 – 126.
- Hönicke, D., Janssen, H., Grimmmler, C., Ehrenreich, A., & Lütke-Eversloh, T. (2012). Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol:acetone ratios. *New biotechnology*, 29(4), 485–93.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., et al. (2008). Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(6), 1305–16.
- Ismail, A. A., Zhu, C. X., Colby, G. D., & Chen, J. S. (1993). Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *Journal of bacteriology*, 175(16), 5097–105.
- Jarboe, L. R., Grabar, T. B., Yomano, L. P., Shanmugan, K. T., & Ingram, L. O. (2007). Development of ethanologenic bacteria. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 108, 237–61.
- Jiang, Y., Xu, C., Dong, F., Yang, Y., Jiang, W., & Yang, S. (2009). Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic engineering*, 11(4-5), 284–91. doi:10.1016/j.ymben.2009.06.002

- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*, 50(4), 484–524.
- Jones, D. T., van der Westhuizen, A., Long, S., Allcock, E. R., Reid, S. J., & Woods, D. R. (1982). Solvent Production and Morphological Changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1434–9.
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome biology*, 9(7), R114.
- Junker, B., Walker, A., Hesse, M., Lester, M., Vesey, D., Christensen, J., Burgess, B., et al. (2009). Pilot-scale process development and scale up for antifungal production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(4), 443–58.
- Kanouni, A., Zerdani, I., Zaafa, S., Znassni, M., & M. (1998). The improvement of glucose/xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using calcium carbonate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 431–435.
- Keis, S., Bennett, C. F., Ward, V. K., & Jones, D. T. (1995). Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *International journal of systematic bacteriology*, 45(4), 693–705.
- Keis, S., Shaheen, R., & Jones, D. T. (2001). Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 6), 2095–103.
- Kensy, F., Engelbrecht, C., & Büchs, J. (2009a). Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microbial cell factories*, 8, 68.
- Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R.-K., & Büchs, J. (2009b). Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial cell factories*, 8, 31.
- Killeffer, D. H. (1927). Butanol and Acetone from Corn: A Description of the Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry*, 19(1), 46–50.
- Kim, B. H., Bellows, P., Datta, R., & Zeikus, J. G. (1984). Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Applied and environmental microbiology*, 48(4), 764–70.

10. Literaturverzeichnis

- Kirschner M. 2006. n-Butanol. Chemical Market Reporter January 30–February 5, ABI/INFORM Global, p42.
- Knorr, B. (2005). *Scale-down and parallel operation of a riboflavin production process with Bacillus subtilis*. Dissertation TU München am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Knorr, B., Schlieker, H., Hohmann, H.-P., & Weuster-Botz, D. (2007). Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), 263–274.
- Knoshaug, E. P., & Zhang, M. (2009). Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153(1-3), 13–20.
- Kraume M. (2003). Mischen und Rühren. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kusterer A. (2007). Reaktionstechnische Optimierung von Parallelbioreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M., & Weuster-Botz, D. (2008). Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(3), 207–15.
- Lee, J., Yun, H., Feist, A. M., Palsson, B. Ø., & Lee, S. Y. (2008). Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 849–62.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209–28.
- Lehmann, D., Hönicke, D., Ehrenreich, A., Schmidt, M., Weuster-Botz, D., Bahl, H., & Lütke-Eversloh, T. (2012). Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(3), 743–54.
- Lehmann, D., & Lütke-Eversloh, T. (2011). Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic engineering*, 13(5), 464–73.
- Lenz, T. G., & Morelra, A. R. (1980). Economic Evaluation of the Acetone-Butanol Fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 19(4), 478–483.

- Li, S.-Y., Srivastava, R., Suib, S. L., Li, Y., & Parnas, R. S. (2011). Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control. *Bioresource technology*, 102(5), 4241–50.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6), 627–42.
- López-Contreras, A. M., Claassen, P. A., Mooibroek, H., & De Vos, W. M. (2000). Utilisation of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(2), 162–7.
- López-Contreras A. M., Gabor K., Martens A. A., Renckens B. A., Claassen P. A., Van Der Oost J., De Vos W. M. (2004). Substrate-induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 70:5238–5243.
- Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in biotechnology*, 22(5), 634–47.
- Macy, J. M., Snellen, J. E., & Hungate, R. E. (1972). Use of syringe methods for anaerobiosis. *The American journal of clinical nutrition*, 25(12), 1318–23.
- Maddox, I. S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutierrez, N. a, Gapes, J. R., & Schuster, K. C. (2000). The cause of “acid-crash” and “acidogenic fermentations” during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(1), 95–100.
- Mann, M. S., Dragovic, Z., Schirrmacher, G., & Lütke-Eversloh, T. (2012). Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnology letters*.
- Mao, S., Jia, K., Zhang, Y., & Li, Y. (2012). Use of proteomic tools in microbial engineering for biofuel production. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 834, 137–51.
- Mao, S., Luo, Y., Bao, G., Zhang, Y., Li, Y., & Ma, Y. (2011). Comparative analysis on the membrane proteome of *Clostridium acetobutylicum* wild type strain and its butanol-tolerant mutant. *Molecular bioSystems*, 7(5), 1660–77.
- Matsumura, M., Kataoka, H., Sueki, M., & Araki, K. (1988). Energy saving effect of pervaporation using oleyl alcohol liquid membrane in butanol purification. *Bioprocess Engineering*, 3(2), 93–100.

- Mermelstein, L. D., Papoutsakis, E. T., Petersen, D. J., & Bennett, G. N. (1993). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnology and bioengineering*, 42(9), 1053–60.
- Mes-Hartree, M., & Saddler, J. N. (1982). Butanol production of *Clostridium acetobutylicum* grown on sugars found in hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology Letters*, 4(4), 247–252.
- Micheletti, M., & Lye, G. J. (2006). Microscale bioprocess optimisation. *Current opinion in biotechnology*, 17(6), 611–8. doi:10.1016/j.copbio.2006.10.006
- Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H., & Gay, R. (1982). Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), 1318–24.
- Nair, R. V., Bennett, G. N., & Papoutsakis, E. T. (1994). Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of bacteriology*, 176(3), 871–85.
- Nair, R. V., Green, E. M., Watson, D. E., Bennett, G. N., & Papoutsakis, E. T. (1999). Regulation of the sol locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *Journal of bacteriology*, 181(1), 319–30.
- Nair, R. V., & Papoutsakis, E. T. (1994). Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *Journal of bacteriology*, 176(18), 5843–6.
- Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic engineering*, 12(4), 307–31.
- Nielsen, D. R., Leonard, E., Yoon, S.-H., Tseng, H.-C., Yuan, C., & Prather, K. L. J. (2009). Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic engineering*, 11(4-5), 262–73.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730–50.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., et al. (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology*, 183(16), 4823–38.

- Overmann, R. G. (2006). *The Prokaryotes*. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.) *Preservation* (pp. 80–136). Springer New York.
- O'Brien, R. W., Morris, J. G. (1971). Oxygen and the Growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 68(3), 307–318.
- Palmer Rogers. (1986). Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*, 31, 1–60.
- Palmqvist, B., Wiman, M., & Lidén, G. (2011). Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption. *Biotechnology for biofuels*, 4, 10.
- Peguín, S., & Soucaille, P. (1995). Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 403–5.
- Pierrot, P., Fick, M., & Engasser, J. M. (1986). Continuous acetone-butanol fermentation with high productivity by cell ultrafiltration and recycling. *Biotechnology Letters*, 8(4), 253–256.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., & Weuster-Botz, D. (2005a). Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and Bioengineering*, 89(5), 512–23.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T., & Weuster-Botz, D. (2005b). Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 42(Pt 3), 227–35.
- Puskeiler, R., & Weuster-Botz, D. (2004). Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab: Kultivierung von *Escherichia coli*. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(12), 1865–1869.
- Qureshi, N., Blaschek, H. P. (2000). Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 84-86, 225–35.
- Qureshi N., Schripsema J., Lienhardt J., Blaschek H. P. (2000). Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World J Microbiol Biotechnol*, 16, 377–382.
- Qureshi, Nasib, Saha, B. C., & Cotta, M. a. (2007). Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(6), 419–27.

- Riedlberger, P., & Weuster-Botz, D. (2012). New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource technology*, 106, 138–46.
- Roos, J. W., McLaughlin, J. K., & Papoutsakis, E. T. (1985). The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis, and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(5), 681–94.
- Ross, D. (1961). The acetone-butanol fermentation. *Progress in industrial microbiology*, 3, 71–90.
- Sauer, U., Santangelo, J. D., Treuner, A., Buchholz, M., & Dürre, P. (1995). Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS microbiology reviews*, 17(3), 331–40.
- Schmidt, M., & Weuster-Botz, D. (2012). Reaction engineering studies of acetone-butanol-ethanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology journal*, 7(5), 656–61.
- Schäpper, D., Alam, M. N. H. Z., Szita, N., Eliasson Lantz, A., & Gernaey, K. V. (2009). Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(3), 679–95.
- Shen, C. R., Lan, E. I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K. M., & Liao, J. C. (2011). Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 77(9), 2905–15.
- Sillers, R., Al-Hinai, M. A., & Papoutsakis, E. T. (2009). Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 38–49.
- Speers, A. M., Cologgi, D. L., & Reguera, G. (2009). Anaerobic cell culture. *Current protocols in microbiology*, Appendix 4, Appendix 4F. doi:10.1002/97804711729259.mca04fs12
- Steen, E. J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C. J., Redding, A., Ouellet, M., et al. (2008). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microbial cell factories*, 7, 36.
- Tangney, M., & Mitchell, W. J. (2000). Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(1), 71–80.
- Terracciano, J. S., Rapaport, E., & Kashket, E. R. (1988). Stress- and Growth Phase-Associated Proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 54(8), 1989–95.

- Thauer, Rudolf K.; Jungermann, K.; Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, 41(3), 809.
- Thormann, K., Feustel, L., Lorenz, K., Nakotte, S., & Dürre, P. (2002). Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation. *Journal of bacteriology*, 184(7), 1966–73.
- Tomas, C. A., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4951–65.
- Tummala, S. B., Junne, S. G., & Papoutsakis, E. T. (2003). Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Journal of bacteriology*, 185(12), 3644–53.
- Tummala, S. B., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology*, 185(6), 1923–34.
- Vester, A., Hans, M., Hohmann, H.-P., & Weuster-Botz, D. (2009). Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 71–6.
- von Kutepow, N., Kindler H. (1960). Die Alkoholsynthese nach W. Reppe. *Angew. Chem.* 22: 802-805.
- Wang, S., Zhu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2012). Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 1021–30.
- Weißermel, K., & H.-J. Arpe. (2003). Industrial organic chemistry, 4th edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Weißermel, K., & Arpe, H.-J. (1998) Technische organische Chemie, 5., vollst. überarb. Aufl., Weinheim, Wiley-VCH,
- Weuster-Botz, D. (2000). Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(5), 473–83.

10. Literaturverzeichnis

- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T., & Arnold, M. (2005). Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(2), 109–19.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., & Papoutsakis, E. T. (1989). Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. *Applied and environmental microbiology*, 55(2), 317–22.
- Wolin, E. A., Wolin, M. J., & Wolfe, R. S. (1963). Formation of methane by bacterial extracts. *The Journal of biological chemistry*, 238, 2882–6.
- Wollrab, Adalbert (2009): Organische Chemie; Verlag Springer Berlin; 3. Erg. Auflage
- Woods, D. R. (1995). The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends in biotechnology*, 13(7), 259–64.
- Yerushalmi, L., & Volesky, B. (1985). Importance of agitation in acetone-butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(9), 1297–305.
- Zlokarnik M. (1973). Rührleistung in begasten Flüssigkeiten. *Chem Ing Tech* 45:689-692.
- Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. a, & Schwarz, W. H. (2006). Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 587–97.

11. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 11.1: Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Einheit (falls vorhanden)
ABE	Aceton-Butanol-Ethanol	
asRNA	Antisense RNA	
ATCC	American Type Culture Collection	
ATP	Adenosintriphosphat	
b_x	Beladung	g/g
C_x -Zucker	Zucker mit x Kohlenstoffatomen	
c_{BTM}	Biotrockenmassekonzentration	g/L
CGM	Clostridial Growth Medium	
CoA	Coenzym A	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ÜE-pT::y	<i>Clostridium acetobutylicum</i> Stamm mit einer Überexpression des Genes y	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> x:int	<i>Clostridium acetobutylicum</i> Stamm mit einer Deletion des Genes y	
d	Durchmesser	m
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	
DAD	Diodenarray Detektor (auch Polyarray Detektor)	
η	Dynamische Viskosität	Pa s
GC	Gaschromatographie	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure	
MS-MES	Mineralsalz 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure	
$m_{x,t}$	Masse von x zum Zeitpunkt t	kg
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid	
Ne	Newtonzahl	
n	Rührerdrehzahl	U/min oder rpm

11. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

$n_t(x)$	Stoffmenge von x zum Zeitpunkt t	
OD	Optische Dichte (in dieser Arbeit immer bei 600 nm bestimmt)	-
P	Leistung	W
p	Druck	Pa
P_{But}	Produktivität	g/(L h)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Hydroxidionen	-
PPG	Polypropylenglycol	
Q_s	Glucoseaufnahme rate	g/(L h)
R	Allgemeine Gaskonstante	8,314 J/(mol·K)
RCA	Reinforced Clostridial Agar	
Re	Reynoldszahl	
RI Detector	Brechungsindexdetektor	
$\rho(x)$	Dichte von x	kg/m ³
S	Selektivität	mol/mol
Δt	Zeitintervall	h
T	Temperatur	K oder °C
t	Zeit	h
\dot{v}	Volumenstrom	L/min
V_x	Volumen von x	L

Gene

<i>adc</i>	Acetoacetat Decarboxylase
<i>adhE</i>	Acet-/Butyraldehyd Dehydrogenase
<i>ak</i>	Acetatkinase
<i>bdhAB</i>	Butanoldehydrogenase
<i>bcd</i>	Butyryl-CoA Dehydrogenase
<i>bk</i>	Butyratkinase
<i>ctfAB</i>	CoA-Transferase
<i>crt</i>	Crotonase
<i>edh</i>	Ethanoldehydrogenase
<i>hbd</i>	3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase
<i>pflB</i>	Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase
<i>pta</i>	Phosphotransacetylase
<i>ptb</i>	Phosphotransbutyrylase
<i>thl</i>	Thiolase

12. Anhang

12.1. Compact GC

12.1.1 Einstellungen

Der Compcat-GC wurde mit den folgenden Einstellungen, in der Compact GC eigenen Software (GC-Chromatogramm-Analyse EZ Chrome) einzutragen, betrieben:

Säulenofen: 80 °C

Ventilofen: 80 °C

FID Temperatur: 150 °C

Wasserstoff Fluss,

- während der Messung: 35 mL/min;
- zum Entzünden 50 mL/min

Synthetische Luft Flow: 300 mL/min

Druck: 40 kPa

Split Flow: 10.1 mL/min

Ansaugzeit: 15 s

Entspannungszeit: 2 s

Zur Überwachung der Dichtigkeit der Wasserstoffleitung wurde ein Single Gas Monitor iTrans H₂ UEG (7814635-1C210) verwendet.

12.1.2 Kalibrierung

Korrelationsfaktoren, die den Zusammenhang zwischen der von der GC gemessenen Fläche zu der Verdampften Masse an Lösemittel beschreiben waren experimentell zu bestimmen.

Es wurden die Annahmen getroffen, dass der Abgasvolumenstrom konstant ist und zur Vereinfachung der Rechnung nur aus Stickstoff besteht.

Die Gleichung 12.1 wurde zur Bestimmung der Faktoren verwendet:

$$m_{x,t} = \sum_0^t \rho (\text{Stickstoff}) \cdot \dot{v} \cdot b_x \cdot \Delta t \quad \text{Gleichung 12.1}$$

mit

$$b_x = k \cdot A \quad (3.2) \quad \text{Gleichung 12.2}$$

Mit

	$\rho (\text{Stickstoff}) \cdot \dot{v} \cdot b_x \cdot \Delta t$
$m_{x,t}$	Entwichene Masse des Lösemittels x im Zeitabschnitt t, g
$\rho (\text{Stickstoff})$	Dichte des Abgases (Stickstoff)
\dot{v}	Volumenstrom, L/min
Δt	Zeitabschnitt, Minuten
b_x	Beladung der Luft mit dem Lösemittel x, g/g
A	Mittlere Peakfläche über einen Zeitraum Δt [-]
k	Korrelationsfaktor der betrachteten Komponente [g/g]

Diese Faktoren wurden über Verdunstungsexperimente ermittelt. Dazu wurden Versuche bei Betriebsbedingungen mit angeschlossener Abgasanalytik durchgeführt. Eine Bilanzierung (mittels HPLC) über jedes einzelne Lösungsmittel ergab die verdunstete Menge an Lösungsmittel. Die aufgezeichneten Daten des Compact GC wurden anschließend mit den verdunsteten Massen an Lösungsmittel korreliert.

12.2 Geräte

Tabelle 12.1: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Analytische Waage Explorer 5 g - 32 kg	Ohaus
Analytische Waage Explorer 10 mg – 210g	Ohaus
Autoklav Varioklav Dampfsterilisatoren	H + P
Autoklav Varioklav Zyklondampf	H + P
Brutschrank/Inkubator Serie BD 240 L	Binder
Brutschrank/Inkubator INB 200 (30 °C)	Memmert
Durchflussmesser	Intelligent Digital
Einstrahl-Spektrophotometer Genesys™ 20	ThermoSpectronic
Flowmeter, diverse	Varian Inc/Vögtlin
Heizpilz U2/2000 2L	Heraeus-Wittman
Magnetrührer	Variomag
MTP-Photometer EL808 Bio-	Tek Instruments
pH-Elektrode BlueLine	Schott
pH-Meter PCE-PHD2 (mobil)	PCE Group
pH-Elektrode HI 1330 B	HANNA Instruments
pH-Meter CG 843	Schott
Pipetten 0,020 - 10,000 mL	Brand
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Sauerstoff- und Wasserstoffanalyser	COY-Laboratory Products
Ultraschallbad Ultrasonic cleaner	VWR
Vakuumpumpe	Gast
Wasserbad	GFL

Tabelle 12.2: Geräte zum Betrieb der Anaerobwerkbank.

Gerät	Hersteller / Verkäufer
Anaerobe Kammer aus Vinyl, mit 2 manuell betriebenen Rundscheulen & gasdichten Durchführungen von Gas-, Kühl- und Elektroleitungen Typ A	Coy Laboratory Products, Vertrieb Toepffer Laborsysteme GmbH, Göppingen
Vakuumpumpe für Betrieb der Rundscheulen G608NGX	s. o.
HEPA-Filtereinheit	s. o.
Gasmessgerät für Sauerstoff und Wasserstoff	s. o.
Lüftergehäuse, unbeheizt mit Trockenmittel und Palladiumkatalysatoren (StakPak)	s. o.
Trockenofen zum Ausheizen der Katalysatoren UNB 100 (bis 200 °C)	Memmert, Schwabach
Cultura Mini-Inkubationsschrank	Vertrieb über www.mibius.de

Tabelle 12.3: Rührkesselreaktorsystem im Liter-Maßstab.

Gerät	Hersteller/Vertrieb
CO ₂ -Abgasanalyse Compact GC	Blue Sense Blue Sense gas sensor GmbH Axel Semrau, Sprockhövel
Reaktorgefäß mit Glasdoppelmantel zur Temperierung (Totalvolumen 3,2 L), Schikanenkorb mit drei Strömungsbrechern, drei 6-Blattscheibenrührern, mechanischer Gleitringdichtung, Obenantrieb, Abluftkühler sowie Begasung über ein Begasungsrohr	Infors, Einsbach
Reaktorgefäß mit Glasdoppelmantel zur Temperierung (Totalvolumen 2 L), s.o.	Infors, Einsbach
pH-Prozesselektrode	Mettler-Toledo, Gießen
Reaktorwaage	Sartorius, Göttingen

12. Anhang

Peristaltische Pumpe Standard mit Pumpenkopf	Ismatec, Wertheim
Software IrisNT Pro Balance Version 4.11	Infors, Einsbach
BACVis Software zur CO ₂ -Analyse	BlueSense, Herten

Tabelle 12.4: Geräte zum Betrieb des Parallelbioreaktorblocks

Gerät	Hersteller / Verkäufer
mL-Bioreaktorblock bioREACTOR	2mag AG, München
Sterilgasabdeckung mit Hohlachsen und Rührern aus PEEK	2mag AG, München
Reaktorabdeckung zur Absaugung der Reaktorabluft Prototyp	2mag AG, München
Vakuumpumpe Laboport SD	KNF Neuberger, Freiburg
N842.3FT.40.18, 20 L/min	
Steuergerät zur Ansteuerung des Bioreaktorblocks mit integrierter Rührerausfallerkennung Prototyp	2mag AG, München
MassFlow für Stickstoff/Luft	Vögtlin, Aesch, Schweiz
Umwälzthermostat ME-12	Julabo, Seelbach
Durchlaufkühlaggregat DLK-402	-10 bis +40 °C G. Heinemann
Software:	
Fedbatch-XP v.1.0.248	DASGIP AG, Jülich
FBXServer	DASGIP AG, Jülich
Gemini v.4.2.17.304	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Magellan v.6.1	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
LabVIEW,	National Instruments. München

Tabelle 12.5: HPLC und Spezifikationen

Gerät	Hersteller
Autosampler, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Scientific, Dreieich
PDA Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Scientific, Dreieich
RI Detektor, Finnigan Surveyor Plus	Thermo Scientific, Dreieich
HPLC Surveyor Plus	Thermo Scientific, Dreieich
Säulenofen	Thermo Scientific, Dreieich
Hauptsäule Bio Rad HPX-87H	Bio Rad, München
Vorsäule Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio Rad, München

12.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Gase

Tabelle 12.6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1-Butanol	Carl Roth
4-Aminobenzoesäure	Carl Roth
Acetat (Eisessig)	Merck
Acetoin	Merck
Aceton	Carl Roth
Acetonitril (HPLC Grade)	J.T. Baker
Ammoniumsulfat	Carl Roth
Asparagin * H ₂ O	SERVA
Biotin	Carl Roth
Biozidal ZF, Desinfektionsmittel für die Anaerobwerkbank	WAK Chemie Medical
Borsäure	Merck
Butanol, zur Analyse	Carl Roth
Butyrat (Buttersäure)	Merck
Calciumchlorid 2H ₂ O	Merck
Calcium-D(+)-pantothenat	Carl Roth
Calciumsulfat * 2H ₂ O	Carl Roth

12. Anhang

Cobaltchlorid * 6H ₂ O	Merck
D-(+)-Glucose * H ₂ O	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
di- Natriumhydrogencarbonat	Merck
Erythromycin	Applichem Lifescience
Eisenchlorid * 6H ₂ O	Merck
Eisensulfat * 7H ₂ O	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Folsäure	Carl Roth
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Merck
Kaliumaluminiumsulfat 12H ₂ O	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumhydroxid	Carl Roth
Kupfer(II)sulfat 2H ₂ O t	Carl Roth
Lithiumacetoacetat	Applichem Lifescience
Magnesiumsulfat * 7H ₂ O	Carl Roth
Mangansulfat * H ₂ O	Merck
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES wasserfrei)	AppliChem
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriummolybdat * 2H ₂ O	Merck
Natriumselenit	Sigma Aldrich
Natriumthiosulfat	Merck
Nickelsulfat * 6H ₂ O	Merck
Nicotinsäure	Merck
Nitrilotriessigsäure	Merck
Pepton, tryptisch verdaut	Carl Roth
pH-Kalibrierlösung pH 4, 7, 9	Carl Roth
Polypropylenglykol (PPG)	Sigma Aldrich
Pyridoxinhydrochlorid Carl Roth	Carl Roth

Resazurin, Natriumsalz	Alfa Aesar
Schwefelsäure 95-97 %	Merck
Struktol	Schiller+Seilacher
Thiaminhydrochlorid	Sigma Aldrich
Zinksulfat * 7H ₂ O	Merck

Tabelle 12.7: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller / Verkäufer
Anaerobe Kulturröhrchen Hungate Typ, 16x125 mm, mit Butylgummi-Septum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
Butylstopfen für Laborflaschen für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Diverse Einmalkanülen und Einwegspritzen	Braun Melsungen/VWR/div.
Einwegküvetten Ratiolab Küvetten	Halbmikro Ratiolab
HPLC Probefläschchen Rollrandflasche ND11 mit Aluminium-Bördelkappe und Septum, 1,5 mL	VWR
Zentrifugenröhrchen Falcon-Typ, 15 und 50 mL	Greiner Bio-One
Laborglasflaschen, beschichtet protect mit DIN Gewinde GL45, PU-ummantelt, 250, 500, 1000 und 2000 mL	Sigma Aldrich
Lochkappen für Laborflaschen für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
HPLC Mikroeesätze 0,1 mL	VWR
Mikrozentrifugiergefäse 1,5 und 2 mL	Greiner Bio-One; Eppendorf
Mikrotiterplatte Deepwell, diverse	Nunc
mL-Bioreaktoren ohne Sensoren	2mag AG
Pipettenspitzen, diverse	Gilson/VWR/div.
Spritzenvorsatzfilter HPLC-zertifiziert, RC, diverse Größen	Whatman/ Thermo Scientific/ div.

12. Anhang

Zu-/Abluftfilter AcroR 37 TF, PTFE0,2 VM	Pall Corporation
--	------------------

Tabelle 12.8: Gase:

Gas	Bestellnummer (AirLiquide)
Formiergas (ARCAL F5), 50 L, 200 bar	I2513L50R2A001
Kohlenstoffdioxid 4.5, 50 L, 37,5 kg	P0760L50R0A001
Stickstoff 5.0, 50 L, 200 bar	P1709L50R2R001
Stickstoff N50, 10L, 200 bar	P1709S10R2A001
Synthetische Luft, (5.0), 10L, FD 200 bar	P1711S10R2A001
Wasserstoff 5.0, 50 L, 300 bar	P1713L50R3A001
Wasserstoff N50, 10L, 200 bar	P1713S10R2A001