

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Prozessintensivierung der Gasfermentation mit
Acetobacterium woodii in Rührkesselreaktoren**

Christina Alexandra Kantzow

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

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

Die Dissertation wurde am 23.09.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 02.12.2015 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Während dieser Zeit haben viele Personen auf unterschiedlichen Weisen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte.

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit danken, am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, im Rahmen einer spannenden und anspruchsvollen Fragestellung meine Promotion durchzuführen. Beim Korreferenten Herrn Professor Dr. Wolfgang Liebl (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München) sowie beim Prüfungsvorsitzenden Herrn Professor Dr.-Ing. Harald Klein (Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Technische Universität München) möchte ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Peter Dürre (Lehrstuhl für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm) für den Bakterienstamm *Acetobacterium woodii* DSM 1030 sowie die rekombinanten Stämme.

Bei Alexander Mayer, Dennis Schöne, Hannes Löwe, Steffen Albrecht und Simone Frank bedanke ich mich für die großartige Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik danke ich für die einzigartige Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, wobei ich namentlich Markus Amann, Yilei Fu, Harald Krispin, Ellen Truxius und Michael Weiner nennen möchte.

Mein besonderer Dank gilt Anna Groher und Benjamin Kick für das gründliche Korrekturlesen und vor allem für ihre Freundschaft, Unterstützung und die unvergessliche gemeinsame Zeit.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern, die mich bedingungslos unterstützt und mir damit diesen Weg ermöglicht haben. Vielen Dank auch an meine Schwester und vor allem meinen Freund Markus für ihr Verständnis, ihre Motivation und den Rückhalt über die gesamte Zeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Acetogene Mikroorganismen	5
3.1.1	Heterotropher Metabolismus	5
3.1.2	Autotropher Metabolismus	7
3.1.3	Bioenergetik im autotrophen Metabolismus.....	9
3.1.4	<i>Acetobacterium woodii</i>	12
3.2	Gasfermentation	13
3.2.1	Rührkesselreaktoren	13
3.2.2	Blasensäulenreaktoren	14
3.2.3	Rieselbettreaktoren	18
3.2.4	Membranverfahren	18
3.3	Bioprozesstechnische Grundlagen	22
3.3.1	Bilanzierung des idealen Rührkesselreaktors	22
3.3.2	Kinetik von Wachstum und Produktbildung	23
3.3.3	Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor	25
3.3.4	Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor	27
3.3.5	Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor mit Zellrückhaltung.....	30
3.3.6	Gas-Flüssig-Stofftransport in Bioreaktoren.....	32
3.3.7	Redoxpotential bei anaeroben Prozessen	34
4	Material und Methoden	37
4.1	<i>Acetobacterium woodii</i> Stämme	37
4.2	Anaerobes Arbeiten.....	37

4.3	Medienherstellung und Zusammensetzung.....	39
4.4	Kultivierung von <i>Acetobacterium woodii</i>	40
4.4.1	Stammhaltung und Vorkulturherstellung	40
4.4.2	Autotrophe Kultivierung in Septumflaschen	41
4.4.3	Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor	41
4.4.4	Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor bei 3,5 bar absolut.....	43
4.4.5	Kontinuierliche Prozessführung im Laborrührkesselreaktor	45
4.4.6	Kontinuierliche Prozessführung mit Zellrückhaltung	46
4.5	Analytische Methoden	48
4.5.1	Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration	48
4.5.2	Konzentrationsbestimmung von Metaboliten mittels HPLC.....	49
4.5.3	Bestimmung der Gasaufnahmezeiten mittels Abgasanalytik.....	50
4.5.4	Bestimmung spezifischer Raten	52
5	Reaktionstechnische Charakterisierung im Satzbetrieb	53
5.1	Referenzprozess zur Gasfermentation mit <i>Acetobacterium woodii</i> im Rührkesselreaktor.....	53
5.2	Variation der Natriumionenkonzentration im Medium.....	56
5.3	Kontrolle des Redoxpotentials im Rührkesselreaktor.....	63
5.3.1	Verlauf des Redoxpotentials über die Prozesszeit.....	63
5.3.2	Einsatz von Oxidationsmitteln.....	64
5.3.3	Einsatz von Reduktionsmitteln	68
5.3.4	Diskussion	72
5.4	Gasfermentation mit <i>Acetobacterium woodii</i> bei höheren Drücken	76
5.4.1	Variation des Systemdruckes.....	76
5.4.2	Variation des Wasserstoffpartialdruckes	78
5.4.3	Diskussion	80
5.5	Untersuchungen zur Nebenproduktbildung (Formiat) mit rekombinanten <i>Acetobacterium woodii</i> Stämmen	82
5.5.1	Bedeutung des Systemdruckes	84
5.5.2	Bedeutung der Natriumionenkonzentration.....	86
5.5.3	Diskussion	88

6	Reaktionstechnische Charakterisierung bei kontinuierlicher Prozessführung	93
6.1	Kontinuierliche Prozessführung ohne Zellrückhaltung	93
6.2	Kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung.....	97
6.2.1	Variation der Durchflussraten	97
6.2.2	Verdoppelung der Hefeextraktkonzentration	104
6.3	Diskussion.....	105
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	115
8	Referenzen	121
9	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	131
10	Anhang	133
10.1	Medien, Medienzusätze und Puffer.....	133
10.2	μ -GC-Methodik.....	135
10.3	Geräte	136
10.4	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	140

1 Einleitung

Die wachsende Besorgnis über den globalen Klimawandel sowie die Erschöpfung der fossilen Rohstoffquellen haben die Themen Energie und Treibstoffe in den Mittelpunkt der öffentlichen Diskussion gerückt. Dem internationalen Wirtschaftsforum regenerativer Energien in Münster zufolge gelangten im Jahr 2013 weltweit 35,1 Milliarden Tonnen Kohlenstoffdioxid in die Atmosphäre und für die Folgejahre ist ein weiterer Anstieg zu erwarten (Friedlingstein et al. 2014). Wirtschaft und Wissenschaft beschäftigen sich daher intensiv damit, Alternativen zu fossilen Rohstoffquellen zu finden, um einerseits die Treibhausgasemissionen zu reduzieren und andererseits die Abhängigkeit von endlichen, fossilen Rohstoffen zu verringern.

In diesem Zusammenhang kann die Bioökonomie, eine nachhaltige Form des Wirtschaftens, die ökonomische und ökologische Belange verknüpft, einen wesentlichen Beitrag leisten. Sie basiert auf einer effizienten und schonenden Nutzung von biologischen Ressourcen und umfasst unter anderem Forschungsschwerpunkte wie die Entwicklung neuer Verfahren zur Verarbeitung von kohlenstoffdioxidneutralen Rohstoffen (Biomasse), um den Kohlenstoffdioxidausstoß zu reduzieren.

Der dramatische Anstieg der Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Atmosphäre wird in erster Linie durch die Verbrennung von fossilen Rohstoffen verursacht und hat das Interesse an der stofflichen Nutzung von Kohlenstoffdioxid geweckt. In dieser Hinsicht wird intensiv an der Entwicklung biotechnologischer Prozesse unter Verwendung von anaeroben Mikroorganismen, welche in der Lage sind Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle zu nutzen, gearbeitet.

Ein vielversprechendes Verfahren zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid stellt die Gasfermentation dar. Hierfür werden strikt anaerobe, acetogene Mikroorganismen verwendet, die Kohlenstoffdioxid als Substrat nutzen und zu industriell relevanten Chemikalien, wie beispielsweise Essigsäure umsetzen können. Zur Reduktion dieses

energiearmen Substrates benötigen Acetogene Wasserstoff als Energiequelle, der aus der Elektrolyse von Wasser mit Hilfe erneuerbarer Energien wie der Fotovoltaik oder der Windkraft gewonnen werden kann. Dadurch entsteht ein gänzlich nachhaltiger Prozess zur Verwertung von Kohlenstoffdioxid.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Das obligat anaerobe Bakterium *Acetobacterium woodii* ist als ein Modellorganismus für die Gasfermentation anzusehen. Er zählt zu den natürlichen Homoacetatproduzenten und ist in der Lage, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle über den nach seinen Entdeckern benannten Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg umzusetzen und dabei als Hauptprodukt Essigsäure zu bilden (Ragsdale et al. 2008).

Essigsäure ist eine Basischemikalie mit einer jährlichen, weltweiten Produktionskapazität von bis zu 7 Millionen Tonnen, für deren Produktion derzeit nur petrochemische Herstellungsverfahren in Frage kommen, um die hohe Nachfrage zu decken (Sauer et al. 2008). Überwiegend erfolgt die chemische Synthese mit dem „Monsanto-Prozess“, bei dem Methanol mit Kohlenstoffmonoxid mit Hilfe eines Rhodiumkatalysators zu Essigsäure umgesetzt wird (Cheung et al. 2000). Aus ökologischer Sicht sprechen hohe Drücke von 30 bis 60 bar und Temperaturen bis zu 200°C sowie die Verwendung von Methanol, welches seinerseits unter ähnlich ungünstigen Bedingungen hergestellt wird, gegen dieses Verfahren.

Eine klassische Alternative, die bei moderaten Temperaturen und Umgebungsdruck stattfindet, ist die biotechnologische Herstellung von Essigsäure. Hierbei kommt die Oxidation von Ethanol durch Essigsäurebakterien der Gattung *Acetobacter* und *Gluconobacter* zum Einsatz, mit der weltweit rund 190.000 Jahrestonnen Essigsäure vorwiegend zum Einsatz in Lebensmitteln produziert werden. Der Ausgangsstoff Ethanol wird hierzu in der Regel durch alkoholische Gärung aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen (Antranikian 2006).

Einen vergleichsweise neuen Ansatz stellt die Gasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen wie *A. woodii* zur Herstellung von Essigsäure unter Verwendung von Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle dar, welches als Abfallprodukt aus der Verbrennung von fossilen und nachwachsenden Rohstoffen in großen Mengen zur Verfügung steht.

Über eine derartige Fixierung von Kohlenstoffdioxid zur Herstellung von Acetat mit *A. woodii* wurde erstmalig 1977 berichtet, wobei innerhalb eines Kultivierungszeitraums von etwa 6 Tagen in einem kontinuierlich mit Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff begasten Rührkesselreaktor 11 g L^{-1} Acetat gebildet werden konnten (Balch et al. 1977). Demler (2012) konnte durch pH-Kontrolle (pH 7), Überwindung der Stofftransportlimitierung gas-flüssig (volumetrischer Leistungseintrag $5,5 \text{ W L}^{-1}$) und Variation von Medienbestandteilen (Hefeextrakt, Vitamine, Spurenelemente) innerhalb von 3 Tagen eine Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor unter Umgebungsdruck erreichen.

Für mögliche industrielle Anwendungen zur Herstellung eines Massenproduktes wie Essigsäure sind aktuell zum einen die Produktkonzentration noch immer zu niedrig und zum anderen ist die Raum-Zeit-Ausbeute (volumetrische Acetatproduktivität) zu gering. Aufgrund der starken Energielimitierung des Wachstums von acetogenen Bakterien unter autotrophen Bedingungen können selbst im Satzverfahren nur geringe Zelldichten ($2,8 \text{ g L}^{-1}$, Demler 2012) und damit geringe Biokatalysatorkonzentrationen erreicht werden.

Um die Zelldichten im Satzverfahren zu erhöhen und damit potentiell die finale Acetatkonzentration zu verbessern, soll zunächst der Einfluss verschiedener, bisher noch nicht berücksichtigter Prozessgrößen, untersucht werden.

Die Konzentration von Natriumionen im Reaktionsmedium spielt sicherlich eine Rolle bei der Energiegewinnung von verschiedenen Acetogenen wie *A. woodii*, da diese einen transmembranen Natriumgradienten zur Biosynthese des essentiellen Energieträgers ATP verwenden (Poehlein et al. 2012). Ein Ziel ist daher die Identifikation geeigneter Natriumionenkonzentrationen im Reaktionsmedium, um Wachstum und Produktbildung von *A. woodii* im Satzverfahren mit kontinuierlicher Begasung zu verbessern.

Bei anaeroben mikrobiellen Prozessen kann darüber hinaus das Redoxpotential im Reaktionsmedium Einfluss auf die Produktbildung haben (Wang et al. 2012). Dies wurde bisher nicht bei Gasfermentationen mit *A. woodii* untersucht. Ein weiteres Ziel ist die reaktionstechnische Untersuchung von *A. woodii* bei unterschiedlichen Redoxpotentialen im Rührkesselreaktor. Die Einstellung verschiedener Redoxpotentiale kann dabei durch Zugabe geeigneter redoxaktiver Chemikalien erfolgen.

Ein klassischer Ansatz zur Überwindung einer Stofftransportlimitierung gas-flüssig ist die Erhöhung der Löslichkeit des potentiell limitierenden Gases (hier Wasserstoff) im Reaktionsmedium durch Erhöhung des Partialdruckes in der Gasphase. Im Rührkesselreaktor lässt sich dadurch der Leistungseintrag durch die Rührorgane reduzieren. Demler et al.

(2011) konnten bereits zeigen, dass bei Erhöhung des Systemdruckes auf 1,8 bar und Reduktion des Leistungseintrages auf 20% (im Vergleich zu 1 bar) eine ausreichende Wasserstoffversorgung im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor sichergestellt werden konnte. Hier stellt sich die grundsätzliche Frage, ob der Wasserstoffpartialdruck beliebig erhöht werden kann, beziehungsweise der Stoffwechsel von *A. woodii* durch hohe Wasserstoffpartialdrücke inhibiert werden könnte. Eine weitere Zielsetzung ist die reaktionstechnische Untersuchung von Wachstum und Produktbildung von *A. woodii* im Satzverfahren bei erhöhtem Wasserstoffpartialdruck und damit erhöhtem Gesamtdruck.

Der klassische Ansatz zur Erhöhung von Raum-Zeit-Ausbeuten ist der Wechsel vom Satzprozess zur kontinuierlichen Prozessführung. In mehreren Arbeiten wurde dies bereits auch bei anderen acetogenen Mikroorganismen gezeigt (Klemps et al. 1987; Mohammadi et al. 2012; Peters 1998). Im kontinuierlichen Rührkesselreaktor ist die Einstellung einer geeigneten Durchflussrate schwierig, da ein zu schnelles Austauschen des Mediums eine Austragung der gesamten Biomasse (wash-out) zur Folge hat. Hohe Durchflussraten sind jedoch notwendig, um hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen. Gerade bei Gasfermentationen mit acetogenen Mikroorganismen sind aufgrund der Energielimitierung des Wachstums eine geringe Wachstumsrate ($\mu \leq 0,04 \text{ h}^{-1}$, Demler 2012) und damit geringe Durchflussraten im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor zu erwarten. Zur Erzielung höherer Raum-Zeit-Ausbeuten ist die Verweilzeitentkopplung von Zellen und Medium sinnvoll (Aivasidis et al. 1988). Eine mögliche Technik stellt dabei die Zellrückhaltung mittels Querstromfiltration im Bypass zum kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor dar (Liu et al. 2014). Eine Alternative zur Mikrofiltration im Bypass, die in der Regel mit einem hohen Leistungseintrag aufgrund der erforderlichen hohen Überströmungsgeschwindigkeit der Membranflächen und der notwendigen kurzen Verweilzeit der Mikroorganismen im Bypass zur Vermeidung von Substratlimitierung verbunden ist, sind getauchte Membranen, die industriell beispielsweise bei der Abwasserreinigung vorteilhaft und kostengünstig eingesetzt werden (Stephenson et al. 2000). Zielsetzungen sind hier zum einen die Integration von getauchten Membranen in Rührkesselreaktoren für Gasfermentationen, da sterilisierbare, getauchte Membranmodule nicht kommerziell verfügbar sind. Zum anderen sollen kontinuierliche Gasfermentationen mit und ohne Zellrückhaltung mit *A. woodii* verfahrenstechnisch untersucht werden, um geeignete Prozessführungsstrategien zur Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeuten bei möglichst hohen Produktkonzentrationen identifizieren zu können.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Acetogene Mikroorganismen

Acetogene Bakterien sind eine spezielle Gruppe strikt anaerober Mikroorganismen, die aufgrund ihrer metabolischen Flexibilität ubiquitär in der Natur, sogar bei hohen Temperaturen, basischem pH und in salzhaltigen Systemen vorkommen und ein wichtiges Bindeglied bei der anaeroben Mineralisierung organischer Verbindungen darstellen (Dürre et al. 2015; Müller et al. 2004; Müller et al. 2013). Das erste acetogene Bakterium, *Clostridium aceticum*, wurde 1936 isoliert (Wieringa 1936). Danach konnten Acetogene aus unterschiedlichsten Habitaten, wie beispielsweise aus Böden, Meeressedimenten oder dem Darm von Termiten und Säugetieren gewonnen werden (Drake et al. 2008; Küsel et al. 1999; Liu et al. 1993; Morvan et al. 1996; Peters et al. 1995; Simankova et al. 2000). Bislang sind über 100 acetogene Spezies isoliert worden, die durch 23 Genera vertreten sind. Die meisten zählen zu den Genera *Acetobacterium* und *Clostridium* (Drake 1995). Acetogene besitzen einen vielseitigen Metabolismus und sind neben ihrer Fähigkeit heterotroph zu wachsen außerdem dazu befähigt autotroph Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonooxid zu verwerten (Diekert et al. 1994). Auf beide Stoffwechselwege soll in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen und der verwendete Mikroorganismus, *Acetobacterium woodii*, vorgestellt werden.

3.1.1 Heterotropher Metabolismus

Acetogene Mikroorganismen sind in der Lage über den heterotrophen Stoffwechsel Energie in Form von ATP zu gewinnen und dabei Acetat zu bilden (siehe Abbildung 3.1). Dabei wird die aufgenommene Hexose (Fructose oder Glucose) zunächst über die klassische Glykolyse unter Gewinnung von 2 Mol ATP pro Mol Hexose sowie 4 Mol Redoxäquivalente [H] zu 2 Mol Pyruvat umgesetzt. Es folgt die Decarboxylierung von 2 Mol Pyruvat durch die

Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu 2 Mol Acetyl-CoA und 2 Mol CO₂, wobei weitere 4 Mol Reduktionsäquivalente generiert werden (Diekert et al. 1994; Drake et al. 2006; Wood et al. 1986). Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase verwendet hierfür elektronen-transportierende Proteine mit niedrigem Redoxpotential, wie zum Beispiel Ferredoxin, um Pyruvat zu Acetyl-CoA zu oxidieren und stellt als Verbindung der Glykolyse mit dem Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel dar.

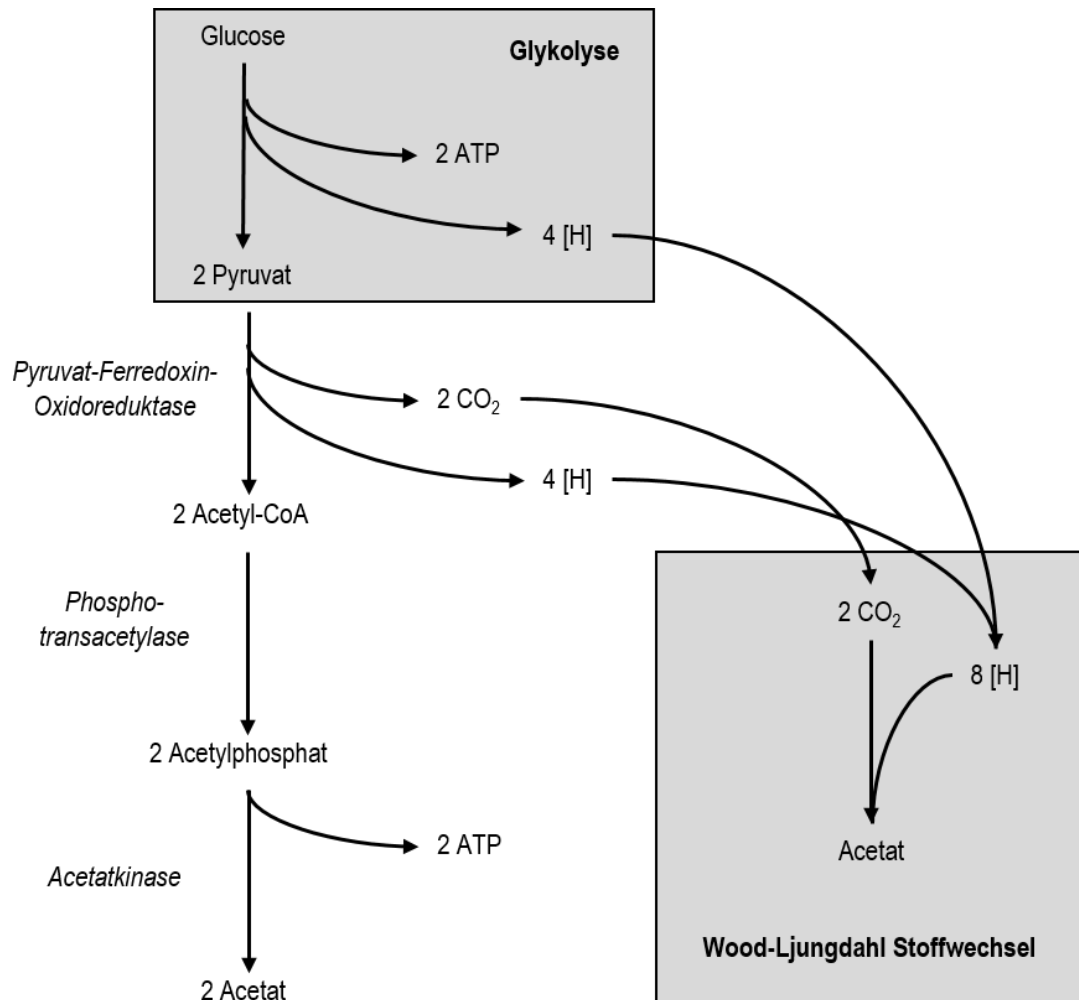
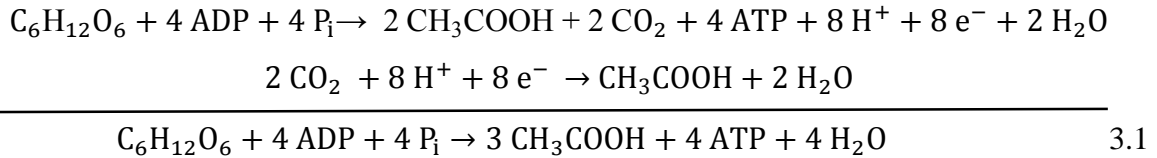


Abbildung 3.1: Die homoacetogene Umwandlung von Glucose zu Acetat. ATP entspricht der Energie die über Substratkettenphosphorylierung hergestellt wurde. [H] sind die gewonnenen Redoxäquivalente (abgeändert nach Müller et al. 2004).

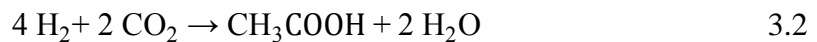
Die weitere Umsetzung von Acetyl-CoA über Acetylphosphat zu Acetat wird durch die Phosphotransacetylase und die Acetatkinase katalysiert, wobei weitere 2 Mol ATP durch Substratkettenphosphorylierung synthetisiert werden. Die entstanden 2 Mol CO₂ und 8 Mol Redoxäquivalente werden im reduktiven Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg zu einem

weiteren Molekül Acetat umgesetzt (Barker et al. 1945). Die stöchiometrische Umsetzung von Glucose zu Acetat ist in Gleichung 3.1 zusammengefasst (Ragsdale et al. 2008).



3.1.2 Autotropher Metabolismus

Der zentrale Stoffwechselweg, der es Acetogenen ermöglicht, autotroph zu wachsen, ist der nach seinen Entdeckern benannte Wood-Ljungdahl Stoffwechselweg, welcher die Reduktion von CO_2 zu Acetat nach Gleichung 3.2 ermöglicht (Ragsdale et al. 2008).



Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, kann der Wood-Ljungdahl Stoffwechselweg in zwei lineare Reaktionsketten, den sogenannten Methyl- und den Carbonyl-Zweig unterteilt werden. Ersterer umfasst die Reduktion von CO_2 zu einer Methylgruppe. Hierfür wird zunächst 1 Mol CO_2 zu Formiat reduziert. Es folgt die energieverbrauchende Bindung der Formylgruppe an den Kofaktor Tetrahydrofolat (THF) um Formyl-Tetrahydrofolat zu generieren. Formyl-Tetrahydrofolat wird nachfolgend schrittweise zu Methyl-Tetrahydrofolat reduziert (Ljungdahl 1986).

Ein weiteres Mol CO_2 wird im Carbonyl-Zweig über die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase zu einer metallgebundenen Carbonylgruppe reduziert und mit einer Methylgruppe sowie Coenzym A zu Acetyl-CoA, dem zentralen Vorläufermolekül für sämtliche biosynthetische Reaktionen, umgesetzt (Ljungdahl 1986; Ragsdale et al. 2008). Ausgehend von Acetyl-CoA wird über die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase Acetat unter Rückgewinnung eines Moleküls ATP synthetisiert. Da dieses ATP zu Beginn des Stoffwechselwegs bei der Umsetzung von Formiat zu Formyl-Tetrahydrofolat verbraucht wird, kann innerhalb des Wood-Ljungdahl Stoffwechsels kein Nettoenergiegewinn verzeichnet werden (Ljungdahl 1986; Ragsdale et al. 2008; Wood et al. 1986).

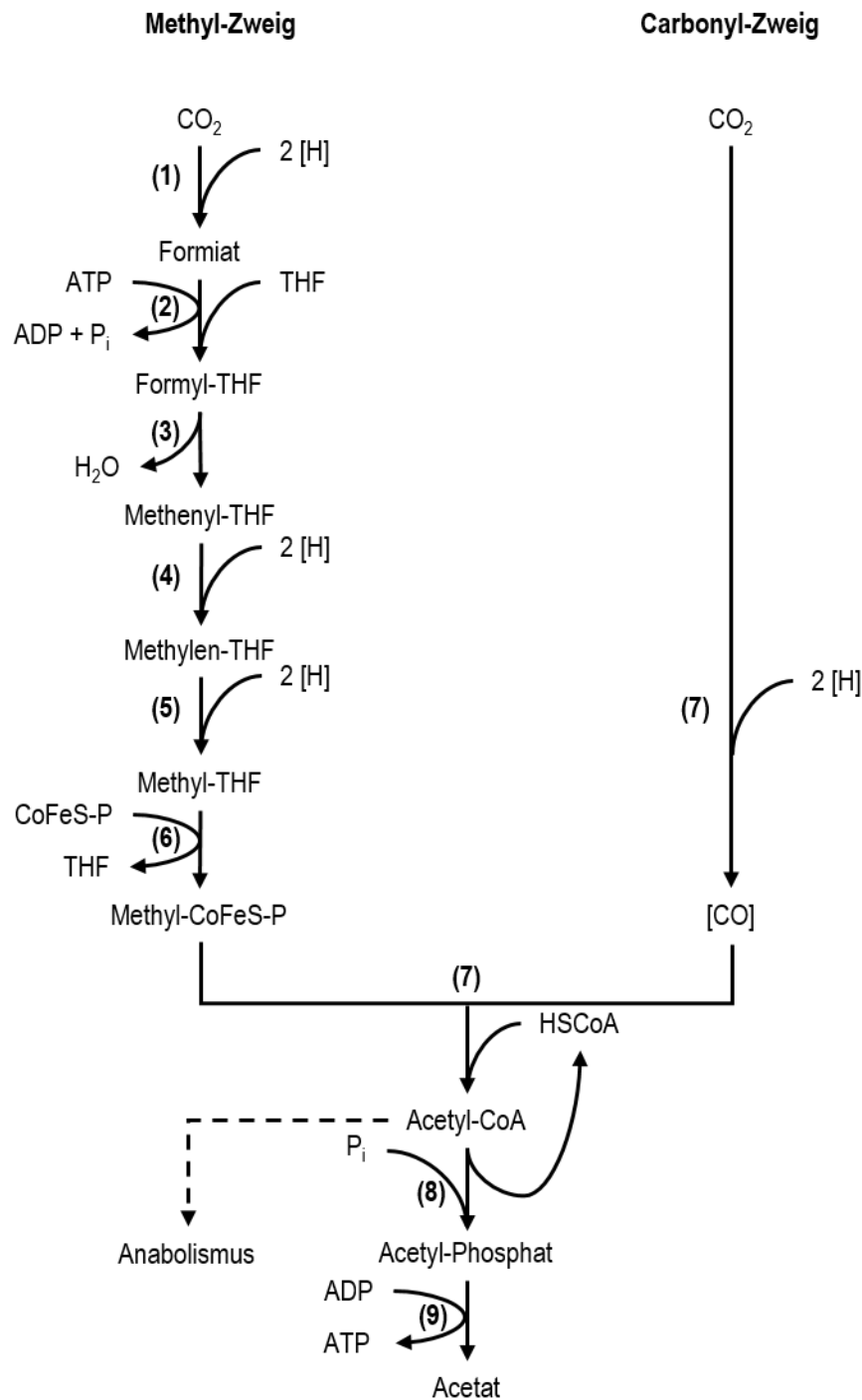


Abbildung 3.2: Der reduktive Wood-Ljungdahl Stoffwechselweg. Die jeweilige Reaktion wird von folgenden Enzymen katalysiert: (1) Kohlenstoffdioxidreduktase, (2) Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase, (3) Formyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase, (4) Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase, (5) Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, (6) Methyl-Transferase, (7) CO-Dehydrogenase/ Acetyl-CoA-Synthetase, (8) Phosphotransacetylase, (9) Acetatkinase (abgeändert nach Schuchmann et al. 2014).

3.1.3 Bioenergetik im autotrophen Metabolismus

Als universaler Energieüberträger dient Adenosintriphosphat (ATP) in jeder lebenden Zelle zur Speicherung von Energie. Allgemein sind zwei Formen zur Herstellung von ATP, die Substratkettenphosphorylierung und die Phosphorylierung, welche über einen chemiosmotischen Ionengradienten angetrieben wird, bekannt. Die Substratkettenphosphorylierung verbindet zur Bildung von ATP chemische Reaktionen direkt mit der Phosphorylierung von ADP. Im Gegensatz dazu wird bei der chemiosmotischen ATP-Produktion eine exergonische, in den meisten Fällen elektronenübertragende Reaktion mit einer ionenübertragenden, transmembranen ATP-Synthase gekoppelt. Innerhalb des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels ist die Energiegewinnung mittels Substratkettenphosphorylierung aufgeklärt, jedoch kann aufgrund der energieabhängigen Umsetzung von Formiat zu Formyl-Tetrahydrofolat im Methylzweig kein Nettoenergiegewinn verzeichnet werden. Die Bereitstellung von Energie in Form von ATP muss daher auf einen chemiosmotischen Mechanismus bei der autotrophen CO₂-Fixierung zurückgeführt werden.

Aus bioenergetischer Sicht wurden Acetogene für lange Zeit in Abhängigkeit von ihrem chemiosmotischen Mechanismus zur Energiegewinnung in zwei Gruppen unterteilt: eine H⁺-abhängige und eine Na⁺-abhängige Gruppe (Müller 2003). Die erste Gruppe umfasst die Acetogenen, wie beispielsweise *Moorella thermoacetica*, welche Cytochrome für den membrangebundenen Elektronentransport besitzen und durch den Aufbau eines Protonengradienten über die Zellmembran eine ATP-Synthase antreiben (Baronofsky et al. 1984; Ivey et al. 1986). Die andere Gruppe umfasst die acetogenen Mikroorganismen, wie beispielsweise *A. woodii*, welche mit Hilfe von Corrinoiden einen Natriumgradienten über die Zellmembran aufbauen (Biegel et al. 2010). Da eine Einteilung von *Clostridium ljungdahlii*, welcher weder Zytochrome besitzt noch abhängig von Natriumionen ist, in diese Gruppen nicht möglich war und des Weiteren die Existenz von Zytochrom- oder Corrinoid-abhängigen Enzymen in Acetogenen an Hand von Genomanalysen nicht bestätigt werden konnte, wurde die Einteilung von Acetogenen überarbeitet. Acetogene besitzen entweder einen Rnf-Komplex (eine Ferredoxin-NAD⁺ Oxidoreduktase) oder einen Ech-Komplex (eine energiekonservierende Hydrogenase), weswegen eine Klassifizierung in „Rnf-Acetogene“ und „Ech-Acetogene“ vorgeschlagen wird (Schuchmann et al. 2014). Je nachdem welches Ion (Na⁺ oder H⁺) innerhalb dieser Komplexe für die ATP Synthese herangezogen wird, kann dann zwischen zwei weiteren Subgruppen, eine natriumabhängige und eine protonenabhängige Gruppe, differenziert werden.

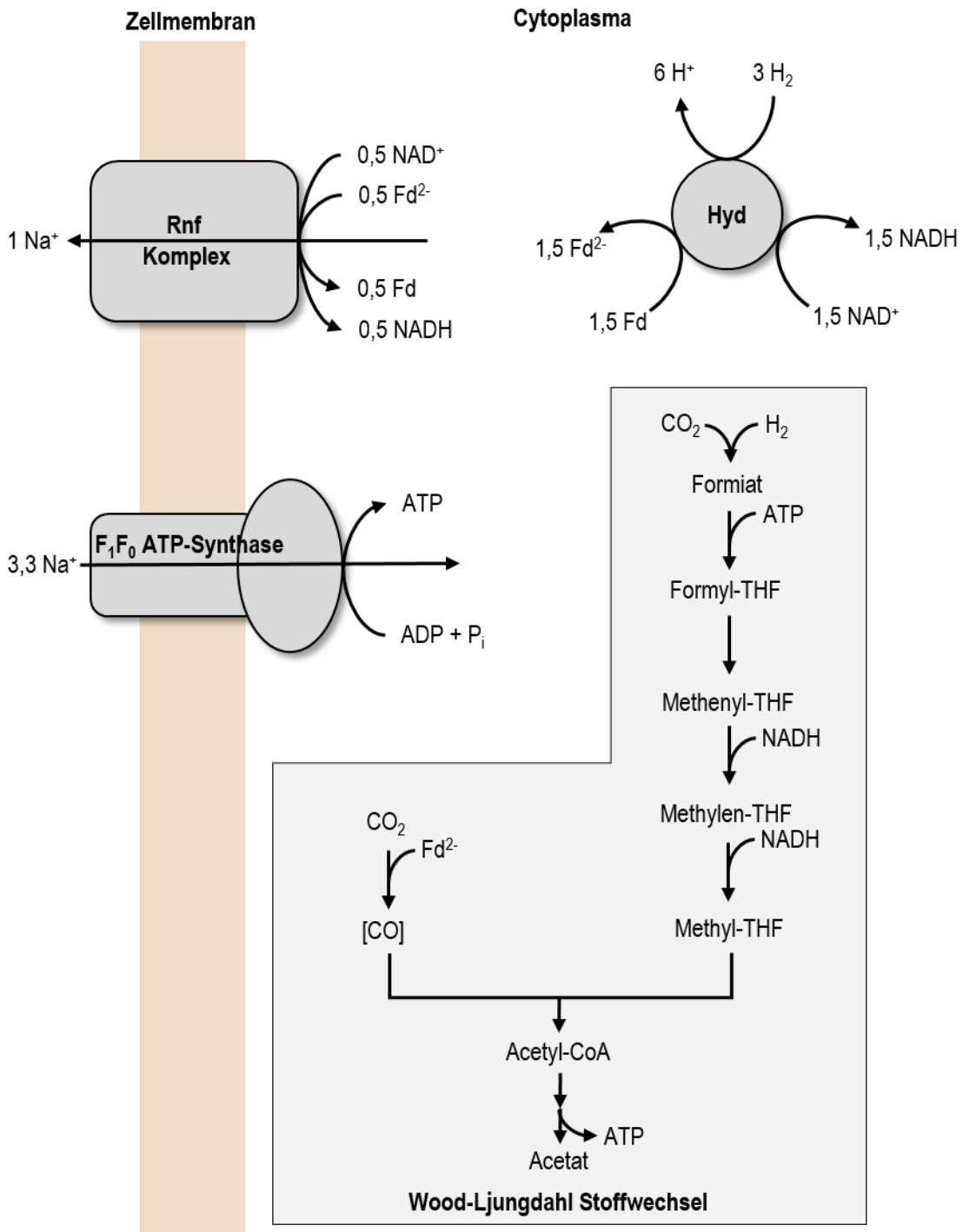


Abbildung 3.3: Mechanismus zur Energiekonservierung in *A. woodii* über den Rnf-Komplex und die F₁F₀ ATP-Synthase. NAD⁺ wird durch Ferredoxin (Fd) reduziert und stellt somit Reduktionsäquivalente für den Wood-Ljungdahl Stoffwechsel bereit. Durch das Einströmen von Na⁺ wird die F₁F₀ ATP-Synthase zur Bildung von ATP angetrieben. Die Regenerierung von Ferredoxin erfolgt über die [FeFe]-Hydrogenase (Hyd) (abgeändert nach Poehlein et al. 2012 und Schuchmann et al. 2014).

Da in *A. woodii* der Rnf-Komplex und eine Na⁺ transportierenden F₁F₀ ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt wird (Fritz et al. 2007; Müller et al. 2001; Schmidt et al. 2009), ist dieser als Rnf- und natriumabhängiger Organismus einzuordnen.

Darüber hinaus ergab die Analyse der Genomsequenz von *A. woodii*, dass bis auf die Na⁺ transportierende und membrangebundene F₁F₀ ATP-Synthase alle Enzyme des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels sowie die Hydrogenasen gelöst vorliegen (Brandt et al. 2013; Fritz et al. 2007; Müller et al. 2001).

A. woodii war zudem der erste acetogene Mikroorganismus bei dem die Frage zur Energieherstellung während der Acetogenese abschließend beantwortet und nach Durchführung einiger Experimente ein detailliertes Model für die Na⁺-Gradienten abhängige Acetogenese aus H₂ und CO₂ aufgestellt werden konnte (Schuchmann et al. 2014): Über die F₁F₀ ATP-Synthase werden pro 3,3 Mol eingeschleuste Na⁺ 1 Mol ATP erzeugt. Zur Aufrechterhaltung des Natriumgradienten über die Zellmembran oxidiert ein membrangebundener Rnf-Komplex 0,5 Mol Ferredoxin, welche nachfolgend zur Reduktion von 0,5 Mol NAD⁺ verbraucht werden (Hess et al. 2013). Unter der Voraussetzung einer Na⁺/e⁻-Stöchiometrie von 1, wird der Elektronentransfer von der Translokation von 1 Mol Na⁺ aus der Zelle begleitet. Um darüber hinaus ausreichend Ferredoxin für die beschriebene Reaktion zu regenerieren, katalysiert die elektronenübertragende [FeFe]-Hydrogenase die Oxidation von 3 Mol Wasserstoff, um 1,5 Mol NAD⁺ sowie 1,5 Mol Ferredoxin zu reduzieren. Die Regeneration des Redoxäquivalents NAD⁺ ist durch den Wood-Ljungdahl Stoffwechselweg gewährleistet (siehe Abbildung 3.3).

Für *A. woodii* gilt daher folgende Summenformel (Schuchmann et al. 2014):



3.1.4 *Acetobacterium woodii*

A. woodii DSM 1030 wurde zuerst von Balch et al. (1977) aus Meeressedimenten isoliert und gehört zu den ersten bekannten Organismen, die Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid stöchiometrisch zu Acetat umwandeln können. *A. woodii* ist nach Harland G. Wood benannt und gehört zu den homoacetogenen Bakterien, da als einziges metabolisches Produkt Acetat gebildet wird (Diekert et al. 1994). Dieses gram-positive Bakterium, das meist paarweise in 1 – 2 µm langen, ovalen Stäbchen auftritt (siehe Abbildung 3.4), kann sich durch seine ein bis zwei subterminalen Flagellen aktiv fortbewegen (Balch et al. 1977).

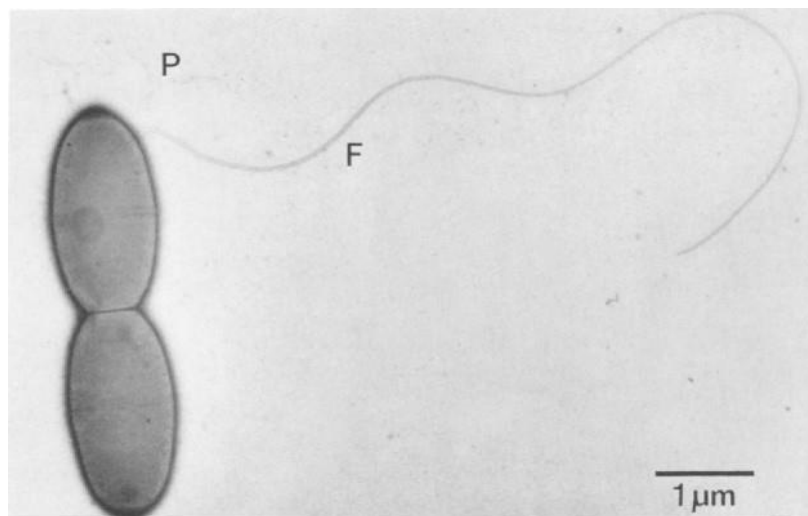


Abbildung 3.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. woodii* mit subterminalem Flagellum (F) und Pili-artigen Strukturen (P) (Balch et al., 1977).

A. woodii besitzt eine optimale Wachstumstemperatur von 30 °C und ein pH-Optimum im neutralen Bereich. Obwohl es keine Endosporen bildet, ist es *A. woodii* möglich einige Wochen bei einem pH von 5 zu überleben (Balch et al. 1977). Der Organismus ist sowohl in der Lage Energie über die heterotrophe Homoacetatfermentation als auch über die autotrophe Acetogenese zu gewinnen (Balch et al. 1977; Simankova et al. 2000). Die für das heterotrophe Wachstum bestätigten, verwendbaren Substrate sind mit absteigender Nutzbarkeit Fructose, Glucose, Lactat, Glycerin und Formiat (Bache et al. 1981; Balch et al. 1977; Fuchs 1986; Sharak Genthner et al. 1987; Tanner et al. 1981). Darüber hinaus können Substrate wie Methanol und verschiedene methylierte aromatische Säuren verwertet werden (Bache et al. 1981; Sharak Genthner et al. 1987). Als Elektronenakzeptoren können auch aromatische Akrylate wie Caffeat dienen (Biegel et al. 2009). Des Weiteren wurde von einem mixotrophen Wachstum, bei dem gleichzeitig sowohl Kohlenstoffdioxid als auch organische Verbindungen umgesetzt werden, berichtet (Braun et al. 1981; Demler 2012).

3.2 Gasfermentation

Das wachsende Interesse am Einsatz von acetogenen Mikroorganismen zur Produktion von organischen Säuren oder Alkoholen aus Synthesegas sorgte für eine starke Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Gasfermentation, wobei gegenwärtig die Firmen INEOS Bio (USA, 2008), Coskata (USA, 2009) und Lanza Tech (Neuseeland, 2010) über den erfolgreichen Betrieb von Demonstrations- und Pilotanlagen zur Produktion von Ethanol aus Synthesegas berichten.

Zur Verbesserung der Gasfermentation wurde intensiv an der Konfiguration des Reaktorsystems gearbeitet. Dabei liegt der Fokus auf wesentlichen Reaktoreigenschaften wie den Stoffübergang von der Gas- in die Flüssigkeitsphase, geringe Betriebs- und Instandhaltungskosten und die Einfachheit der Maßstabsvergrößerung (Munasinghe et al. 2010a). In den nachfolgenden Kapiteln sowie in Tabelle 3.1 soll ein Überblick über die eingesetzten Reaktorsysteme gegeben werden.

3.2.1 Rührkesselreaktoren

Das wohl gebräuchlichste Reaktorsystem in der Biotechnologie stellt der Rührkesselreaktor (engl. *stirred tank reactor*, STR) dar. Er verfügt über die Möglichkeit der kontinuierlichen Begasung des Reaktionsmediums, wobei der Stoffübergang von der Gas- in die Flüssigkeitsphase durch den Rührer kontrolliert werden kann (Vega et al. 1989). Die Erhöhung der Rührerdrehzahl führt dabei zu einer durch die Zerkleinerung großer Gasblasen zu einer Steigerung der Austauschfläche zwischen der Gasphase und der Flüssigkeitsphase. Zudem verweilen kleinere Gasblasen aufgrund der geringeren Auftriebsgeschwindigkeit länger im wässrigen Medium (Munasinghe et al. 2010a). Zum anderen wird der Stofftransport von der Gas- in die Flüssigkeitsphase mit zunehmend turbulenter Flüssigkeitsströmung verbessert. Die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit bringt jedoch einen erhöhten Energieverbrauch mit sich.

Eine Vielzahl an Acetogenen wurde bereits im Satzverfahren im Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung kultiviert (siehe Tabelle 3.1). Chang et al. (1999) veröffentlichten beispielsweise die Gasfermentation mit *Eubacterium limosum* im kontinuierlich mit Kohlenstoffmonooxid (80%) und Kohlenstoffdioxid (20%) begasten Rührkesselreaktor, bei der eine spezifische Wachstumsrate von $0,17 \text{ h}^{-1}$, eine maximale Zellkonzentration von $0,4 \text{ g L}^{-1}$ und eine maximale Acetatkonzentration von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden konnten.

Des Weiteren wurde *Butyribacterium methylotrophicum* im kontinuierlich mit Kohlenstoffmonooxid (70%) und Kohlenstoffdioxid (30%) begasten Rührkesselreaktor (Satzverfahren) untersucht, wobei unter diesen Bedingungen eine maximale Zellkonzentration von $0,35 \text{ g L}^{-1}$ und eine maximale Acetatkonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ festgestellt werden konnten (Heiskanen et al. 2007). Weiterhin ist die Gasfermentation mit *A. woodii* reaktionstechnisch gut untersucht. Im kontinuierlich begasten (40% H_2 , 17% CO_2 , 43% N_2) Rührkesselreaktor können im Satzverfahren eine maximale Wachstumsrate von $0,04 \text{ h}^{-1}$, eine maximale Zellkonzentration von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ und eine finale Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} erreicht werden (Demler 2012).

Auch die kontinuierliche Prozessführung (engl. *continuous stirred tank reactor*, CSTR), bei der frisches Reaktionsmedium kontinuierlich in den Rührkesselreaktor zugeführt und die gleiche Menge an Zellsuspension abgeführt wird, wurde bereits bei Gasfermentationen untersucht (Chmiel 2011; Doran 1995). Die wesentlichen Vorteile eines kontinuierlichen Prozesses gegenüber dem Satzbetrieb sind die erheblich höheren volumetrischen Produktbildungsraten und das kontinuierliche Austragen von Produkt um damit eine mögliche Produktinhibierung zu reduzieren. So konnte beispielsweise durch die Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung mit dem acetogenen Organismus *Acetogenium kivui* die volumetrische Acetatbildungsrate von $10,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Satzverfahren um etwa den Faktor 3 auf $43,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im kontinuierlichen Verfahren bei einer Durchflussrate von $0,32 \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden (Klemps et al. 1987). Des Weiteren wurde für die Gasfermentation mit *C. ljungdahlii* die kontinuierliche Prozessführung angewendet, wobei nach 5,4 hydraulischen Verweilzeiten eine Biotrockenmassekonzentration von $2,3 \text{ g L}^{-1}$ und Produktkonzentrationen von $6,5 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $5,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gemessen werden konnten (Mohammadi et al. 2012).

3.2.2 Blasensäulenreaktoren

Eine Alternative zum Rührkesselreaktor stellen Bioreaktoren ohne mechanische Durchmischung, wie Blasensäulenreaktoren dar.

Blasensäulenreaktoren sind Stoffaustausch- und Reaktionsapparate, in denen ein Gas mit der Flüssigphase in Kontakt gebracht wird und der Leistungseintrag nur über Gasexpansion erfolgt. Sie sind strukturell sehr einfach aufgebaut und bestehen allgemein aus einem zylinderförmigen Reaktor. Die gasförmigen Substrate werden in der Regel über statische Gasverteiler (Sinterplatten), über den gesamten Reaktorquerschnitt, kontinuierlich in den

Reaktor eingebracht. Die Durchmischung der Blasensäulenreaktoren ist durch die aufsteigenden Gasblasen gewährleistet (Doran 1995). Aufgrund ihrer hohen Stoffübergangsleistungen (gas-flüssig) und ihrer relativ geringen Betriebs- und Instandhaltungskosten sind sie für große Reaktorvolumen in industriellen Anwendung gut einsetzbar. Dabei müssen jedoch Nachteile wie eine unkontrollierte Koaleszenz der Gasblasen oder auch die Rückvermischung von Gas durch die Flüssigkeitszirkulation bei hohen Gasgeschwindigkeiten berücksichtigt werden (Datar et al. 2004).

Gasliftreaktoren sind eine spezielle Variante von Blasensäulenreaktoren, mit innerem oder äußeren Umlauf, die in der Regel mit Leitrohren und speziellen Gasverteilern versehen sind. Durch eine bodenseitige Begasungseinrichtung wird nur ein Teil des Reaktorquerschnitts begast. Mit dem Austreten des Gases an der Kopfseite des Reaktors ergibt sich durch die entstehende hydrostatische Druckdifferenz eine Pumpenwirkung, die einen Flüssigkeitsstrom in der begasten Zone erzeugt. In den unbegasten Segmenten strömt die gasblasenfreie Flüssigphase zurück. Somit ist eine definierte Strömungsführung und folglich auch eine definiertere Durchmischung als bei Blasensäulenreaktoren gewährleistet (Doran 1995).

Ein 35 L Gasliftreaktor wurde bereits für die Umwandlung von Kohlenstoffmonoxid und Wasser zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid mit *Carboxydotherrnus hydrogeniformans* eingesetzt, wobei eine konstante Kultivierung für drei Monate durchgeführt wurde und damit eine maximale Umsetzungseffizienz für Kohlenstoffmonoxid von 90,4% ermittelt werden konnte (Haddad et al. 2014). Ein Anwendungsbeispiel für eine Gasfermentation mit einem acetogenen Mikroorganismus im Blasensäulenreaktor wurde mit *C. carboxidivorans* veröffentlicht (Datar et al. 2004). Hierbei wurden sowohl Gasfermentationen mit gereinigten Flaschengasen als auch mit aus der Verbrennung von Biotrockenmasse gewonnenem Synthesegas durchgeführt, wobei nach einigen Optimierungen nach 14 Tagen eine Biotrockenmassekonzentration von $0,6 \text{ g L}^{-1}$ und eine Produktkonzentration $2,8 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol (aus den Literaturdaten abgeleitete Werte) erreicht wurden.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung unterschiedlicher Reaktorsysteme, die für die Gasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen eingesetzt wurden. Satzverfahren im Rührkesselreaktor sind durch STR, kontinuierliche Prozessführungen durch CSTR und kontinuierliche Prozessführungen mit externer Zellrückhaltung durch ein Hohlfasermembranmodul durch HFMR abgekürzt.

<i>Organismus</i>	<i>Reaktorsystem</i>	<i>Gaszusammensetzung (v/v, %)</i>	<i>Produktkonzentrationen</i>	<i>Referenz</i>
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	HFMR	Syngas (CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂)	8 g L ⁻¹ Ethanol 6 g L ⁻¹ n-Propanol 1 g L ⁻¹ n-Butanol	Liu et al. (2014)
<i>Acetobacterium BR-446</i>	HFMR	CO ₂ /H ₂	2,9 g L ⁻¹ Acetat	Morinaga et al. (1990)
<i>Acetobacterium woodii</i>	STR	CO ₂ /H ₂	44,0 g L ⁻¹ Acetat	Demler et al. (2011)
<i>Acetobacterium woodii</i>	CSTR	CO ₂ /H ₂ (20:80)	0,008 g L ⁻¹ Acetat	Peters (1998)
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	STR	CO/CO ₂ (70:30)	1,3 g L ⁻¹ Acetat	Heiskanen et al. (2007)
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	STR	CO	6,0 g L ⁻¹ Ethanol 0,0001 g L ⁻¹ Acetat	Worden et al. (1989)
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	CSTR	CO	3,9 g L ⁻¹ Acetat 0,5 g L ⁻¹ Butyrat	Grethlein et al. (1990)
<i>Clostridium aceticum</i>	STR	CO/H ₂ /Ar (78:4:18)	2,3 g L ⁻¹ Acetat	Sim et al. (2007)

<i>Organismus</i>	<i>Reaktorsystem</i>	<i>Gaszusammensetzung (v/v, %)</i>	<i>Produktkonzentrationen</i>	<i>Referenz</i>
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	STR	CO/CO ₂ (95:5)	0,3 g L ⁻¹ Ethanol	Guo et al. (2010)
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	Blasensäulen- reaktor	CO/H ₂ /CO ₂ /CH ₄ /N ₂ (14.7:4.4:16.5:4.2:56.8)	2,8 g L ⁻¹ Ethanol *	Datar et al. (2004)
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	Biofilm- Membranreaktor	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	23,9 g L ⁻¹ Ethanol	Shen et al. (2014)
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Rieselbettreaktor	CO/H ₂ /N ₂ (50:40:10)	2,7 g L ⁻¹ Ethanol 6,4 g L ⁻¹ Acetat	Gaddy (2000)
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	CSTR	CO/H ₂ /CO ₂ /Ar (55:20:10:15)	6,5 g L ⁻¹ Ethanol 5,4 g L ⁻¹ Acetat	Mohammadi et al. (2012)
<i>Clostridium ragsdalei</i>	STR	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	1,9 g L ⁻¹ Ethanol 1,5 g L ⁻¹ Acetat	Kundiyana et al. (2011)
<i>Clostridium ragsdalei</i>	STR	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	6,1 g L ⁻¹ Ethanol 1,5 g L ⁻¹ Acetat	Maddipati et al. (2011)
<i>Clostridium ragsdalei</i>	CSTR	CO/H ₂ /CO ₂ /N ₂ (20:5:15:60)	25,3 g L ⁻¹ Ethanol	Kundiyana et al. (2010)
<i>Eubacterium limosum</i>	STR	CO/CO ₂ (80:20)	0,05 g L ⁻¹ Acetat	Chang et al. (1999)

* aus den Literaturdaten abgeleiteter Wert

3.2.3 Rieselbettreaktoren

Rieselbettreaktoren (engl. *trickle bed reactor*, TBR) sind Festbettreaktoren bei denen die Gasphase die kontinuierliche Phase darstellt. Sie bestehen aus Säulen, die mit Partikeln oder Trägern, auf denen der zu kultivierende Mikroorganismus fixiert ist, gefüllt sind. Während der Gasfermentation wird das Reaktionsmedium möglichst gleichmäßig auf der Festbettoberfläche verteilt und rinnt entlang der Partikel nach unten (Doran 1995). Je nach Anwendung wird das Festbett von unten, also gegen den Flüssigkeitsstrom, oder von oben mit dem Flüssigkeitsstrom begast (Munasinghe et al. 2010a). Da die Flüssigphase als dünner Film die Trägerpartikel überströmt, kann die kontinuierliche Gasphase die Packung leicht durchdringen (Doran 1995). Im Vergleich zum herkömmlichen Rührkesselreaktor sowie zum Blasensäulenreaktor konnten für den Rieselbettreaktor deutlich höhere Stoffübergangsraten gas-flüssig ermittelt werden (Klasson et al. 1990; Orgill et al. 2013). Rieselbettreaktoren eignen sich aufgrund des geringeren Energieverbrauchs sehr gut für die Gasfermentation (Bredwell et al. 1999). Dennoch sind für Bioprozesse mit Rieselbettreaktoren Nachteile, wie die inhomogene Überströmung der Trägerpartikel, das Verstopfen der Hohlräume durch zunehmende Biotrockenmasseakkumulation oder das Ablösen von Biofilmen und damit das Auswaschen von Mikroorganismen zu berücksichtigen (Chmiel 2011).

Bislang wurde die Gasfermentation mit *C. ljungdahlii* im 144 L-Rieselbettreaktor berichtet, bei der Zelldichten von $13,6 \text{ g L}^{-1}$ erreicht und $2,7 \text{ g L}^{-1}$ Ethanol und $6,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet wurden (Gaddy 2000).

3.2.4 Membranverfahren

Weitere Reaktoren, die sich für die Gasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen eignen, sind Membranbioreaktoren zur Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Flüssigphase. Hierfür kommen Mikrofiltrationsmembranen zum Einsatz, welche üblicherweise in extern installierten Membranmodulen im Bypass zum Bioreaktor mittels Querstromfiltration eingesetzt werden. Diese ermöglichen aufgrund der frei einstellbaren Überströmung der Membranoberfläche über längere Prozesszeiten einen stabilen Betrieb bei minimierter Deckschichtbildung (Fouling), sind leicht austauschbar und bieten kurze Kontaktzeiten der Mikroorganismen mit dem Membranmaterial. Standardmäßig wird die Zellsuspension, um die Zellen vom Medium zu trennen, über ein entsprechendes Membranmodul (siehe Abbildung 3.5 A) aus dem Reaktor gepumpt. Das Retentat, die

aufkonzentrierte Zellsuspension, wird in den Rührkesselreaktor zurückgeleitet, wohingegen das Permeat, das abgetrennte Medium mit den gebildeten Produkten, in einem sterilen Behältnis gesammelt wird.

Durch die kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung konnten beispielsweise Gasfermentationen mit *Alkalibaculum bacchi* erfolgreich durchgeführt werden. Hierzu wurde im Bypass zu einem 7 L-Rührkesselreaktor eine Kartusche mit Hohlfasermembranen (Porengröße 0,2 μm) installiert. Nach einer anfänglichen Satzphase wurde mit dem Erreichen der exponentiellen Phase und einer Biotrockenmassekonzentration von 0,2 g L^{-1} die kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung und einer Durchflussrate von 0,011 h^{-1} gestartet. Nach schrittweiser Erhöhung der Durchflussrate auf 0,033 h^{-1} konnte nach 24 d eine Biotrockenmassekonzentration von 5,5 g L^{-1} und eine Acetatkonzentration von 5 g L^{-1} ermittelt werden (Liu et al. 2014).

Neben den hohen Überströmungsgeschwindigkeiten und der Einhaltung der Sterilität bei der Prozessintegration des Membranmoduls müssen Einschränkungen bei der Prozesskontrolle innerhalb des Membranmoduls, wie beispielsweise die unterbrochene Versorgung der Zelle mit den gasförmigen Substraten bei Gasfermentationen berücksichtigt werden. Für Prozesse mit acetogenen Mikroorganismen müssen zudem anaerobe Bedingungen auch im Membranmodul eingehalten werden (Munasinghe et al. 2011).

Bei einem alternativen Ansatz werden die gasförmigen Substrate kontinuierlich durch das Lumen der hydrophoben Hohlfasermembranen geleitet, wobei die Mikroorganismen, die das Synthesegas zu Ethanol oder Acetat umsetzen, auf der Außenseite der Fasern in einem Biofilm wachsen (Munasinghe et al. 2010b). Gasfermentationen im Biofilmreaktor wurden bereits mit *Clostridium carboxidivorans* durchgeführt. In einem Rührkesselreaktor mit 8 Liter Arbeitsvolumen wurde der Mikroorganismus zunächst für 48 h im Satzbetrieb unter kontinuierlicher Begasung kultiviert, ehe die Zellsuspension über das im Bypass zum Bioreaktor befindliche und ebenfalls mit Synthesegas begaste Hohlfasermembranmodul (Porengröße 0,04 μm) gefördert wurde. Nach Ausbildung des Biofilms auf den Hohlfasermembranen wurden die Zellen zudem durch die Zuführung von frischem Reaktionsmedium bei weiterhin anhaltender kontinuierlicher Begasung im Hohlfasermembranmodul mit Nährstoffen versorgt. So konnte bei einem Gasvolumenstrom von 200 mL min^{-1} und einem Flüssigkeitsvolumenstrom (Zuführung des frischen Reaktionsmediums) von ebenfalls 200 mL min^{-1} eine Ethanolkonzentration von 23,9 g L^{-1} in 7 Tagen ermittelt werden (Shen et al. 2014).

Wie bei allen Biofilmreaktoren ist die metabolische Aktivität der Bakterienzellen durch die Diffusion der gasförmigen Substrate in den Biofilm begrenzt. Im Biofilmreaktor mit Hohlfasern ist folglich die gesamte aktive Biomasse eine Funktion der Dicke des Biofilms und der (teuren) Membranfläche.

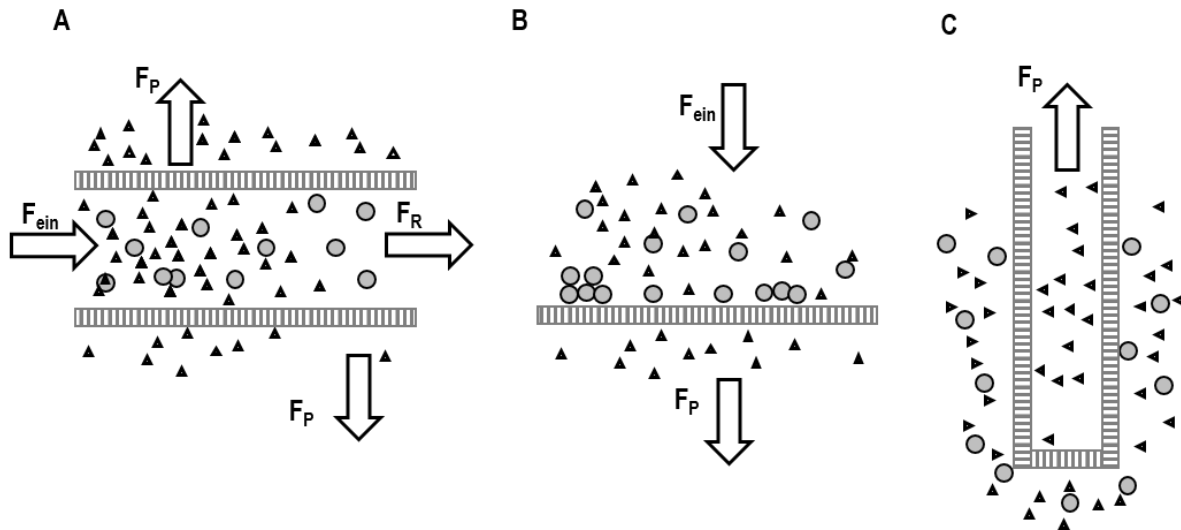


Abbildung 3.5: Darstellung unterschiedlicher Filtrations-Modi: A) Querstromfiltration in einer Hohlfaser. Die im Eingangsvolumenstrom (F_{ein}) enthaltenen Zellen (\circ) können die Membran nicht überwinden und verbleiben im Retentat (F_R). Niedermolekulare Substanzen (\blacktriangle) passieren die Membran und werden über das Permeat (F_P) ausgetragen. B) Klassische „dead-end-Filtration“, bei der eine Kuchenbildung auf der Filtrationsmembran stattfindet. C) Schema der submersen Hohlfasermembran im Bioreaktor. Das Permeat F_P wird hier im „quasi-Dead-End-Modus“ über eine externe Pumpe abgezogen. Kuchenbildung wird durch turbulentes Umströmen der Hohlfaser verhindert. Abgeändert nach Vogel et al. (1997).

Neben den häufig eingesetzten externen Membranmodulen können auch im Reaktorinneren installierte Membranen eingesetzt werden. Da bei diesem Verfahren das Membranmodul vollständig in die Zellsuspension eintaucht und umspült wird, werden diese als submerse Membranbioreaktoren (SMBR) bezeichnet. Im Gegensatz zu den extern installierten Membranmodulen können submerse Membranen jedoch nicht mehr im Querstromverfahren betrieben werden. Vielmehr werden diese in einem „quasi-Dead-End-Modus“ eingesetzt (siehe Abbildung 3.5 C). Im Vergleich zu Membransystemen in einem externen Kreislauf können getauchte Hohlfasermembranen *in-situ* sterilisiert, unter konstant bleibenden Betriebsbedingungen (pH, Temperatur, anaerobe Bedingungen) und bei geringem Energieverbrauch betrieben werden (Carstensen et al. 2012). Allerdings tritt Biofouling aufgrund der Strömungsführung und der niedrigeren Scherraten im Vergleich zu externen

Membranmodulen häufiger auf. Um dies zu verhindern müssen die Hohlfasermembranen entweder regelmäßig rückgespült oder durch Anordnung im Reaktor bei ausreichend turbulente Umströmung ein ständiger Abtrag des Filterkuchens gewährleistet werden. Vor allem bei Bioprocessen mit niedrigen Zellkonzentrationen und geringer Biofilmbildungstendenz handelt es sich bei diesem Bioreaktorsystem dennoch um ein prinzipiell geeignetes Verfahren (Carstensen et al. 2012; Chmiel 2011). In der Literatur wurde bislang noch nicht über den Einsatz von getauchten Hohlfasermembranmodulen bei der Gasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen berichtet. Die Nutzung dieses Reaktorsystems für Bioprosesse mit sauerstoffsensitiven, acetogenen Mikroorganismen stellt somit ein vielversprechendes Verfahren dar.

3.3 Bioprozesstechnische Grundlagen

In diesem Abschnitt wird allgemein auf den idealen Rührkesselreaktor, das Wachstum und die Produktbildung von Mikroorganismen sowie das Satzverfahren und die kontinuierliche Prozessführung mit und ohne Zellrückhaltung im idealen Rührkesselreaktor eingegangen.

3.3.1 Bilanzierung des idealen Rührkesselreaktors

Chmiel (2011) definiert einen Bioreaktor als „einen abgegrenzten Raum bzw. Apparat [...], in dem in Anwesenheit und unter Mitwirkung eines Biokatalysators eine Stoffumwandlung stattfindet“. Klassische Bioreaktoren sind die sogenannten Rührkesselreaktoren (STR) mit Scheibenrührern (siehe Abbildung 3.6), zu deren Aufgaben vor allem die gute Durchmischung (Homogenisierung) des gesamten Reaktionsraumes, das Suspendieren von Feststoffen (Zellen) sowie das Dispergieren von Gasen zählt (Chmiel 2011). Zudem muss in Bioreaktoren die Temperatur geregelt und eine Sterilbarriere aufrechterhalten werden.

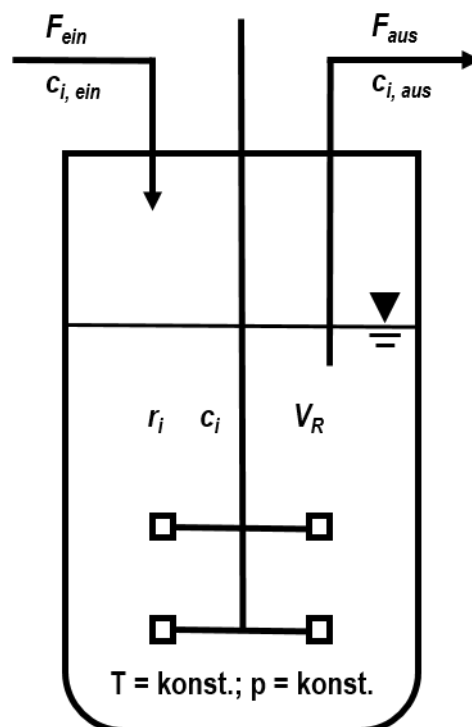


Abbildung 3.6: Ein Rührkesselreaktor mit idealer Rückvermischung unter isothermen ($T = \text{konst.}$) und isobaren ($p = \text{konst.}$) Bedingungen. Im kontinuierlichen Betrieb bei dem der Zulaufvolumenstrom F_{ein} dem Ablaufvolumenstrom F_{aus} entspricht, kann von einem konstanten Reaktorvolumen V_R ausgegangen werden. c_i , $c_{i,\text{ein}}$ und $c_{i,\text{aus}}$ sind die Konzentrationen der Komponente i im Reaktor, im Zulauf- und im Ablaufvolumenstrom. r_i ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i .

Für einen idealen Rührkesselreaktor unter der Annahme einer idealen Rückvermischung sowie isothermer ($T = \text{konst.}$) und isobarer ($p = \text{konst.}$) Bedingungen und volumenbeständiger, singularer Reaktionen ergibt sich folgende Stoffbilanzgleichung (Chmiel 2011):

$$\frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V \quad 3.4$$

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

3.3.2 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Die mathematische Betrachtung von Zellen im Bioreaktor erfolgt am häufigsten und einfachsten mit unstrukturierten und unsegregierten Modellen. Dies bedeutet, dass keine unterscheidbaren Komponenten in den zellulären Systemen und keine Subpopulationen vorliegen, sondern die Zellen als eine Komponente und die Zelleigenschaften als Mittelwert gesehen werden (Chmiel 2011). Dadurch können einige wichtige Parameter für das Zellwachstum und die Prozessführung einfach definiert werden.

Die Wachstumsrate r_X ist einer der wichtigsten Parameter und beschreibt die Veränderung der Biomasse c_X über die Zeit t . Unter nicht-limitierenden Bedingungen ist die Wachstumsrate proportional zur Biomasse c_X und kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 3.5$$

r_X	Wachstumsrate, $g L^{-1} h^{-1}$
c_X	Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
t	Zeit, h
μ	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Die spezifische Wachstumsrate μ ist damit definiert als:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad 3.6$$

In einem definierten Medium ist das Wachstum von einer Komponente, üblicherweise der Kohlenstoffquelle, begrenzt. Monod (1949) beschrieb einen formalen Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und dem wachstumslimitierenden Substrat c_S in Form einer Sättigungsfunktion.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad 3.7$$

μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
c_S	Substratkonzentration, $g L^{-1}$
K_S	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, $g L^{-1}$

Die maximale Wachstumsrate μ_{max} wird theoretisch erreicht, wenn c_S sehr viel größer ist als K_S . Die Sättigungskonstante K_S entspricht der Substratkonzentration, bei der die spezifische Wachstumsrate halb so groß ist wie die maximale Wachstumsrate μ_{max} .

Analog zur Wachstumsrate werden auch die Produktbildungsraten (r_P , q_P) sowie die Substrataufnahmeraten (r_S , q_S) definiert. Dabei sind r_i (in $g L^{-1} h^{-1}$) die volumetrischen und q_i (in $g g^{-1} h^{-1}$) die zellspezifischen Raten.

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = q_S \cdot c_X \quad 3.8$$

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = q_P \cdot c_X \quad 3.9$$

r_S	volumetrische Substrataufnahmerate, $g L^{-1} h^{-1}$
q_S	zellspezifische Substrataufnahmerate, $g g^{-1} L^{-1}$
r_P	volumetrische Produktbildungsrate, $g L^{-1} h^{-1}$
q_P	zellspezifische Produktbildungsrate, $g g^{-1} L^{-1}$
c_P	Produktkonzentration, $g L^{-1}$

Die Substratkonzentration c_S aus dem empirischen Monod-Modell lässt sich mit der Biomasse c_X über den Ausbeutekoeffizienten beziehungsweise die Biomasseausbeute $Y_{X/S}$ verknüpfen. Die Biomasseausbeute ist die gebildete Biomasse pro verbrauchtem Substrat und kann auch als Selektivität bezeichnet werden kann (Chmiel, 2011).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{gebildete Biomasse}}{\text{verbrauchtes Substrat}} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad 3.10$$

$Y_{X/S}$ Biomasseausbeute, $g \ g^{-1}$

Damit werden über $Y_{X/S}$ die Wachstumsrate μ und die Substrataufnahmerate q_S zueinander in Beziehung gesetzt:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad 3.11$$

Dies gilt jedoch nur, wenn ausschließlich Wachstum stattfindet. Die Gleichung 3.11 kann um die Substrataufnahme für die Produktbildung $q_{S,P}$ erweitert werden:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + q_{S,P} \quad 3.12$$

$q_{S,P}$ Substrataufnahme für die Produktbildung, $g \ g^{-1} \ h^{-1}$

Werden Produkte mit vergleichsweise geringer Wertschöpfung bei gleichzeitig teurem Substrat hergestellt, ist die Produktausbeute wesentlich für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Die Produktausbeute $Y_{P/S}$ ist die Masse an gebildetem Produkt pro verbrauchtem Substrat und wird wie die Biomasseausbeute in $g \ g^{-1}$ angegeben:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{gebildetes Produkt}}{\text{verbrauchtes Substrat}} = \frac{q_P}{q_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{dc_P}{dc_S} \quad 3.13$$

$Y_{P/S}$ Produktausbeute, $g \ g^{-1}$

3.3.3 Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor

Beim Satzverfahren handelt es sich in Bezug auf die Flüssigphase um ein geschlossenes System. Bei Kultivierungen im Satzverfahren kann das Volumen des Mediums nach der Inokulation mit einer definierten Menge an Mikroorganismen als konstant angenommen werden, wobei alle für das Zellwachstum benötigten Nährstoffe von Beginn an im Medium vorhanden sein müssen. Wenn während der Kultivierung nur verhältnismäßig geringe Mengen an Korrekturmittel zur pH-Kontrolle oder Schaumzerstörer zur Entschäumung dem Medium zugegeben werden müssen, kann ihr Einfluss auf das Reaktionsvolumen vernachlässigt werden. Damit kann näherungsweise von einem ebenfalls konstanten Reaktionsvolumen im idealen Rührkesselreaktor ausgegangen werden. Unter Berücksichtigung dieser Annahmen kann Gleichung 3.4 entsprechend vereinfacht werden:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad 3.14$$

Aus der Messung der Konzentrationszunahme oder -abnahme jeder Komponente i lässt sich somit die Umsetzungsgeschwindigkeit dieser Komponente als Funktion der Prozesszeit im Reaktor bestimmen. Substrataufnahmeraten oder Produktbildungsraten r_i hängen dabei vor allem von den Zellen, dem Substrat und Reaktionsbedingungen wie beispielsweise dem pH ab.

Beim Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren ohne limitierende oder inhibierende Einflüsse wird bei halblogarithmische Auftragung der Zellzahl über der Prozesszeit, die unter Abbildung 3.7 dargestellte Wachstumskurve beobachtet (Monod 1949).

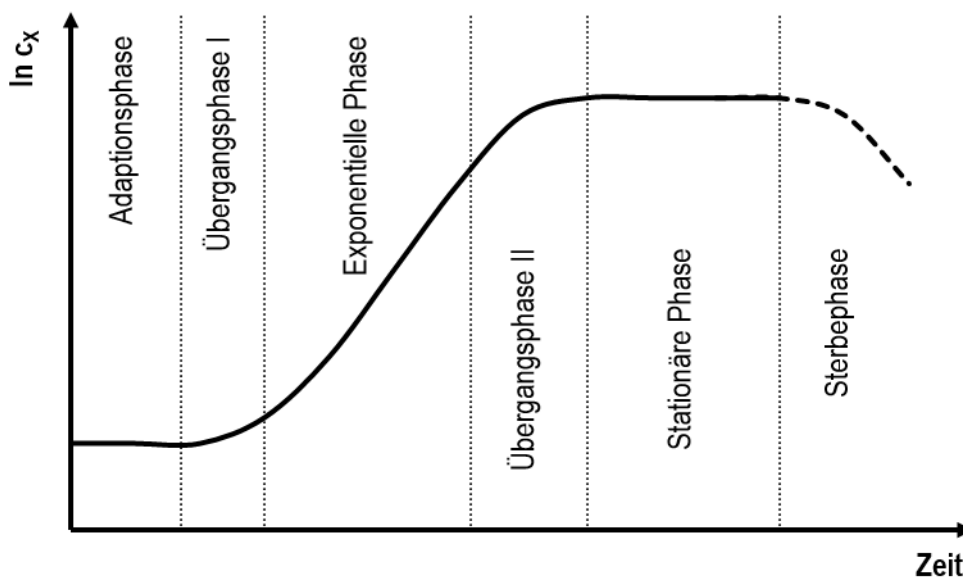


Abbildung 3.7: Typische Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren. c_x entspricht hier der gebildeten Biotrockenmassekonzentration.

In der ersten Phase, der Adaptionsphase, passen sich die Zellen an die Reaktionsbedingungen an. Danach beginnt in einer Übergangsphase ein erstes Wachstum, gefolgt von dem sogenannten exponentiellen Wachstum, in der die Zellen sich im unlimitierten Wachstum befinden und sich eine konstante Wachstumsrate (μ_{\max}) einstellt (siehe Gleichung 3.6). Nach dem Monod-Modell ist die Wachstumsrate μ maximal, wenn c_s sehr viel größer ist als K_s (Monod 1949). Die Wachstumsrate ist somit im unlimitierten Satzwachstum über einen langen Zeitraum näherungsweise konstant.

Durch Integration von Gleichung 3.5 erhält man damit für das exponentielle Wachstum:

$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad 3.15$$

$c_{X,0}$ Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase, $g L^{-1}$

Die Verringerung der Wachstumsrate und damit das Ende der exponentiellen Wachstumsphase können durch eine Limitierung eines oder mehrerer Substrate bedingt sein, was im Monod-Modell (siehe Gleichung 3.7) beschrieben wird. c_S ist dann nicht mehr viel größer als K_S . Es beginnt die stationäre Phase, in der die Wachstums- und Absterberate gleich sind und die Biomassekonzentration konstant bleibt. Schließlich überwiegt in der letzten Phase das Absterben der Zellen (Lyse) und die Biomassekonzentration sinkt.

3.3.4 Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor

Der kontinuierliche Betrieb eines Rührkesselreaktors ist durch einen kontinuierlichen Zulauf an Reaktionskomponenten, sowie durch einen kontinuierlichen Ablauf des Reaktionsmediums einschließlich der Zellen gekennzeichnet. Ein Auswaschen der Zellen aus dem Reaktor findet dann statt, wenn über den Ablauf mehr Zellen ausgetragen als im Rührkesselreaktor durch Wachstum neu gebildet werden. Geht man bei diesem offenen System von einer idealen Durchmischung aus, so besitzen jedes Flüssigkeitselement im Rührkesselreaktor sowie der Ablaufstrom die gleiche Zusammensetzung. Wird der Volumenstrom des Zu- und des Ablaufs gleich groß eingestellt ($F_{ein} = F_{aus} = F$), so stellt sich für eine Komponente i im idealen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor nach einer gewissen Zeit ein Fließgleichgewicht ein. Das bedeutet, alle Konzentrationen und alle Stoffflüsse bleiben gleich. Damit vereinfacht sich Gleichung 3.4 zu:

$$\frac{d(c_i V)}{dt} = 0 = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V \quad 3.16$$

Bei einem konstantem Volumen ist $F = F_{ein} = F_{aus}$. Zudem wird die Durchflussrate D definiert als:

$$D = \frac{F}{V} \quad 3.17$$

D Durchflussrate, h^{-1}

Der Kehrwert der Durchflussrate im kontinuierlichen Betrieb ist als mittlere hydraulische Verweilzeit definiert (siehe Gleichung 3.18) und gibt die Zeitdauer für Zu- und Abfuhr einer dem Reaktionsvolumen entsprechenden Menge Medium an.

$$\tau = \frac{V}{F} = \frac{1}{D} \quad 3.18$$

τ mittlere hydrodynamische Verweilzeit, h

Gleichung 3.16 lässt sich damit vereinfachen zu:

$$r_i = D \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) \quad 3.19$$

Unter der meist gültigen Annahme, dass das Zulaufmedium steril ist und damit $c_{X,ein}$ gleich 0 ist, ergibt sich für die volumetrische Biomassebildung:

$$r_X = D \cdot c_X \quad 3.20$$

Weiterhin ergibt sich aus Gleichung 3.20 und Gleichung 3.5

$$\mu = D \quad 3.21$$

Die kontinuierliche Prozessführung bietet folglich den Vorteil, dass die Wachstumsrate durch die eingestellte Durchflussrate vorgegeben werden kann.

Des Weiteren lassen sich die volumetrische Substrataufnahmerate r_S und die volumetrische Produktbildungsrate r_P aus Gleichung 3.19 bestimmen, wobei $c_{P,ein}$ gleich null ist da dem idealen Rührkesselreaktor kein Produkt zugeführt wird:

$$r_S = D \cdot (c_{S,aus} - c_{S,ein}) \quad 3.22$$

$$r_P = D \cdot c_{P,aus} \quad 3.23$$

Aufgrund der organismus- und prozessabhängigen maximalen Wachstumsrate μ_{max} kann die Durchflussrate nur soweit erhöht werden, bis die Substratkonzentration einen maximalen Wert ($c_S = c_{S,ein}$) annimmt. Dieser Grenzfall tritt ein, wenn sich keine Mikroorganismen mehr im Bioreaktor befinden (kritische Durchflussrate D_c).

Dieser Zusammenhang zwischen der Biomassekonzentration und der Durchflussrate ist qualitativ in Abbildung 3.8 dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung die Änderung der volumetrischen Biomassebildungsrate (r_X) über die Prozesszeit, die für kontinuierliche Prozesse über Gleichung 3.24 berechnet werden kann:

$$r_X = D \cdot c_X \quad 3.24$$

r_X volumetrischen Biomassebildungsrate, $g L^{-1} h^{-1}$

Die volumetrische Biomassebildungsrate nimmt folglich mit steigender Durchflussrate zu, da die Zellen im Bioreaktor mit ausreichend Nährstoffen versorgt und somit eine höhere Produktbildungs- und Wachstumsrate erreicht werden. Die volumetrische

Biomassebildungsrate erreicht ein Maximum wenn die optimale Durchflussrate erreicht ist. Bei einer weiteren Erhöhung der Durchflussrate nimmt die volumetrische Biomassebildungsrate ab, weil mehr Zellen aus dem Bioreaktor ausgetragen als Neue gebildet werden.

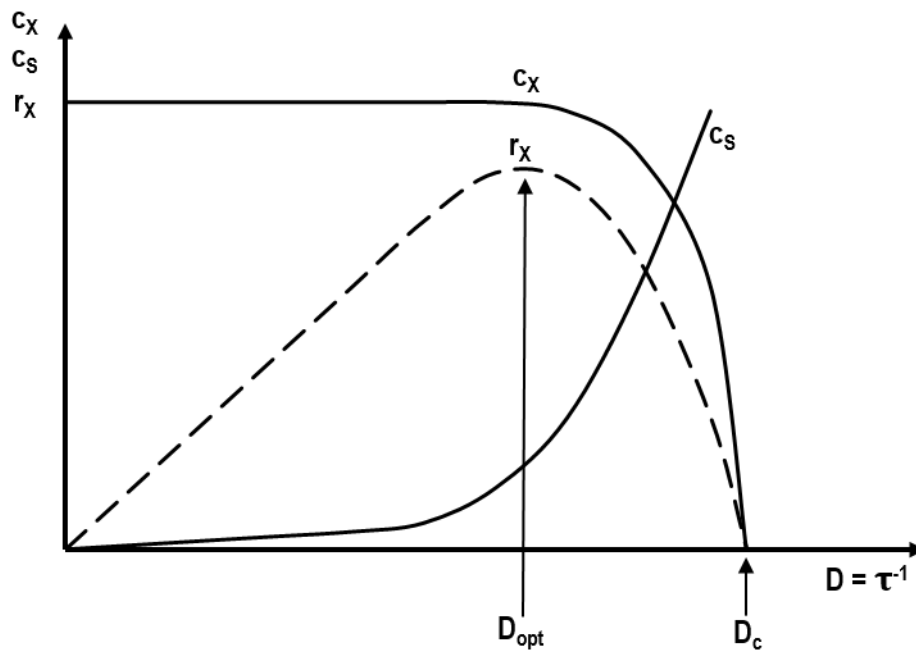


Abbildung 3.8: Qualitatives X-D-Diagramm, abgeändert nach Chmiel (2011). Dargestellt sind die Verläufe der Biomassekonzentration (c_X), der Substratkonzentration (c_S) sowie die volumetrischen Biomassebildungsrate (r_X) als Funktion der Durchflussrate (D). Gekennzeichnet sind zudem die optimale Durchflussrate D_{opt} sowie die kritische Durchflussrate D_c .

Ein Betrieb nahe der kritischen Durchflussrate ist mit einer kontinuierlichen Prozessführung nicht möglich, da bereits kleine Änderungen der Durchflussrate zu massiven Veränderungen der Zustandsgrößen führen. Für diesen Bereich müsste die Durchflussrate über eine Online-Messung eines vorgegebenen Parameters, wie beispielsweise der Trübung des Reaktionsmediums oder der Konzentration des limitierenden Substrats, geregelt werden um ein Auswaschen zu vermeiden.

3.3.5 Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor mit Zellrückhaltung

Bei der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung liegen die zu erwartenden Biomassekonzentrationen immer unterhalb der Maximalkonzentration des Satzbetriebs (Antranikian 2006; Sahm et al. 2013). Kontinuierliche Prozesse mit Zellrückhaltung (Verweilzeitentkopplung von Medium und Zellen) ermöglichen höhere Biomassekonzentrationen im kontinuierlichen Betrieb. Üblicherweise werden extern installierte Membranmodule im Bypass zum Bioreaktor zur Querstromfiltration eingesetzt (siehe Abbildung 3.9). Hierfür wird die Zellsuspension über ein entsprechendes Membranmodul aus dem Reaktor gepumpt. Das Retentat (F_R), die aufkonzentrierte Zellsuspension, wird in den Rührkesselreaktor zurückgeleitet, wohingegen das Permeat (F_P), das abgetrennte Medium mit den gebildeten Produkten, in einem separaten sterilen Behältnis gesammelt wird.

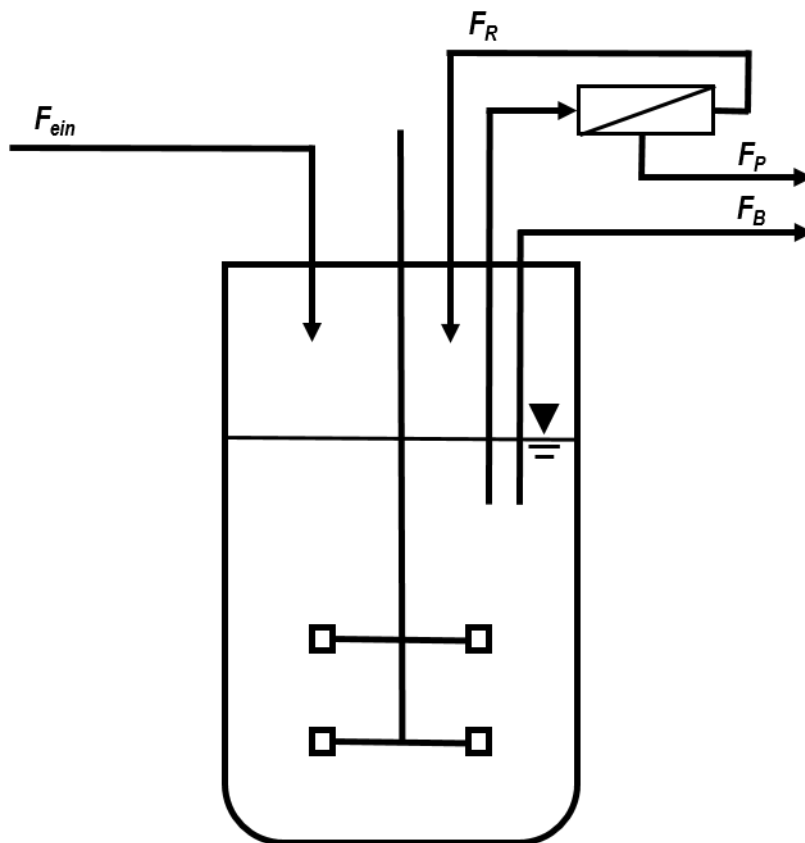


Abbildung 3.9: Kontinuierliche Prozessführung im idealen Rührkesselreaktor mit totaler Zellrückhaltung im Bypass zum Bioreaktor. Im kontinuierlichen Betrieb entspricht der Zulaufvolumenstrom F_{ein} der Summe aus Biomasseablaufstrom F_B und Permeatablaufstrom F_P . Das Retentat F_R , die aufkonzentrierte Zellsuspension, wird in den Rührkesselreaktor zurückgeleitet.

Durch die Rückhaltung der Zellen im idealen Rührkesselreaktor findet eine Entkopplung der Wachstumsrate von der Durchflussrate statt. Hierdurch sind höhere Durchflussraten als bei der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung realisierbar, ohne dass die Gefahr eines Auswaschens der Zellen aus dem idealen Rührkesselreaktor besteht. Meist wird neben dem Permeat noch ein Biomasseablaufstrom (Bleedstrom, F_B) zur Einstellung der Biomassekonzentration im Reaktor entnommen. Es findet dann keine vollständige Zellrückhaltung statt und der Ablaufvolumenstrom setzt sich aus einem Biomasseablaufstrom F_B und dem Permeatablaufstrom F_P zusammen (Antranikian 2006; Chmiel 2011).

$$F_{aus} = F_B + F_P \quad 3.25$$

F_B Biomasseablaufstrom, $L h^{-1}$

F_P Permeatablaufstrom, $L h^{-1}$

Das Rücklauf- oder Rezirkulationsverhältnis (R) gibt an, wie hoch der Permeatablaufstrom im Vergleich zum Zulaufstrom eingestellt ist:

$$R = \frac{F_{P,aus}}{F_{ein}} \quad 3.26$$

$R = 0$ bedeutet, dass es sich um einen idealen kontinuierlichen Rührkesselreaktor ohne Zellrückhaltung handelt, $R = 1$ heißt totale Zellrückhaltung. Bei totaler Zellrückhaltung findet im System die höchste Akkumulation von Biomasse statt. Zu beachten ist jedoch, dass hier auch tote Zellen im Reaktor verbleiben, welche mit zunehmender Prozessdauer die eingesetzten Mikrofiltrationsmembranen durch Ablagerungen und Biofilmbildung verstopfen können (Doran 1995; Vogel et al. 1997).

3.3.6 Gas-Flüssig-Stofftransport in Bioreaktoren

Bei Gasfermentationen ist der Stoffübergang gasförmiger Substrate von der Gas- in die Flüssigphase von entscheidender Bedeutung. Für eine erfolgreiche autotrophe Kultivierung müssen die gasförmigen Substrate Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid eine Vielzahl an Transportwiderständen überwinden bevor sie von den Mikroorganismen verwendet werden können. Nachfolgend wird daher auf die einzelnen Transportschritte der Gasmoleküle vom Inneren der Gasblase bis hin zur intrazellulären Reaktion eingegangen. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 3.10 graphisch dargestellt. Zunächst erfolgt der Transfer vom Inneren der Gasblase in die Grenzfläche zwischen der Gasphase und der Flüssigkeitsphase. Nach der Durchdringung dieser Grenzschicht folgen die Diffusion durch den Flüssigkeitsfilm, der die Gasblase umgibt, und der Transport durch die Flüssigphase hin zur Bakterienzelle. Nachdem die Gasmoleküle durch den Flüssigkeitsfilm um die Bakterienzelle diffundiert sind und die Grenzfläche zwischen der Flüssigkeitsphase und der Zelle durchdrungen haben, müssen diese schließlich in die Zelle diffundieren ehe eine Umsetzung möglich ist.

Das Ausmaß der einzelnen Stofftransportwiderstände ist dabei abhängig von der Zusammensetzung und den rheologischen Eigenschaften der Flüssigkeit, der Durchmischung des Reaktors, der Größe der Gasblasen und der Größe der Zellen. Wenn die Bakterienzellen einzeln im Reaktor vorhanden sind und die Suspension gut durchmischt ist, besteht der Hauptwiderstand im Transfer der Gasmoleküle durch den Flüssigkeitsfilm, welcher die Gasblasen umgibt. Der Widerstand der Grenzfläche zwischen der Flüssigkeitsphase und der Bakterienzelle ist dadurch vernachlässigbar. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der Stofftransportvorgang an der Grenzschicht zwischen der Gasphase und der Flüssigkeitsphase, lässt sich durch drei verbreitete Modellvorstellungen beschreiben: die Zweifilmtheorie, das Penetrationsmodell und das Modell der Oberflächenerneuerung. Am häufigsten wird das Zweifilmmodell zur Beschreibung von Transportphänomenen an Grenzschichten verwendet und soll deswegen nachfolgend genauer betrachtet werden.

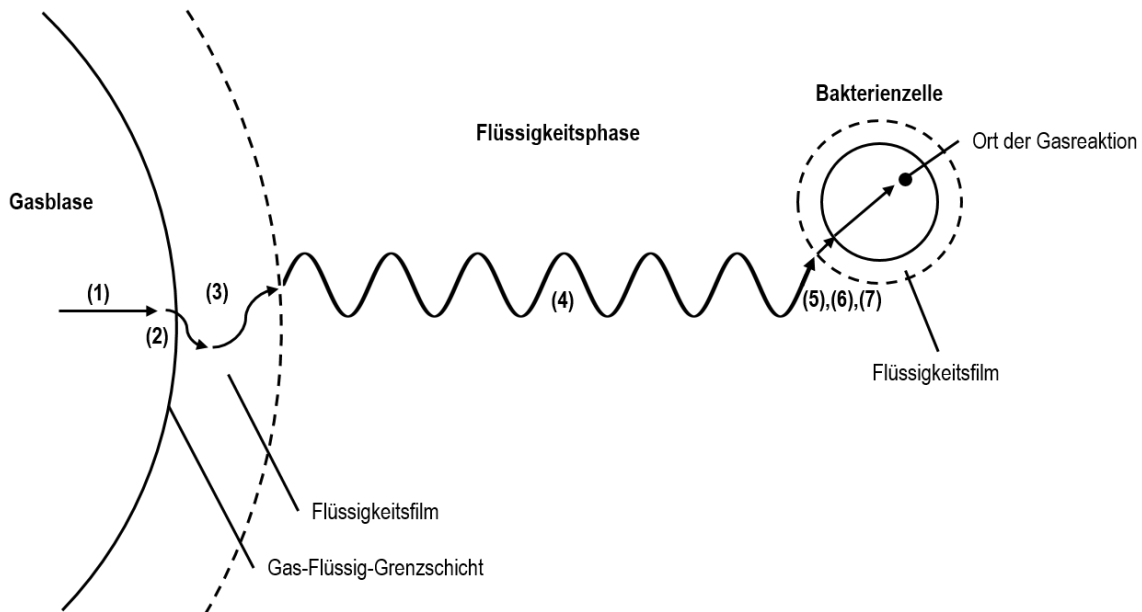


Abbildung 3.10: Transfer von Gasmolekülen aus der Gasblase durch die Flüssigkeit zur Bakterienzelle: (1) Transfer vom Kern der Gasblase zur Gas-Flüssig-Grenzschicht; (2) Stoffübergang an der Grenzschicht zwischen der Gas- und der Flüssigphase; (3) Diffusion durch den laminaren Flüssigfilm um die Gasblase; (4) konvektiver Transport durch das Flüssigkeitsgebiet; (5) Diffusion durch den laminaren Flüssigfilm um die Bakterienzelle; (6) Stoffübergang an der Grenzschicht zwischen der Flüssigphase und der Bakterienzelle; (7) Diffusion über die Zellmembran und intrazellulärer Transport (abgeändert nach Doran 1995).

Zur Beschreibung der Löslichkeit eines Gases in einem Bioreaktor wird der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient k_{La} herangezogen. Dieser ist ein Maß für die Effizienz des Gaseintrages beim Stofftransport von der Gas- in die Flüssigkeitsphase in einem Bioreaktor und hängt vor allem vom Leistungseintrag und der Leerrohrgeschwindigkeit der Gasphase ab. Im Rührkesselreaktor ist eine getrennte Ermittlung der beiden Größen k_L und a nur schwer möglich. Sie werden daher als volumetrischer Stoffübergangskoeffizient k_{La} zusammengefasst (Hass et al. 2011). Die Zweifilmtheorie besagt, dass die beiden Fluide an einer Phasengrenze laminare Filme mit Grenzschichten ausbilden, in denen der Stofftransport senkrecht zur Flussrichtung erfolgt. An der Phasengrenze wird ein thermodynamisches Gleichgewicht angenommen (c_g^*). Die Massentransferrate kann entsprechend Gleichung 3.27 berechnet werden.

$$MTR = k_L a \cdot (c_g^* - c_g) \quad 3.27$$

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

k_{La} volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient, h^{-1}

c_g^* Sättigungskonzentration im Medium, $g L^{-1}$

c_g Gelöstgaskonzentration in der Kernströmung im Medium, $g L^{-1}$

In Bezug auf die für diese Arbeit relevanten Gase, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, lassen sich die Transferraten folgendermaßen ermitteln:

$$HTR = k_L a \cdot (c_{H_2}^* - c_{H_2}) \quad 3.28$$

$$CTR = k_L a \cdot (c_{CO_2}^* - c_{CO_2}) \quad 3.29$$

3.3.7 Redoxpotential bei anaeroben Prozessen

Das Reduktions-Oxidationspotential (ROP) oder kürzer ausgedrückt das Redoxpotential ist vor allem für anaerobe Prozesse ein wichtiger Prozessparameter und gibt die "Aktivität der Elektronen" in einer Lösung an. Da es sich hierbei um eine elektrische Spannung handelt, wird es mit der Einheit Volt (V) angegeben. Allgemein lässt sich festhalten, dass das Redoxpotential umso niedriger ist je „aktiver“ die Elektronen in einer Lösung sind. Je bereitwilliger Elektronen von der Lösung aufgenommen werden, desto höher ist das Redoxpotential. Da Elektronen in wässrigen Lösungen allerdings nicht gelöst, sondern in Form von Molekülen vorliegen, ist dies eine abstrakte Betriebsweise. Beispielsweise hat eine Lösung mit Sauerstoffmolekülen ein hohes Redoxpotential, da Sauerstoff leicht Elektronen aufnimmt und somit reduziert wird. Wasserstoffmoleküle besitzen hingegen ein niedriges Redoxpotential, da Wasserstoff ein Elektronendonator ist (Zoski 2007).

Liegen zwei Lösungen mit unterschiedlichen Redoxpotentialen vor, so kann die Spannung zwischen diesen beiden Lösungen gemessen werden, wobei das gemessene Potential relativ zu einer Referenz angegeben wird. In der Elektrochemie geschieht dies meist in Relation zur Standardwasserstoffelektrode. Diese gibt das Redoxpotential in Bezug zu einer Lösung mit pH 0 und einer Ionenaktivität von 1 mol L^{-1} an, die außerdem im Gleichgewicht mit einer Gasphase aus Wasserstoff bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 25°C steht (Zoski 2007). Um das Redoxpotential eines Stoffes zu ermitteln, wird die Spannung zwischen der Referenz und einer wässrigen Lösung des Stoffes gemessen, wobei die oxidierte und reduzierte Form in gleicher Konzentration vorliegt. Da die wenigsten biochemischen Systeme bei pH 0 ablaufen, wird der Referenzelektrode in diesem Fall pH 7 zugrunde gelegt und das Redoxpotential mit $E^{0'}$ abgekürzt. Je nachdem welche Aktivität eine Substanz in Lösung besitzt, steigt oder sinkt das Redoxpotential. Dies kann mit der Nernst-Gleichung beschrieben werden:

$$E_h = E^{0'} + \frac{RT}{zF} \cdot \ln\left(\frac{a_{\Sigma Ox.,i}}{a_{\Sigma Red.,i}}\right) \quad 3.30$$

E_h	Redoxpotential, V
$E^{0'}$	biochemisches Standardpotential, V
R	universelle Gaskonstante, $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
T	Temperatur, K
$a_{\Sigma Ox./Red.,i}$	chemische Aktivität der oxidierten oder reduzierten Form, -

Die meisten Reaktionsmedien für Mikroorganismen bestehen aus einer Vielzahl von Substanzen, wie zum Beispiel Sauerstoff, Wasserstoff, Spurenelemente, Schwefelverbindungen, Nitrate aber auch Metabolite von Mikroorganismen, welche das Redoxpotential beeinflussen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es einige Verbindungen gibt, die das Redoxpotential der Zelle verändern, jedoch von der Elektrode nicht gemessen werden können oder umgekehrt. Wasserstoff wird beispielsweise von Mikroorganismen nur dann wahrgenommen, wenn Hydrogenasen zur Oxidation von Wasserstoff vorhanden sind (Jacob 1970).

Wird das Redoxpotential im Laufe einer Fermentation gemessen, ist in der Regel eine spezifische Veränderung des Redoxpotentials in Abhängigkeit des Mikroorganismus zu beobachten, die auf die Metabolisierung von redoxaktiven Substanzen im Medium und der Bildung von redoxaktiven Verbindungen zurückzuführen ist (Brasca et al. 2007; Hunting et al. 2013). Beispielsweise eliminieren Acetogene Reste an gelöstem Sauerstoff im Reaktionsmedium (Boga et al. 2003). Allgemein ist für anaerobe Mikroorganismen eine starke Senkung des Redoxpotentials zu Beginn der Kultivierung typisch, wobei das Wachstum erst dann einsetzt, wenn ein entsprechend niedriges Potential erreicht ist (Jacob 1970).

Da das Redoxpotential einen großen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle hat, wurde in verschiedenen Forschungsarbeiten versucht, das Redoxpotential zu kontrollieren. So wurde beispielsweise das Redoxpotential bei der Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* durch Begasung mit Luftsauerstoff und Einstellung der Rührerdrehzahl auf ein konstantes Redoxpotential zwischen -50 mV und -230 mV gegenüber Normalwasserstoff geregelt. Dadurch konnte die höchste Ethanolkonzentration, Biotrockenmassebildung und Zellviabilität bei einem Redoxpotential von -50 mV ermittelt werden (Liu et al. 2011; Yu et al. 2007).

Eine weitere Forschungsarbeit beschäftigte sich mit der Kontrolle des Redoxpotentials bei einer Fermentation von *Actinobacillus succinogenes* auf konstante Redoxpotentiale zwischen -100 mV und -450 mV gegenüber Normalwasserstoff mit Kaliumhexacyanoferrat, wobei das Produktspektrum und die Enzymaktivitäten des Organismus beeinflusst und die Produktivität der Bildung von Bernsteinsäure gesteigert werden konnten (Li et al. 2010).

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Steuerung der Solventogenese und Acidogenese von *Clostridium acetobutylicum* über das Redoxpotential. Durch die Regelung des Redoxpotentials mit Sauerstoff auf -290 mV gegenüber Normalwasserstoff konnte hier die Solventogenese früher gestartet und die Produktion der Lösungsmittel um 35% gesteigert werden (Wang et al. 2012).

4 Material und Methoden

4.1 *Acetobacterium woodii* Stämme

Die Durchführung der dargestellten Kultivierungen dieser Arbeit erfolgten hauptsächlich mit dem Wildtyp-Stamm *Acetobacterium woodii* DSM 1030, welcher von Prof. Dürre des Lehrstuhls für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt wurde.

Des Weiteren wurden die rekombinanten Stämme *A. woodii* pJIR750_THF und *A. woodii* pJIR750_pta-ack kultiviert, bei denen durch Überexpression ausgewählter Enzyme des Acetyl-CoA Stoffwechsels der Kohlenstofffluss verbessert und somit die Acetatbildung gesteigert werden sollte. Straub et al. (2014) inserierten hierfür entweder die Tetrahydrofolat (THF)-abhängigen Enzyme Formyl-THF-Synthetase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase, Methylen-THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase (pJIR750_THF) oder die Phosphotransacetylase (pta) und die Acetatkinase (ack) (pJIR750_pta-ack) jeweils aus *Clostridium ljungdahlii* in das Plasmid pJIR750 und transformierten diese Konstrukte in *A. woodii*. Als Selektionsmarker diente stets Thiamphenicol (siehe Tabelle 10.4 im Anhang).

4.2 Anaerobes Arbeiten

Bei Arbeiten mit strikt anaeroben Mikroorganismen wie *A. woodii* ist die Einhaltung der Arbeitstechniken von Hungate et al. (1973) unerlässlich um die Präsenz von Sauerstoff auf ein Minimum zu reduzieren, sowie erneutes Einbringen von Sauerstoff zu vermeiden. Als Arbeitsbereich mit sauerstoffarmer Atmosphäre diente eine Anaerobwerkbank (siehe Abbildung 4.1) mit einer Plane aus flexibler Polyvinylchlorid-Folie (Toepffer Laborsysteme GmbH, Göppingen), die stets mit einer definierten Mischung aus Stickstoff und höchstens 5% Wasserstoff (nachfolgend als Formiergas bezeichnet) befüllt wurde. Zwei Umwälzpumpen gewährleisteten dabei eine kontinuierliche Durchmischung der

Atmosphäre. Eindringender Sauerstoff reagierte an fest installierten Palladium-Katalysatoren mit Wasserstoff zu Wasser ab. Die dabei entstehende Luftfeuchte wurde durch Trockenmittel gebunden. Vorhandener Sauerstoff sowie Wasserstoff innerhalb der Anaerobwerkbank wurde kontinuierlich über ein Gasmessgerät im ppm Bereich überwacht. Zur Sicherstellung einer möglichst keimarmen Umgebung wurde eine HEPA-Filtereinheit verwendet (Speers et al. 2009). Damit Geräte sowie anaerobe Medien und auch Kulturen innerhalb der Anaerobwerkbank verwenden werden konnten, standen zwei Schleusen unterschiedlicher Größe zur Verfügung. Während eines regulären Schleusvorgangs wurde die sauerstoffhaltige Atmosphäre der Schleuse durch dreimaliges Evakuieren sowie anschließendes Befüllen mit Formiergas ausgetauscht. Danach waren die Materialien innerhalb der Anaerobwerkbank verwendbar.

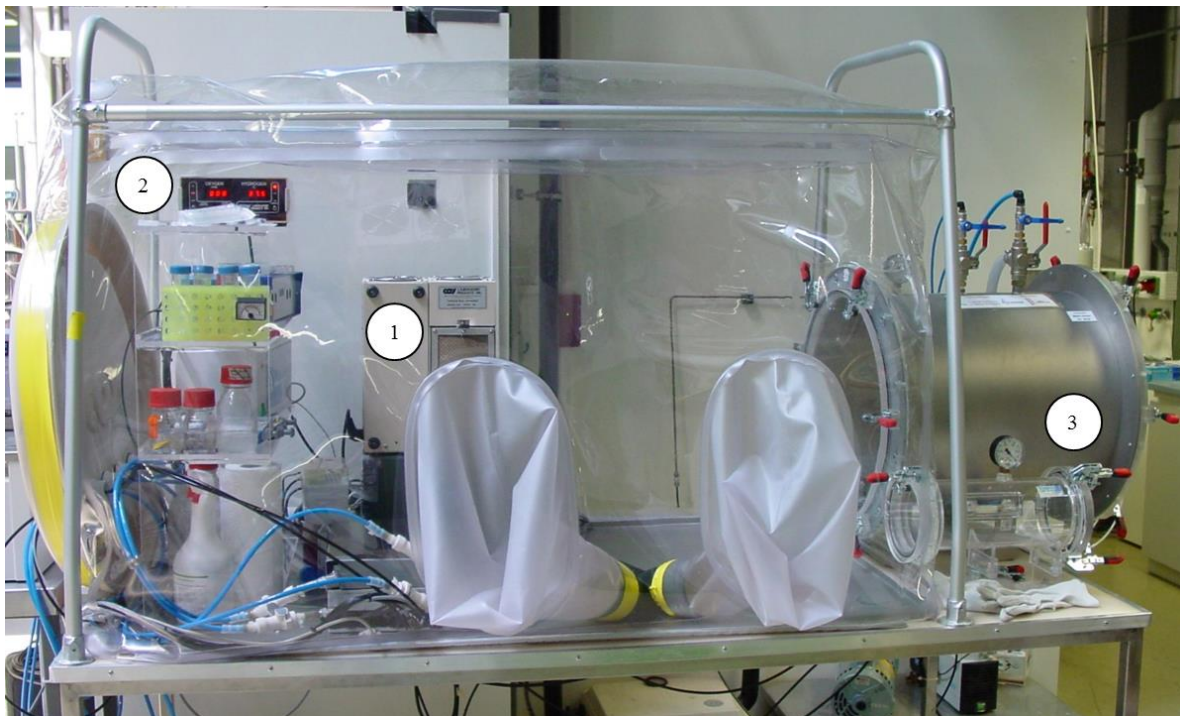


Abbildung 4.1: Anaerobwerkbank. (1) Gebläse mit integrierten Palladium-Katalysatoren sowie HEPA-Filtereinheit. (2) Wasserstoff-Analyzer. (3) Große und kleine Materialschleuse.

4.3 Medienherstellung und Zusammensetzung

Um für die Gasfermentation mit anaeroben Mikroorganismen sauerstoffarme Medien bereitzustellen, war ein Anaerobisieren vor ihrer Verwendung unerlässlich (Hungate et al. 1973; Speers et al. 2009). Hierfür wurden die einzelnen Medienbestandteile, falls nachfolgend nicht anders beschrieben, in VE-H₂O gelöst, für 20 min gekocht und während des Abkühlens im Eiswasserbad mit reinem Stickstoff begast. Das Medium wurde anschließend gasdicht verschlossen und ausschließlich unter sauerstoffarmer Atmosphäre innerhalb der Anaerobwerkbank geöffnet. Allgemein wurde für die Gasfermentation mit *A. woodii* das von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen empfohlene Medium DSMZ 135 (siehe Tabelle 4.1) verwendet und die Medienbestandteile Resazurin und Natriumsulfid nicht eingesetzt. Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) sowie Cystein-Hydrochlorid (Cys-HCl) wurden dem Reaktionsmedium stets nach dem Anaerobisieren innerhalb der Anaerobwerkbank zugegeben, wobei letzteres unter anderem zur Absenkung des Redoxpotentials diente (Fuchs et al. 2007). Vor Verwendung der hergestellten Medien wurden diese für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des Mediums DSMZ 135 für die Gasfermentation mit *A. woodii*.

Komponente	Konzentration	Einheit
NH ₄ Cl	1,00	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,33	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,45	g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,10	g L ⁻¹
Hefeextrakt	2,00	g L ⁻¹
Vitaminlösung	20,00	mL L ⁻¹
Spurenelementlösung	20,00	mL L ⁻¹
NaHCO ₃	10,00	g L ⁻¹
Cys-HCl	0,50	g L ⁻¹

Um für die Gasfermentationen ausreichend Biotrockenmasse zu generieren erfolgte die Vorkulturherstellung heterotroph durch Zugabe von 10 g L^{-1} D-Fructose.

Für Gasfermentationen im Rührkesselreaktor wurde die eingesetzte Konzentration an Hefeextrakt, Spurenelementen sowie Vitaminen verdoppelt und die eingesetzte Eisensulfat-Heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) Konzentration auf 5 mg L^{-1} erhöht um einer Limitierung durch diese Medienbestandteile entgegen zu wirken (Demler 2012). Die NaHCO_3 Konzentration wurde, wenn nicht anders angegeben, auf $4,2 \text{ g L}^{-1}$ reduziert.

4.4 Kultivierung von *Acetobacterium woodii*

4.4.1 Stammhaltung und Vorkulturherstellung

Sämtliche *A. woodii* Stämme wurden als Gefrierkultur bei -80 °C und unter Verwendung des Frostschutzmittels Saccharose gelagert. Die Herstellung von Gefrierkulturen erfolgte durch Zentrifugation einer exponentiell wachsenden Kultur und der Aufnahme des Zellpellets in $0,5 \text{ mL DSMZ Medium 135}$ sowie $0,5 \text{ mL Saccharose}$ (250 g L^{-1}).

Für jede Gasfermentation wurde eine neue Gefrierkultur aufgetaut und in $5 \text{ mL DSMZ 135 Medium}$ resuspendiert um anschließend eine Verdünnungsreihe (bis 1:1000) zu erstellen. Die weitere Vorkulturherstellung erfolgte, ausgehend von der letzten Verdünnungsstufe, durch mehrmaliges Überimpfen (10%) einer Kultur in der späten exponentiellen Wachstumsphase in immer größeren Reaktionsvolumina bei 30 °C im Brutschrank, um somit ausreichend Zellmaterial für die Gasfermentationen zu erhalten. Die Zellsuspension wurde für die Inokulation zunächst aufkonzentriert, indem die Kultur zentrifugiert (4500 rpm , 20 °C , 20 min) und der Überstand bis auf etwa 40 mL entfernt wurde. Nach erneutem Resuspendieren im restlichen Überstand und Überführen der konzentrierten Zellsuspension in $50 \text{ mL Reaktionsgefäße}$ erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4500 rpm , 20 °C , 10 min). Der Überstand wurde abschließend vollständig verworfen und das Zellpellet im gewünschten Volumen mit anaeroben PBS-Puffer (engl. *phosphate buffered system*) resuspendiert. Die Inokulation des jeweiligen Reaktionssystems erfolgte anaerob unter Verwendung von sterilen Einwegspritzen.

4.4.2 Autotrophe Kultivierung in Septumflaschen

Die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* in Septumflaschen erfolgte in beschichteten 500 mL Schottflaschen (Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel, Bovenden) und einem Füllvolumen von 200 mL Medium. Hierfür wurde das Standardmedium DSMZ 135 (siehe Kapitel 10.1) ohne die Verwendung von NaHCO_3 jedoch mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES, $10,0 \text{ g L}^{-1}$) eingesetzt. Die befüllten Reaktionsgefäße wurden mit Butylstopfen sowie Lochkappen für anaerobe Kultivierungen verschlossen und autoklaviert (20 min, $121 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend mit einer Gasmischung aus 16,7% Kohlenstoffdioxid und 83,3% Wasserstoff begast. Hierfür wurde der Kopfraum der Septumflasche zunächst gespült und dann ein Absolutdruck von 2,0 bar aufgebaut. Zur Einstellung des Gas-Flüssig-Gleichgewichts wurden die Ansätze wenigstens 4 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm inkubiert, wobei nach etwa 2 h der pH-Wert mit 5 M KOH auf pH 7 eingestellt wurde. Die Ansätze wurden abschließend auf einen Absolutdruck von 1,8 bar begast. Inokuliert wurden sie über sterile Einwegspritzen auf eine anfängliche Biotrockenmassekonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Während der Gasfermentation wurden die Reaktionsansätze bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen beprobt. Alle Gasfermentationen wurden mindestens in Zweifachansätzen durchgeführt.

4.4.3 Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor

Gasfermentationen im Satzverfahren wurden in einem Rührkesselreaktor (Gerätespezifikationen siehe Kapitel 10.2) mit einem Nominalvolumen von 2 L und einem Arbeitsvolumen von 1 L durchgeführt (siehe Abbildung 4.2). Dieser war ausgestattet mit einer pH- sowie Redoxsonde (Mettler Toledo, Gießen) und einem Temperaturfühler. Über eine Steuereinheit konnten die Parameter Temperatur, pH sowie Redoxpotential ausgelesen und gegebenenfalls geregelt werden. Zur Aufzeichnung der Parameter diente die Software Iris (Infors GmbH, Bottmingen, Schweiz). Die Temperaturregelung des Reaktorsystems erfolgte auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ mittels einem Doppelmantel. Das Redoxpotential wurde über eine Kombinationssonde aus einer Platin-Messelektrode und einer Silber/Silberchlorid Referenzelektrode aufgezeichnet. Die Begasung des Reaktors erfolgte über eine externe Gasmischstation der Firma Westphal Mess- und Regelungstechnik (WMR 4000, Ottobrunn) mit einer Begasungsrate von 30 L h^{-1} , wobei eine Gasmischung aus 16,7% Kohlenstoffdioxid, 40% Wasserstoff und 43,3% Stickstoff eingestellt und über ein Begasungsrohr in das Reaktionsmedium eingeleitet wurde. Für eine optimale

Durchmischung sorgten drei Strömungsbrecher sowie zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen), die im Abstand von 1,5 cm und 7,0 cm vom unteren Ende der Welle gemessen, angebracht waren und mit 1200 min^{-1} betrieben wurden. Für die beschriebenen Bedingungen wurde ein Leistungseintrag von $11,9 \text{ W L}^{-1}$ bestimmt. Um den Verdunstungseffekt des Reaktionsmediums zu minimieren wurde das Abgas des Reaktors über einen auf $14 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Rückflusskondensator geleitet. Für die Berechnung von Aufnahmezeiten (siehe Kapitel 4.5.3) wurde das Abgas daraufhin über einen Durchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) sowie einen Mikro-Gaschromatographen (CP-4900, Varian, Darmstadt) analysiert.

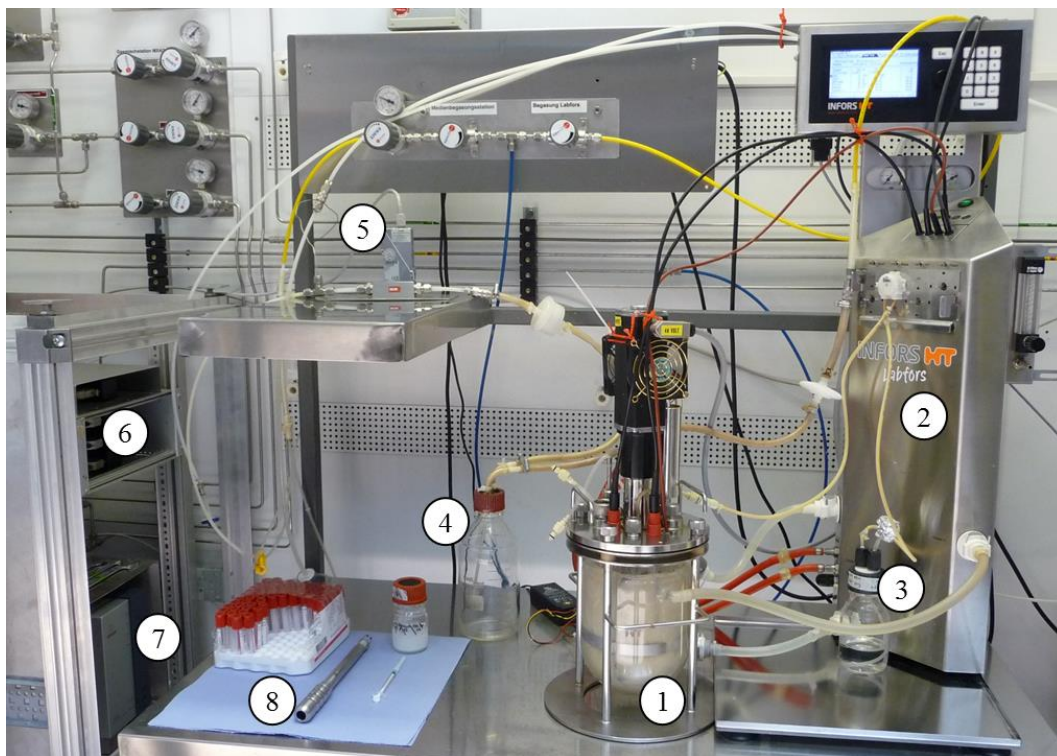


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau für die Gasfermentation mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor. Dargestellt sind: Rührkesselreaktor (1), Steuereinheit (2), Titrationmittel (3), Schaumfalle (4), Massendurchflussmesser (5), Gasmischstation (6), μ -Gaschromatographieeinheit (7) und Probennahmesystem (8).

Zum Schutz des Rührkesselreaktors vor schwefelhaltigen Komponenten im Reaktionsmedium wurde dieser separat autoklaviert und nachfolgend über eine peristaltische Pumpe mit sterilem Reaktionsmedium befüllt. Zur Ausbildung des Gas-Flüssiggleichgewichts von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid im Medium wurde der Reaktor für mindestens 12 h mit der oben angegebenen Gasmischung begast. Während der

gesamten Gasfermentation erfolgte die einseitige Regelung (Totband 0,05) des pH durch Zugabe einer Base aus 9 M NaOH oder KOH und 1,3 M NH₄OH auf pH 7. Noch vor der Inokulation wurde 100 µL L⁻¹ Antischaummittel (Polypropylenglycol) zur Unterdrückung von Schaumbildung zugegeben. Der Rührkesselreaktor wurde durch sterile Einwegspritzen mit Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase auf eine anfängliche Biotrockenmassekonzentration von 2,25 g L⁻¹ inokuliert. Anschließend wurden in regelmäßigen Abständen über ein Probennahmesystem ohne Totvolumen (Patent DE 102005049226), Proben zur Bestimmung der optischen Dichte sowie der Metabolitkonzentrationen entnommen.

4.4.4 Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor bei 3,5 bar absolut

Autotrophe Satzkultivierungen mit einem Absolutdruck von 3,5 bar wurden in einem Rührkesselreaktor aus Edelstahl der Firma Bioengineering (KLF 2000, Bioengineering, Wald, Schweiz) durchgeführt (siehe Abbildung 4.3). Der Reaktor, nachfolgend auch als Druckreaktor bezeichnet, wurde mit zwei Rushton-Turbinen und vier eingebauten Strömungsbrechern bei einer Drehzahleinstellung von 1200 min⁻¹ betrieben. Der Druckreaktor war darüber hinaus mit einer Temperatur-, einer pH-, einer Redox- sowie einer Drucksonde ausgestattet. Zur Steuerung und Aufzeichnung der Parameter wurden die Software BioSCADA Lab sowie Analyze, ebenfalls von Bioengineering, verwendet. Die Temperatur des Reaktors wurde über einen Temperaturfühler bestimmt und mit Hilfe eines eingebauten Kühlwasser- sowie Heizstabes konstant auf 30 °C gehalten. Der Absolutdruck im Reaktor wurde mit Hilfe eines Regelkreises aus Drucksonde, PID-Regler und einem pneumatischen Druckluftventil auf verschiedene Drücke in einem Bereich zwischen 1,0 und 3,5 bar geregelt. Ein mechanisches Sicherheitsventil im Deckel des Reaktors stellte sicher, dass ein maximaler Absolutdruck von 3,8 bar nicht überschritten werden konnte. Das Redoxpotential sowie der pH wurden wie unter Abschnitt 4.4.3 beschrieben aufgezeichnet und gegebenenfalls geregelt. Die Begasung des Rührkesselreaktors über eine externe Gasmischstation der Firma Bronkhorst (Reinach, Schweiz) mit einem Volumenstrom von 30 L h⁻¹ erfolgte über eine Sintermetallfritte wobei die Gasmischung aus Wasserstoff (40% oder 60%), Kohlenstoffdioxid (16,7% oder 25%) und Stickstoff (43,3% oder 15%) variierte. Für die beschriebenen Bedingungen wurde ein Leistungseintrag von 15,1 W L⁻¹ bestimmt. Das Abgas wurde über einen Rückflusskondensator auf 4 °C gekühlt, um das Verdunsten von Reaktionsmedium zu minimieren.

Zur Ermittlung von Gasaufnahmeleistungen wurde das Abgas anschließend über einen Durchflussmesser der Firma Bronkhorst (F-101D-RAD-33-V, Reinach, Schweiz) sowie einen Mikro-Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies (490 Micro GC, Waldbronn) analysiert (siehe Kapitel 4.5.3).

Der Druckreaktor wurde *in-situ* sterilisiert (121 °C, 20 min) und anschließend über eine peristaltische Pumpe mit sterilem Medium befüllt. Die nachfolgenden Schritte zur Vorbereitung der Gasfermentation wurden wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben durchgeführt. Über ein Ablassventil im Boden des Reaktors konnten in regelmäßigen Zeitabständen Proben zur Bestimmung der optischen Dichte sowie der Metabolitkonzentrationen entnommen werden.

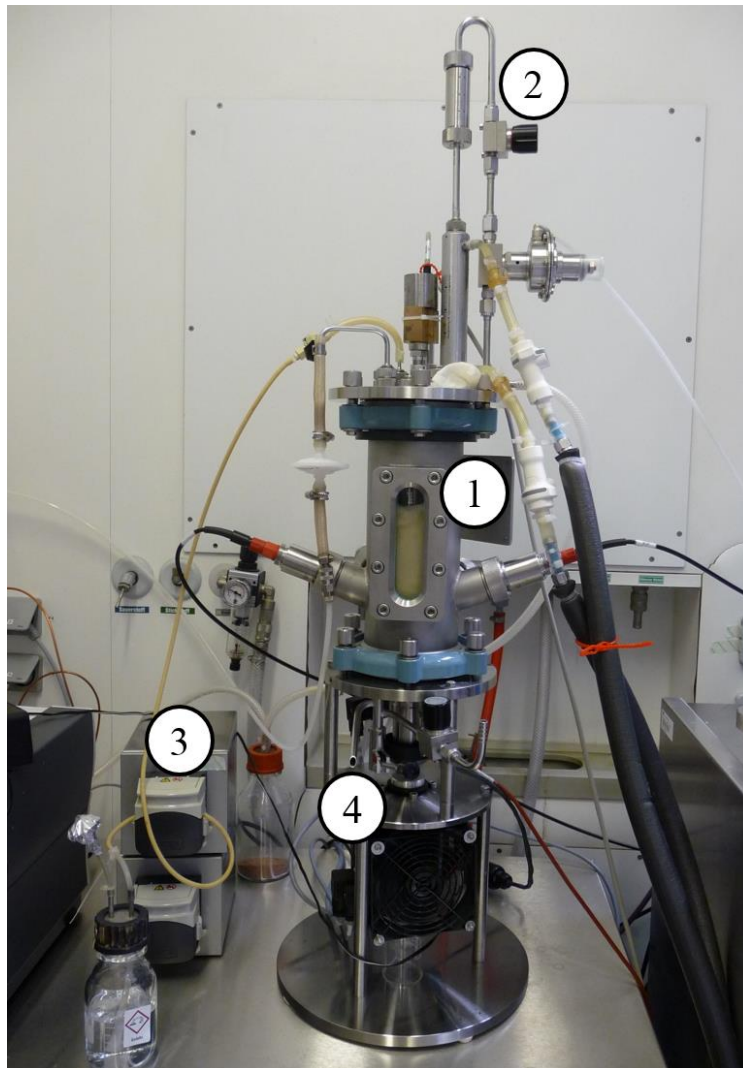


Abbildung 4.3: Versuchsaufbau zur Gasfermentation mit *A. woodii* im 1 L-Druckreaktor. Dargestellt sind: Druckreaktor aus Edelstahl (1), pneumatisches Druckventil (2), peristaltische Pumpen für Titrationsmittel (3), Bodenventil für die Probennahme (4).

4.4.5 Kontinuierliche Prozessführung im Laborrührkesselreaktor

Für kontinuierliche Prozessführungen wurde der Rührkesselreaktor wie unter Abschnitt 4.4.3 beschrieben vorbereitet. Zudem wurden zwei 5 L Flaschen verwendet um frisches Medium in den Rührkesselreaktor zu fördern und den Ablaufstrom zu sammeln. Das verwendete Zulaufmedium hatte stets die gleiche Zusammensetzung wie das Reaktionsmedium im Rührkesselreaktor, wobei es zunächst autoklaviert und anschließend durch Begasung mit einer Gasmischung aus 20% Kohlenstoffdioxid und 80% Stickstoff anaerobisiert wurde.

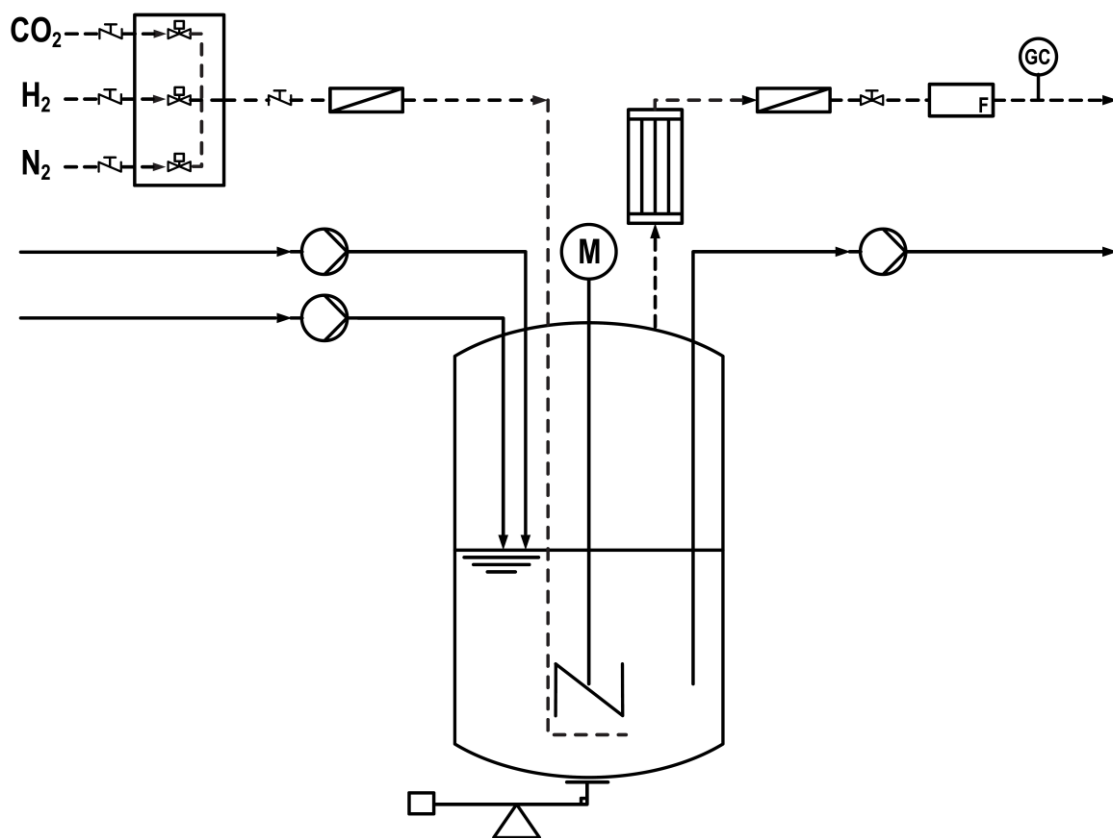


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Prozessaufbaus für einen kontinuierlichen Betrieb ohne Zellrückhaltung. Die durchgezogenen Linien verdeutlichen die Flüssigkeitsströme. Dargestellt sind die zugeführten Volumenströme des Zulaufmediums sowie des Titrationsmittels und der abgeführte Volumenstrom der Zellsuspension. Diese wurden jeweils über peristaltische Pumpen gefördert. Während der gesamten Gasfermentation wurde das Gewicht des Rührkesselreaktors aufgezeichnet und bei Abweichungen von über $\pm 0,5\%$ der Ablaufvolumenstrom angepasst. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Gasflüsse. Dargestellt sind die Massendurchflussregler der drei Gase Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und Stickstoff zur Begasung des Rührkesselreaktors sowie die Abgasanalytik im Ablaufstrom bestehend aus einem Massendurchflussmesser und einer μ -Gaschromatographieeinheit.

Um das Zulaufmedium auch während der Gasfermentation anaerob zu halten, wurde die 5 L Flasche mit einem flexiblen Stickstoffreservoir (Plastigas, Carl Roth, Karlsruhe) versehen. Bei letzterem handelt es sich um einen flexiblen, jedoch nicht dehnbaren (druckfest bis 100 mbar), kunststoffkaschierten Aluminiumbeutel, der sich über ein Septum und eine Kanüle mit Stickstoff befüllen lässt. Die Förderrate des Zulaufmediums ($0,035 \text{ h}^{-1}$) wurde über eine peristaltische Pumpe (IDEX Healthcare and Science GmbH, Wertheim) kontrolliert. Für Prozessführungen ohne Zellrückhaltung wurde mit dem kontinuierlichen Medienaustausch am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (nach 0,4 d) begonnen. Um das Reaktionsvolumen im Rührkesselreaktor stets konstant auf einem Liter zu halten, wurde das Gewicht des Rührkesselreaktors mittels einer Waage der Firma Sartorius (Signum 2, Göttingen) gemessen und über die Iris Software erfasst. Abweichungen des Gewichtes von $\pm 0,5\%$ wurden über die Software Iris erkannt und die Flussrate des Ablaufstromes entsprechend angepasst.

4.4.6 Kontinuierliche Prozessführung mit Zellrückhaltung

Für kontinuierliche Prozessführungen mit Zellrückhaltung wurde wie unter Abschnitt 4.4.5 vorgegangen, wobei im Rührkesselreaktor zusätzlich ein sterilisierbares Filtermodul angebracht wurde (siehe Abbildung 4.5). Dieses bestand aus sechs hydrophilen Polysulfon-Hohlfasermembranen (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) mit einer Länge von 30 cm, einer durchschnittlichen Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ und einer spezifischen Membranfläche von $75 \text{ cm}^2 \text{ L}^{-1}$. Um die Hohlfasern vor den Scherkräften bei hohen Begasungsraten sowie Rührerdrehzahlen zu schützen, wurden sie mit autoklavierbarem Zwei-Komponenten-Silikon in einem perforierten Silikonschlauch befestigt. 8 mm große Löcher im Silikonschlauch garantierten eine permanente Umspülung der Hohlfasern mit der Zellsuspension. Um die Zellrückhaltung im quasi-Dead-End-Modus betreiben zu können, wurde jeweils ein Ende des Moduls vollständig mit Silikon abgedichtet und das andere Ende mit einem Luer-Lock-Anschluss versehen. Der Luer-Lock-Anschluss ermöglichte die Verbindung des Filtrationsmoduls über den Deckel des Rührkesselreaktors mit einer peristaltischen Pumpe. Nach der Befestigung des Membranmoduls am Deckel sowie einigen Einbauten des Reaktors wurde dieses in den Rührkesselreaktor eingesetzt und während des standardmäßigen Autoklaviervorgangs (20 min, $121 \text{ }^\circ\text{C}$) *in-situ* sterilisiert werden.

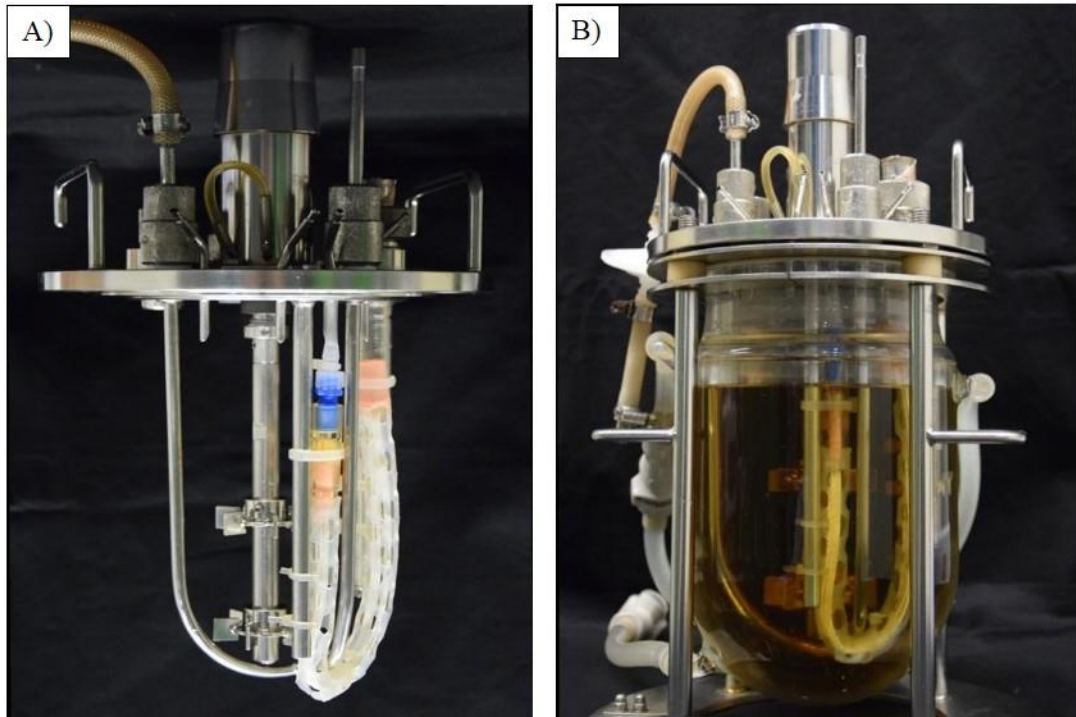


Abbildung 4.5: Fotografien des am Reaktordeckel angebrachten Hohlfasermembranmoduls. Über ein Luer-Lock-Anschluss ist das Membranmodul mit einem Anschluss im Reaktordeckel verbunden. Ein perforierter Silikonschlauch diente als Gehäuse um die sechs Hohlfasern vor Beschädigungen durch turbulente Strömung zu schützen (A). Das Membranmodul war während der gesamten Gasfermentation vollständig in die Zellsuspension eingetaucht (B).

Erneut wurden zwei 5 L Flaschen verwendet um frisches Medium in den Rührkesselreaktor zu fördern und den Ablaufstrom zu sammeln. Das verwendete Zulaufmedium hatte stets die gleiche Zusammensetzung wie das Reaktionsmedium im Rührkesselreaktor, wobei es vor Verwendung autoklaviert und anaerobisiert ($\text{CO}_2:\text{N}_2 = 20:80$) wurde. Um das Zulaufmedium auch während der Gasfermentation anaerob zu halten, wurde die 5 L Flasche mit einem flexiblen Stickstoffreservoir (Plastigas, Carl Roth, Karlsruhe) versehen. Die Durchflussrate ($0,075 \text{ h}^{-1}$, $0,175 \text{ h}^{-1}$ oder $0,35 \text{ h}^{-1}$) wurde über eine peristaltische Pumpe (Filtratfluss $9,4 - 46,7 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) eingestellt. Mit dem Austausch des Reaktionsmediums wurde unmittelbar nach Inokulation begonnen. Das Gewicht des Rührkesselreaktors wurde über eine Waage gemessen (Signum 2, Sartorius, Göttingen) und über die Iris Software aufgezeichnet. Um das Reaktionsvolumen im Rührkesselreaktor stets konstant auf einem Liter zu halten, wurden Abweichungen des vorgegebene Gewichtes von $\pm 0,5\%$ über die Software Iris erkannt und die Flussrate des Ablaufstromes entsprechend angepasst.

Nach Beenden der Gasfermentationen wurde das Filtrationsmodul im Rührkesselreaktor über einen dreistufigen Prozess gereinigt. Hierfür wurde die Zellsuspension abgelassen, der Reaktor mit mindestens einem Liter VE-H₂O befüllt und die Hohlfasern bei 50 °C, 1200 min⁻¹ und mit einer Durchflussrate von 0,175 h⁻¹ für eine Stunde gewaschen. Danach wurde das VE-H₂O durch 0,5 M NaOH ersetzt und die Reinigung unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen fortgesetzt. Vor dem Ausbau des Moduls und seiner Lagerung in 30% Ethanol wurde der erste Reinigungsschritt mit VE-H₂O wiederholt.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspensionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) mittels eines Einstrahlphotometers der Firma Thermo Scientific (Genesys 10S, Thermo Waltham, USA). Die Zellsuspensionen wurden nach Bedarf mit PBS-Puffer (engl. *phosphate buffered system*, siehe Kapitel 10.1) verdünnt, so dass der Messwert im linearen Bereich des Photometers lag (OD₆₀₀ 0,1-0,3).

Die Biotrockenmassekonzentration (c_X in g L⁻¹) wurde über einen Korrelationsfaktor anhand der optischen Dichte berechnet. Die Bestimmung dieses Korrelationsfaktors wurde mit heterotroph gewachsenen Zellen der späten exponentiellen Phase durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1). Die Zellen wurden aufkonzentriert (Zentrifugation 10 min, 4500 rpm) und eine Verdünnungsreihe aus zehn Verdünnungsstufen (OD₆₀₀ = 0,5 bis 9,0) mit PBS-Puffer erstellt, wobei für jede Stufe die optische Dichte sowie die Biotrockenmassekonzentration jeweils im Dreifachansatz bestimmt wurde. Letztere erfolgte gravimetrisch indem jeweils 2 mL der Bakteriensuspension in getrocknete und gewogene 2 mL Reaktionsgefäße gegeben wurde. Nach einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß erneut bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend gewogen. Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte mit Hilfe der Gleichung 4.1.

$$c_X = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad 4.1$$

c_X	Biotrockenmassekonzentration, $g_{BTM} L^{-1}$
m_{voll}	Masse des Reaktionsgefäßes mit Zellpellet nach der Trocknung, g
m_{leer}	Masse des Reaktionsgefäßes nach der ersten Trocknung, g
V	Volumen der Zellsuspension vor der Sedimentation, L

Nach Auftragung der Biotrockenmassekonzentration über die optische Dichte konnte ein Korrelationsfaktor von $0,506 \text{ g L}^{-1}$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $0,997$ ermittelt werden. Alle angegebenen Biotrockenmassen dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieses Faktors nach Gleichung 4.2 ermittelt.

$$c_X = f_X \cdot OD_{600} \quad 4.2$$

c_X	Biotrockenmassekonzentration, $g_{BTM} L^{-1}$
f_X	Korrelationsfaktor, $g_{BTM} L^{-1}$
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm, -

4.5.2 Konzentrationsbestimmung von Metaboliten mittels HPLC

Die Bestimmung der Produktkonzentrationen an Essigsäure und Ameisensäure erfolgte über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Hierfür wurde 1 mL Zellsuspension für 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert ($0,2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter, Carl Roth, Karlsruhe). Die Proben lagerten bis zur Analyse in luftdicht verschlossenen Rollrandfläschen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Für die Analyse wurde das HPLC-System Finnigan Surveyor Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA; siehe Tabelle 10.13 im Anhang) mit einer Aminex HPX-87H Säule (BioRad, München) als stationäre Phase und 5 mM Schwefelsäure als mobile Phase verwendet. Bei einer Säulenofentemperatur von $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Flussrate der mobilen Phase von $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ wurden $10 \mu\text{L}$ Probe injiziert. Die Produkte der Probe wurden mit Hilfe eines Brechungsindexdetektors während einer Messzeit von 30 min pro Probe bestimmt. Über einen externen Standard konnten aus den Peakflächen die Produktkonzentrationen bestimmt werden.

4.5.3 Bestimmung der Gasaufnahmezeiten mittels Abgasanalytik

Über eine externe Gasmischstation vor dem jeweiligen Reaktorsystem ließ sich eine individuelle Gaszusammensetzung aus den Gaskomponenten Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Stickstoff einstellen. Hierfür wurden die Volumenströme über drei, auf das jeweilige Gas (Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff oder Stickstoff) kalibrierte Massendurchflussregler geregelt.

Zur Bestimmung der Gasaufnahmezeiten wurde eine Abgasanalytik bestehend aus einem auf Stickstoff kalibrierten Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) und einer μ -Gaschromatographieeinheit (μ -GC) verwendet. Letztere unterschied sich je nachdem in welchem Reaktorsystem die Gasfermentation stattfand (siehe Kapitel 10.2).

Da das Abgas bei einer Gasfermentation aus einem Gasgemisch aus Stickstoff, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid bestand, traten Abweichungen zwischen den ausgegebenen Volumenströmen des Massendurchflussmessers und den tatsächlichen Volumenströmen des Abgases auf. Der tatsächliche Wert lässt sich über den Mischgaskonversionsfaktor folgendermaßen berechnen:

$$V_{Abgas} = V_{N_2} \cdot MGK \quad 4.4$$

V_{Abgas} tatsächlicher Volumenstrom des Abgases, L h⁻¹

V_{N_2} Stickstoffvolumenstrom, L h⁻¹

MGK Mischgaskonversionsfaktor, -

Der Mischgaskonversionsfaktor wiederum ist eine Funktion der Zusammensetzung des Gases und wurde gemäß Gleichung 4.5 berechnet.

$$MGK = \frac{100}{\sum_i \frac{V_i}{G_{f,i}}} \quad 4.5$$

V_i Volumenanteil der Gaskomponente i, %

$G_{f,i}$ Gaskonversionsfaktor der Gaskomponente i, -

Der benötigte Gaskonversionsfaktor ($G_{f,i}$) für das jeweilige Gas (Index i) muss hierfür auf das Gas (Index j) auf welches der Massendurchflussmesser kalibriert ist (hier Stickstoff) mit Gleichung 4.6 berechnet werden.

$$G_{f,i} = \frac{c_{p,j} \cdot \rho_{n,j}}{c_{p,i} \cdot \rho_{n,i}} \quad 4.6$$

c_p Wärmekapazität des jeweiligen Gases, $J kg^{-1} K^{-1}$

ρ_n Dichte des jeweiligen Gases bei 0 °C und 101325 Pa, $kg m^{-3}$

Zur Bestimmung der prozentualen Gaszusammensetzung des Abgasvolumenstromes mittels μ -GC, wurde am Ende jeder Gasfermentation eine externe Kalibrierung durchgeführt. Der Rührkesselreaktor wurde einschließlich der Zellsuspension mit unterschiedlichen, definierten Gaszusammensetzungen für 90 Minuten begast, während die μ -GC alle 3 Minuten die Zusammensetzung des Abgases bestimmte. Über die Erstellung zweier Kalibriergeraden für Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid aus den erhaltenen Peakflächen, wurde dann die prozentuale Gaszusammensetzung aus den aufgenommenen Abgasdaten der Gasfermentation bestimmt.

Durch die Multiplikation des tatsächlichen Abgasvolumenstroms mit der prozentualen Gaszusammensetzung zum gleichen Zeitpunkt lässt sich abschließend der jeweilige Massenstrom der einzelnen Gaskomponenten berechnen. Die Differenz der eingestellten Massenströme und der berechneten Massenströme in der Abluftstrecke ergibt die aufgenommene Gasmenge durch die Mikroorganismen.

Für die Berechnung der integralen Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen wurden entsprechend Gleichung 4.7 die Stoffmengen der aufgenommenen Gase (m_{Eij}) sowie die der gebildeten Produkte (m_{Pij}) Acetat und Formiat herangezogen.

$$1 = \frac{\sum m_{Pij}}{\sum m_{Eij}} \quad 4.7$$

m_{Pij} Kohlenstoff oder Elektronenmenge j der gebildeten Produkte P_i , $mol L^{-1}$

m_{Eij} Kohlenstoff oder Elektronenmenge j der aufgenommenen Edukte E_i , $mol L^{-1}$

Die Elektronenmenge einer Komponente wird über den jeweiligen Reduktionsgrad κ bestimmt. Dieser ist definiert als die Molzahl der zur vollständigen Oxidation verfügbaren Elektronen („Äquivalentmolzahl“) pro Mol Kohlenstoff der jeweiligen Komponente. Die Äquivalentmolzahl der zur Verfügung stehenden Elektronen beträgt „+4 Elektronen“ für Kohlenstoff, „+1 Elektron“ für Wasserstoff und „-2 Elektronen“ für Sauerstoff. Somit kann der Reduktionsgrad κ mit Gleichung 4.8 berechnet werden.

$$\kappa_{C_1H_bO_c} = 1 \cdot (+4) + b \cdot (+1) + c \cdot (-2) \quad 4.8$$

Dadurch ergibt sich beispielsweise für Essigsäure ein Reduktionsgrad von 4 und für Ameisensäure ein Reduktionsgrad von 2.

4.5.4 Bestimmung spezifischer Raten

Um den Vergleich unterschiedlicher Prozesse zu ermöglichen, müssen Parameter wie die maximale Wachstumsrate und die zellspezifische Produktbildungsrate ermittelt werden.

Die Wachstumsrate μ von Mikroorganismen ist nach Gleichung 3.6 definiert und kann unter der Annahme, dass die Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase konstant ist, durch Integration zu Gleichung 3.15 ($c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$) vereinfacht werden. Durch Umformung und Logarithmieren von Gleichung 3.15 ergibt sich zur Ermittlung der Wachstumsrate durch lineare Regression der gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen:

$$\ln\left(\frac{c_X(t)}{c_{X,0}}\right) = \mu_{max} \cdot t \quad 4.9$$

Die zellspezifische Acetatbildungsrate q_P ($g \ g^{-1} \ d^{-1}$) wurde über zwei unterschiedliche Methoden ermittelt. Die erste basiert auf dem in Gleichung 4.10 dargestellten Differenzenverfahren erster Ordnung unter Verwendung der offline gemessenen Acetatkonzentrationen (c_P) und Biotrockenmassekonzentrationen (c_X).

$$q_P = \frac{2}{c_{X(1)} + c_{X(2)}} \cdot \frac{\Delta c_P}{\Delta t} \quad 4.10$$

Aufgrund der geringen Anzahl an Offline-Messungen können mit dieser Methode nur wenige Datenpunkte ermittelt werden, weswegen eine weitere Methode, die auf den Ergebnissen der Abgasanalytik beruht, angewendet werden kann. Basierend auf der Stöchiometrie des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels wird hier die Acetatbildungsrate aus den online gemessenen Kohlenstoffdioxidaufnahmerate (siehe Abschnitt 4.5.3) ermittelt und die gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen mit einer sigmoidalen Funktion interpoliert um die zellspezifische Acetatbildungsrate als Funktion der Prozesszeit abzuschätzen.

5 Reaktionstechnische Charakterisierung im Satzbetrieb

5.1 Referenzprozess zur Gasfermentation mit *Acetobacterium woodii* im Rührkesselreaktor

Die Untersuchungen zur Gasfermentation mit *A. woodii* basierten auf den Ergebnissen zur autotrophen Satzkultivierung im 1 L-Rührkesselreaktor von Demler (2012). In Bezug auf diese Arbeit wurde ein Referenzprozess im Rührkesselreaktor bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7 durchgeführt. Dafür wurde das von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen vorgeschlagene „Medium 135“ nach Demler (2012) verändert, wobei im Wesentlichen die Hefeextraktkonzentration sowie die Spurenelement- und Vitaminlösung verdoppelt und die Eisenkonzentration auf 5 mg L⁻¹ erhöht wurde. Als Titrationsmittel diente Natriumhydroxid und Ammoniak, letzteres wurde für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Stickstoff eingesetzt. Während der gesamten Satzkultivierung wurde der Rührkesselreaktor mit einem konstanten Gasvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem Wasserstoffpartialdruck von 400 mbar und einem Kohlenstoffdioxidpartialdruck von 167 mbar begast. Die Ergebnisse dreier unabhängig voneinander durchgeführter Satzkultivierung sind in Abbildung 5.1 durch Darstellung der Biotrockenmasse-, Acetat- sowie Formiatkonzentrationen über der Prozesszeit zusammengefasst.

Nach Inokulation kann für jede der dargestellten Gasfermentationen innerhalb von 1,6 Stunden eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration gemessen und eine gemittelte, maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) von $0,87 \text{ d}^{-1} \pm 0,14$ festgestellt werden. Eine stationäre Wachstumsphase wird bereits nach etwa 5,5 h erreicht, wobei für weitere 2,0 Tage eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 2,8 g L⁻¹ aufrechterhalten werden kann, ehe eine Abnahme messbar ist.

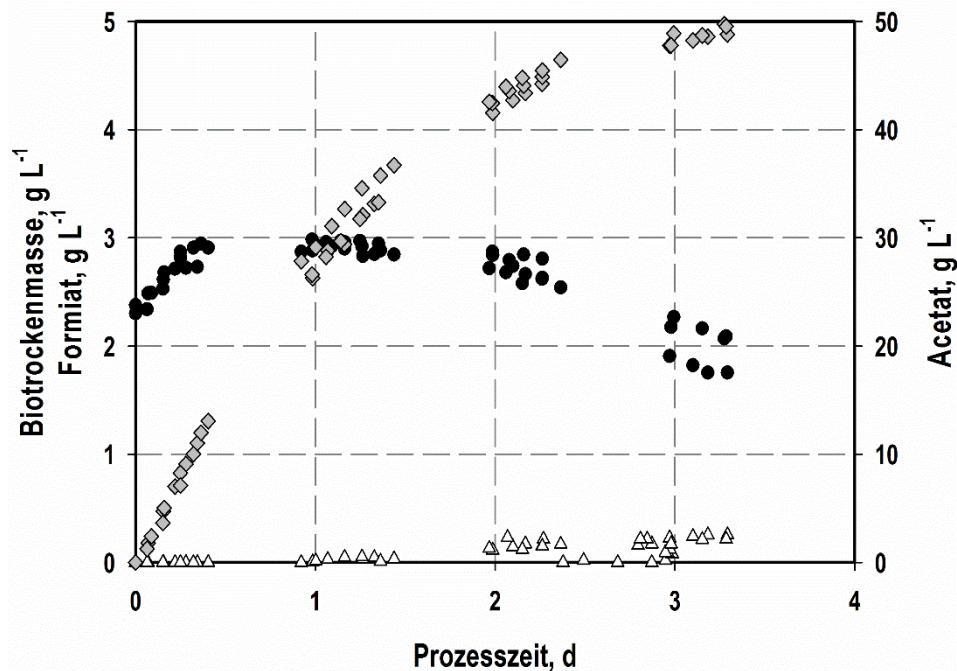


Abbildung 5.1: Autotrophe Satzkultivierung von *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (●), Formiat- (△) und Acetatkonzentration (◇) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Satzkultivierungen als Funktion der Prozesszeit. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit NaOH und NH₄OH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem pH₂ von 400 mbar und einem pCO₂ von 167 mbar begast.

Das Hauptstoffwechselprodukt Acetat wird ebenfalls unmittelbar nach der Inokulation gebildet. Nach einem Kultivierungszeitraum von 3,2 Tagen konnte eine gemittelte, maximale Acetatkonzentration von 49,4 g L⁻¹ ± 0,5 im Reaktionsmedium nachgewiesen werden.

Eine signifikant messbare Formiatbildung tritt erst nach 2,0 Tagen und mit dem Rückgang der Biotrockenmassekonzentration auf. Am Ende des Prozesses liegen 0,23 g L⁻¹ ± 0,02 Formiat im Reaktionsmedium vor.

Diskussion

Anhand der Ergebnisse dreier, unabhängig voneinander durchgeführter Referenzprozesse wird ersichtlich, dass während der autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* nach 3,2 Tagen 49,4 g L⁻¹ ± 0,5 Acetat gebildet werden konnten, was dem Ergebnis von Demler (2012) entspricht. Die geringe Zunahme der Biotrockenmassekonzentration um nur etwa 0,4 g L⁻¹ deutet jedoch daraufhin, dass weiterhin Limitierungen vorliegen. Dies wird

außerdem durch die Formiatbildung nach 2,0 Tagen gestützt. Dieses Intermediat wird zu Beginn des Methylzweiges im Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel über die Kohlenstoffdioxidreduktase aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid gebildet (siehe Kapitel 3.1.2). Da für die weitere Umsetzung von Formiat Redoxäquivalente und Energie benötigt werden, ist bei erhöhten Formiatkonzentrationen im Reaktionsmedium folglich von einer Störung im Stoffwechsel auszugehen. Bei einem Mangel an ATP und NADH akkumuliert das Zwischenprodukt in der Zelle und wird beim Überschreiten einer kritischen, intrazellulären Konzentration ausgeschleußt (Peters et al. 1999). Eine erhöhte Formiatkonzentration kann daher als ein Indikator für einen gestörten Energie- oder Redoxhaushalt von *A. woodii* angesehen werden.

Es gilt somit zu klären, worauf das geringe Wachstum sowie die Produktion des Zwischenproduktes Formiat zurückzuführen ist. Diesbezüglich wären eine Limitierung durch mindestens eine Komponente im Medium oder durch eine Produktinhibierung aufgrund der hohen akkumulierenden Acetatkonzentrationen in einem Satzprozess aber auch eine Massentransferlimitierung des gasförmigen Substrates Wasserstoff mögliche Ursachen.

Ausgehend von diesem Referenzprozess wurde daher der Einfluss ausgewählter Reaktionsparameter untersucht, um das Wachstum und die Produktbildungsraten im Satzprozess zu verbessern, sowie die finale Acetatkonzentration zu steigern. Die Ergebnisse der relevanten Reaktionsgrößen hinsichtlich der Gasfermentation mit *A. woodii* sind in den nachfolgenden Kapiteln zusammengefasst.

5.2 Variation der Natriumionenkonzentration im Medium

Anhand der Ergebnisse zur Genomsequenzierung lässt *A. woodii* sich mittlerweile eindeutig zu der Gruppe der Acetogenen zuordnen, welche zur Energiegewinnung einen Natriumgradienten über die Zellmembran aufbauen (Poehlein et al. 2012). Die Abhängigkeit der Biotrockenmasse- und Produktbildung von der Natriumionenkonzentration im Reaktionsmedium ist somit naheliegend und soll an Hand der nachfolgend dargestellten Versuche geklärt werden.

Die Aufrechterhaltung eines konstanten pH von 7,0 während der Gasfermentationen mit *A. woodii* im Laborbioreaktor wurde bislang durch die Zugabe einer 9 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) geregelt. Bei dem Referenz-Satzprozess wird folglich die Natriumionenkonzentration nach einem Kultivierungszeitraum von 3,2 Tagen von anfänglich 120 mM auf eine finale Konzentration von 970 mM Na⁺ erhöht. Um die Auswirkung der kontinuierlichen Erhöhung der Natriumionenkonzentration zu klären und die Natriumionenkonzentration unabhängig von der Zugabe von Titrationsmittel gezielt im Laborbioreaktor einstellen zu können, wurde eine Satzkultivierung mit dem Titrationsmittel Kaliumhydroxid (KOH) statt NaOH und Zugabe von 120 mM Na⁺ im Reaktionsmedium durchgeführt.

Die aus dieser Gasfermentation erhaltenen Ergebnisse sind im Vergleich zum Referenzprozess in der nachfolgenden Abbildung 5.2 dargestellt. Im direkten Vergleich der Biotrockenmassekonzentrationen kommt es innerhalb von 2,5 Tagen zu keinen signifikanten Unterschieden. Nach diesem Kultivierungszeitraum sinkt die Biotrockenmassekonzentration bei Verwendung des Titrationsmittels KOH deutlich weniger als bei Verwendung von NaOH. Bei Gegenüberstellung der gebildeten Acetatkonzentrationen war innerhalb der ersten 24 Stunden kein Unterschied bezüglich der Produktbildung festzustellen. Nach einer Kultivierungsdauer von 2,0 Tagen konnte eine leicht erhöhte Acetatkonzentration bei Verwendung von KOH gemessen werden. Die finale Acetatkonzentration nach 3,2 Tagen betrug bei Titration mit KOH 51,3 g L⁻¹ und mit NaOH 48,8 g L⁻¹. Da die dargestellte Referenzkultivierung dreimal durchgeführt und dadurch eine Standardabweichung von ± 0,5 g L⁻¹ für die final gemessene Acetatkonzentration ermittelt werden konnte (siehe Abschnitt 5.1), ist dieser Unterschied als signifikant einzustufen. Das Nebenprodukt Formiat konnte für beide Gasfermentationen nach einem Tag nachgewiesen werden. Durch die Verwendung des Titrationsmittel KOH konnte die finale Formiatkonzentration im Vergleich zu der Gasfermentation mit NaOH (0,3 g L⁻¹ Formiat) auf 0,2 g L⁻¹ gesenkt werden.

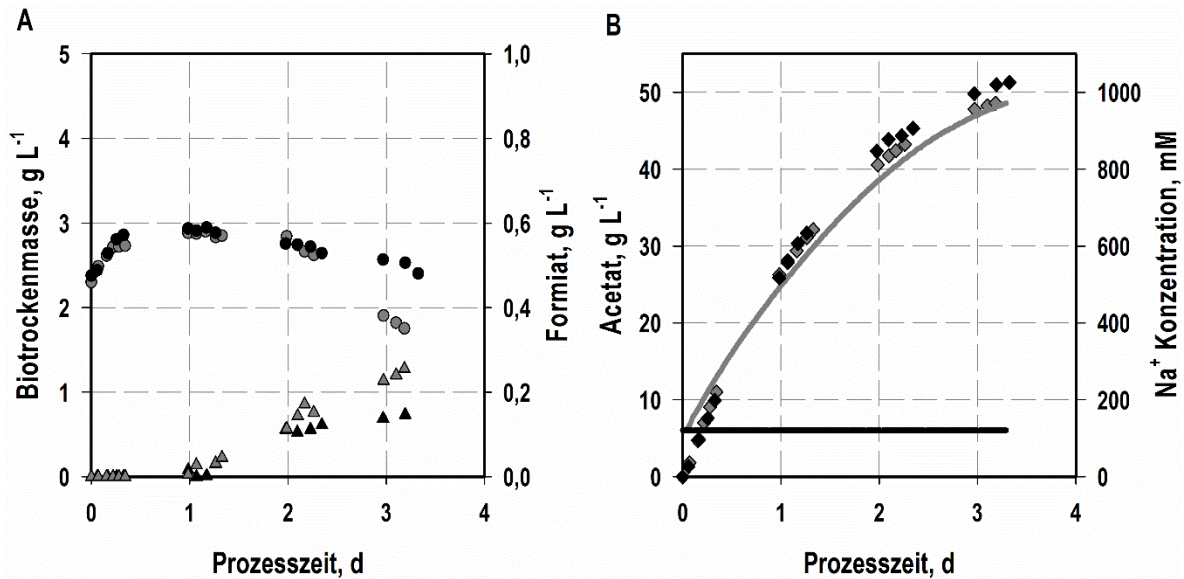


Abbildung 5.2: Vergleich der zeitlichen Verläufe der Biotrockenmasse- (A, Kreise), der Formiat- (A, Dreiecke), der Acetat- (B, Rauten) sowie der Natriumionenkonzentration im Medium (B, Linien) bei der Gasfermentation mit *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor. Die Natriumionenkonzentration wurde über das zugegebene Volumen des Titrationsmittels Natriumhydroxid ermittelt. Die Regelung des pH mit Kaliumhydroxid (9 M) ist durch schwarze Symbole oder Linien, die mit Natriumhydroxid (9 M) durch graue Symbole oder Linien dargestellt. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 400 mbar und einem pCO₂ von 167 mbar begast.

Um verschiedene Natriumionenkonzentrationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Biotrockenmasse- sowie Produktbildung von *A. woodii* zu untersuchen und die optimale Natriumkonzentration zu ermitteln, wurde zunächst die Zusammensetzung des Mediums bezüglich der eingesetzten Natriumkonzentrationen überprüft. Neben geringen Mengen an Spurenelementen (0,2 mg L⁻¹ Natriummolybdat-Dihydrat, 0,02 g L⁻¹ Natriumchlorid und 0,004 mg L⁻¹ Natriumselenit) ist vor allem der eingesetzte Carbonatpuffer, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃ 10 g L⁻¹), als Natriumquelle (entspricht 120 mM Na⁺) zu nennen.

Der Einfluss unterschiedlicher Natriumkonzentrationen auf die Biotrockenmasse- sowie Produktbildung wurde zunächst in begasten Anaerobflaschen unter autotrophen Bedingungen und im Satzverfahren untersucht. Die zu untersuchenden Natriumkonzentrationen von 0,3 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM und 1 M im Reaktionsmedium wurde durch die Vorlage von entsprechenden Mengen Natriumchlorid (NaCl) eingestellt.

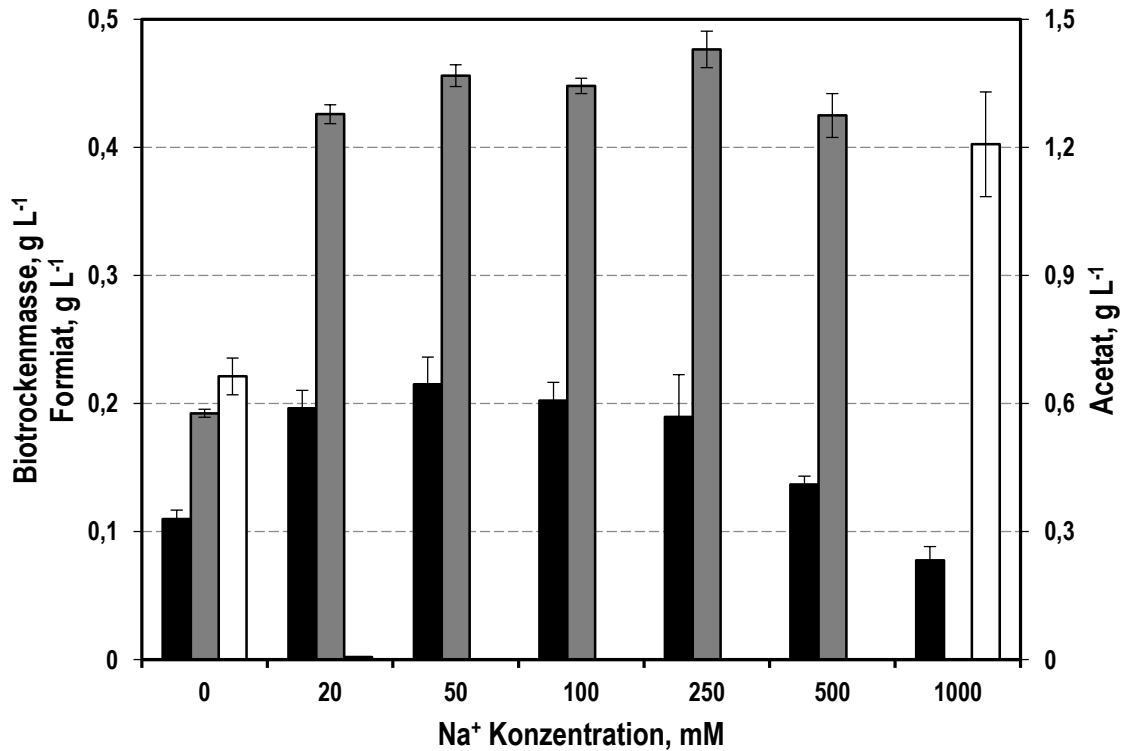


Abbildung 5.3: Einfluss der Natriumionenkonzentration auf die Biotrockenmasse- (schwarze Balken), Acetat- (graue Balken) sowie Formiatbildung (weiße Balken) von *A. woodii* nach einem Kultivierungszeitraum von 2,0 Tagen in begasteten Anaerobflaschen im Satzverfahren. Die gewünschten Natriumkonzentrationen (0,3 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM und 1 M) wurden durch NaCl eingestellt. Kultiviert wurde bei 30 °C und 150 rpm. Der Kopfraum wurde mit einer Gasmischung aus 16,7% CO₂ und 83,3% H₂ begast. Alle Gasfermentationen wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Die gemessenen Biotrockenmasse-, Acetat- und Formiatkonzentrationen nach einem Kultivierungszeitraum von 2,0 Tagen sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Die höchsten Biotrockenmasse- sowie Acetatkonzentrationen wurden zwischen 20 mM und 250 mM Na⁺ gebildet, weswegen von einer geeigneten Natriumionenkonzentration innerhalb dieses Konzentrationsbereiches auszugehen ist. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass zu geringe (0,3 mM Na⁺) sowie zu hohe (1 M Na⁺) Konzentrationen zu einer erhöhten Formiatproduktion führen.

Dieses Ergebnis wurde im größeren Maßstab (1 L-Rührkesselreaktor) bei kontinuierlicher Begasung und Regelung des pH (7,0) überprüft, indem *A. woodii* bei ausgewählten Natriumionenkonzentrationen im Satzverfahren kultiviert wurde. Dazu wurde die ursprüngliche Natriumhydrogencarbonatkonzentration des Mediums von 10 g L⁻¹ (120 mM

Na⁺) verwendet und zwei weitere autotrophe Satzprozesse mit den Konzentrationen 4,2 g L⁻¹ (50 mM Na⁺) und 1,68 g L⁻¹ (20 mM Na⁺) Natriumhydrogencarbonat durchgeführt. Als Titrationsmittel wurde in allen drei Fällen Kaliumhydroxid eingesetzt.

Die zeitlichen Verläufe der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen dieser Satzprozesse sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Zu sehen ist, dass die Zellkonzentrationen in den ersten 11 Stunden ähnlich verlaufen. Dennoch lassen sich für diesen Zeitraum deutlich unterschiedliche Wachstumsraten ermitteln (siehe Tabelle 5.1). Am zweiten Tag nimmt die Biotrockenmassekonzentration bei dem Versuch mit 20 mM Na⁺ von 3,04 g L⁻¹ auf 2,66 g L⁻¹ in 8,4 h ab. Bei den anderen beiden Gasfermentationen ist eine geringere Abnahme nachzuweisen (um 30% in 2,4 d bei 120 mM Na⁺ und 23% in 2,3 d bei 50,7 mM Na⁺), wobei der Ansatz mit 50 mM stets höhere Biotrockenmassekonzentrationen aufweist.

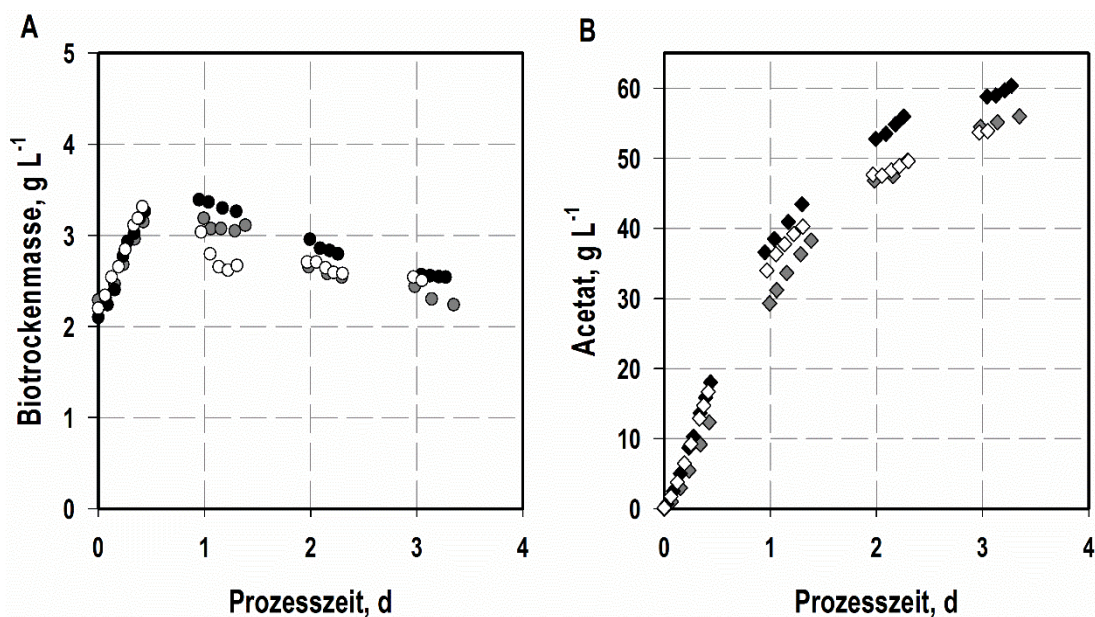


Abbildung 5.4: Einfluss der Natriumionenkonzentration auf die Biotrockenmasse- (A, Kreise) sowie der Acetatkonzentration (B, Rauten) während autotrophen Satzkultivierungen von *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor. Natriumionenkonzentrationen: 20 mM (weiße Symbole), 50 mM (schwarze Symbole), 120 mM (graue Symbole). Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 400 mbar und einem p_{CO₂} von 167 mbar begast.

Die Acetatbildung ist für die Versuche mit 20 mM und 50 mM Na⁺ am ersten Tag der Satzprozesse identisch: Es werden Acetatkonzentrationen von rund 16 g L⁻¹ nach 10,5 h erreicht. Eine Konzentration von 120 mM Na⁺ im Medium bewirkt einen 30% schwächeren Anstieg der Acetatkonzentration (12,5 g L⁻¹ nach 10,5 h). An den folgenden Versuchstagen lag die Acetatkonzentration bei 50 mM Na⁺ stets über der der anderen Versuche. So konnte erstmalig eine Acetatkonzentration von 60,4 g L⁻¹ innerhalb eines Kultivierungszeitraumes von 3,3 Tagen gebildet werden.

Tabelle 5.1: Spezifische Raten (maximale Wachstumsrate, zellspezifische Acetatbildungsrate) bei autotrophen Satzprozessen mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Natriumionenkonzentrationen für die exponentielle Wachstumsphase und Angabe der Endkonzentration an Acetat.

$c_{\text{Na}^+}, \text{mM}$	$\mu_{\text{max}}, \text{d}^{-1}$	$q_{\text{p}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$	$c_{\text{Ac., final}}, \text{g L}^{-1}$
20	1,03 ± 0,01	14,89 ± 0,71	45,5
50	1,42 ± 0,02	15,84 ± 0,66	60,4
120	0,89 ± 0,01	11,91 ± 0,44	53,9
Referenz*	0,73 ± 0,04	13,07 ± 2,07	48,7

* Gasfermentation mit anfänglich 120 mM Na⁺ und Titration mit NaOH

In Tabelle 5.1 sind die wichtigsten Prozesskenngrößen der Gasfermentationen im 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Natriumionenkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase zusammengefasst. Die Kenngrößen zeigen, dass die autotrophe Satzkultivierung bei 50 mM Na⁺ die anderen beiden Versuche bezüglich Wachstum und Produktbildung übertrifft: Die Wachstumsrate konnte gegenüber der Gasfermentation mit 120 mM Na⁺ um 60%, die zellspezifische Acetatbildungsrate um 33% gesteigert werden.

Diskussion

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der extrazellulären Natriumionenkonzentration auf die autotrophe Satzkultivierung von *A. woodii* betrachtet. Anhand der dargestellten Versuche ist festzuhalten, dass bei extrazellulären Konzentrationen von 120 mM Na⁺ und darüber die Biotrockenmasse- und Acetatbildung im Rührkesselreaktor gesenkt wird. Die innerhalb der durchgeführten Versuchsreihe am besten geeignete extrazelluläre Natriumkonzentration für die Gasfermentation mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor liegt bei 50 mM Na⁺ im Medium. Bei dieser Natriumkonzentration konnte mit 60,4 g L⁻¹ Acetat die höchste bislang publizierte Acetatkonzentration durch *A. woodii* im Rührkesselreaktor gemessen werden.

Schon 1989 wurde von einem Einfluss der extrazellulären Natriumionenkonzentration auf die autotrophe Acetatbildung von *A. woodii* berichtet (Heise et al. 1989). Dabei konnte bei der Untersuchung eines Konzentrationsbereiches von 0,9 mM bis 20,9 mM Na⁺ das Wachstum sowie die Produktbildung von *A. woodii* durch die Erhöhung der Natriumionenkonzentration verbessert werden. Ähnliche Effekte konnten bereits für *Acetogenium kivui* (Yang et al. 1990) und *Peptostreptococcus productus* (Geerligs et al. 1989) sowie für das methanogene Bakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Perski et al. 1981) festgestellt werden.

Im Referenz-Satzprozess mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor werden die von Heise et al. (1989) untersuchten Natriumkonzentrationen bereits durch die anfängliche Konzentration an NaHCO₃ (120 mM) im Reaktionsmedium deutlich überschritten. Hinzu kommt die stetige Zugabe weiterer Natriumionen über das bislang standardmäßig eingesetzte Titrationsmittel Natriumhydroxid wodurch eine Konzentration von bis zu 970 mM Na⁺ am Ende des Satzprozesses erreicht wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung der Natriumionenkonzentration das Wachstum und die Acetatbildung folglich nur bis zu einer kritischen Na⁺-Konzentration fördert.

Zu hohe Konzentrationen (> 800 mM Na⁺) führen zu einer signifikanten Inhibierung des Metabolismus, was vermutlich auf die Funktion des Rnf-Komplexes, welcher für den Transport von Natriumionen aus den Bakterienzellen verantwortlich ist (siehe Abschnitt 3.1.3), zurückzuführen ist (Biegel et al. 2010). Bei hohen extrazellulären Natriumionenkonzentrationen wird dieser Transport gegen den vorherrschenden Ionengradienten und somit die natriumabhängige Energiegewinnung erschwert. Durch den daraus entstehenden Mangel an ATP kann Formiat im Methylzweig des Wood-Ljungdahl Stoffwechselweges nicht weiter umgesetzt werden. Das Zwischenprodukt akkumuliert daher

intrazellulär und wird bei Erreichen einer kritischen, intrazellulären Konzentration ausgeschleust, wodurch wiederum erhöhte Formiatkonzentrationen im Reaktionsmedium festzustellen sind.

Die Produktion von Formiat bei niedrigen Natriumkonzentrationen (0,3 mM) lässt sich ebenfalls auf einen vorherrschenden ATP-Mangel zurückführen. Durch die fehlende treibende Kraft für die F_1F_0 ATP-Synthase kann keine ATP gewonnen werden (Heise et al. 1989).

In beiden Fällen, bei zu hohen sowie zu niedrigen Natriumionenkonzentration, führt der Mangel an ATP außerdem zu niedrigeren Wachstums- sowie zellspezifischen Acetatbildungsraten (siehe Tabelle 5.1).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde, wenn nicht anders erwähnt, die optimale Konzentration von 50 mM NaHCO_3 sowie die Verwendung des Titrationsmittels Kaliumhydroxid für die nachfolgend dargestellten autotrophen Satzprozesse übernommen.

5.3 Kontrolle des Redoxpotentials im Rührkesselreaktor

Innerhalb des Zentralstoffwechsels von *A. woodii* muss ein komplexes System der Elektronenübertragung unter Verwendung der Redoxäquivalente NADH und Ferredoxin aufrechterhalten werden. Daher stellt das extrazelluläre Redoxpotential als Parameter, der die oxidierenden oder reduzierenden Eigenschaften eines Mediums wiedergibt (Husson et al. 2006), für anaerobe Kultivierungen eine wichtige Einflussgröße dar. Nach Aufzeichnung dieses Potentials bei der autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* wurden deswegen unter Verwendung von Oxidations- oder Reduktionsmitteln definierte Redoxpotentiale (-300 mV, -400 mV, -500 mV, -550 mV und -600 mV) eingestellt und der Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung untersucht.

5.3.1 Verlauf des Redoxpotentials über die Prozesszeit

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, ist während der autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration auf ein Maximum von etwa $3,4 \text{ g L}^{-1}$ nach 0,9 Tagen messbar, worauf eine stetige Abnahme bis zum Ende der Prozesszeit nach 3,2 Tagen folgt (siehe Abbildung 5.5 A). Innerhalb dieses Zeitraums werden rund 60 g L^{-1} Acetat gebildet.

Für diesen Satzprozess zeigt die Aufzeichnung des Redoxpotentials zu Beginn eine starke Abnahme von rund -450 mV (vor Inokulation) auf -600 mV bei Inokulation. Nach etwa 12 h ist ein Anstieg des Potentials um 25 mV messbar, worauf ein erneutes Absinken des Redoxpotentials bis zum Ende der Prozesszeit erfolgt (siehe Abbildung 5.5 B). Vergleicht man dieses Redoxpotential mit den ermittelten zellspezifischen Acetatbildungsrate so wird eine Korrelation dieser Prozessparameter ersichtlich: je niedriger die zellspezifische Acetatbildungsrate desto niedriger das gemessene Redoxpotential.

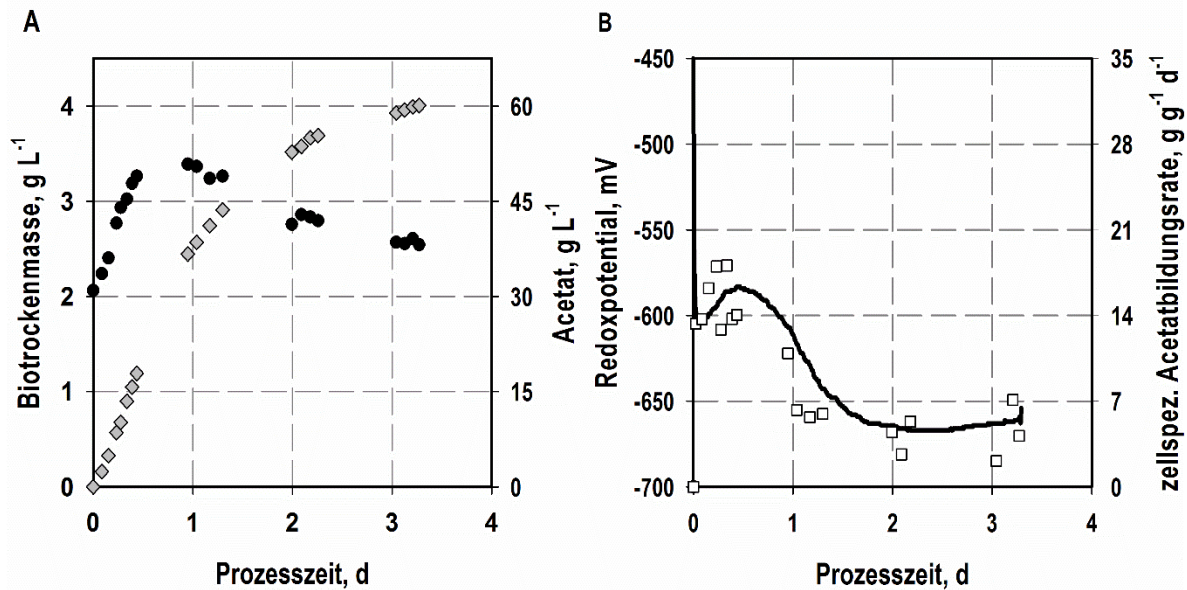


Abbildung 5.5: Verlauf des Redoxpotentials während der autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (●) und die Acetatkonzentration (◇) in Teilabbildung A sowie das Redoxpotential (Linie) und die zellspezifische Acetatbildungsrate (□) in Teilabbildung B, jeweils als Funktion der Prozesszeit. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 400 mbar und einem pCO₂ von 167 mbar begast.

5.3.2 Einsatz von Oxidationsmitteln

Zur Kontrolle des Redoxpotentials wurden Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) und Luftsauerstoff genutzt, um höhere Potentiale (-300 mV, -400 mV und -500 mV) einzustellen (Li et al. 2010; Onderdonk et al. 1976). Für beide Oxidationsmittel wurde bereits gezeigt, dass *A. woodii* in der Lage ist, diese zu reduzieren (Biegel et al. 2009; Boga et al. 2003). Daher musste während der gesamten Prozesszeit Oxidationsmittel kontinuierlich zum Reaktionsansatz zugegeben werden, um das Potential auf einen konstanten Wert zu halten.

Zunächst werden die Ergebnisse bei Regelung des Redoxpotentials mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ auf -300 mV, -400 mV und -500 mV betrachtet, wobei die Potentialverläufe dieser Satzprozesse in Abbildung 5.6 dargestellt sind. Aufgrund der intermittierenden Zugabe des Oxidationsmittels und dem zeitversetzten Ansprechen der Redoxelektrode auf diese Zugabe erscheint die Darstellung der Redoxpotentiale als Banden. Abweichungen der Potentiale sind auf Störungen bei der Regelung zurückzuführen.

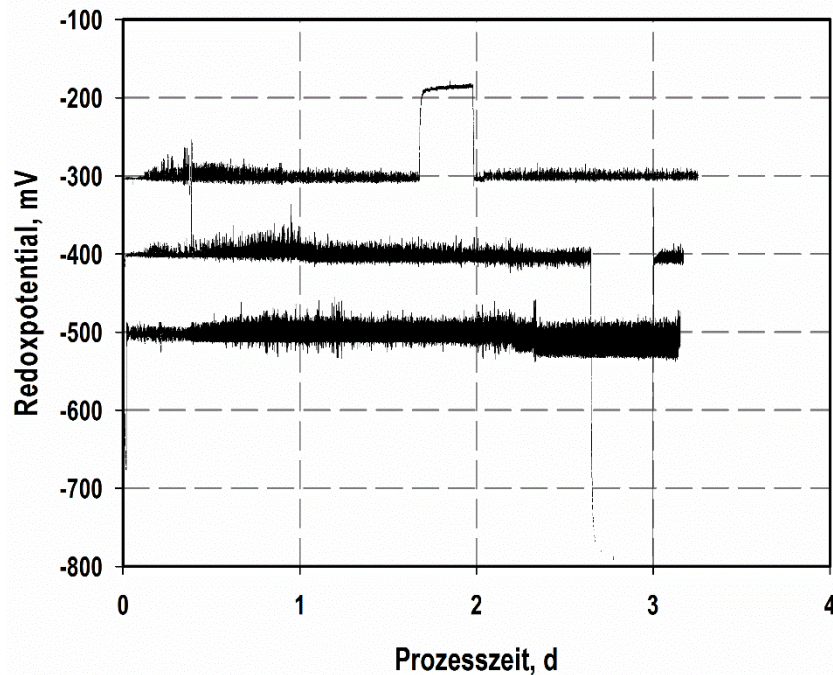


Abbildung 5.6: Verlauf der Redoxpotentiale bei Regelung mit Kaliumhexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$) auf -300 mV, -400 mV und -500 mV während der autotrophen Satzkultivierung mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor. Abweichungen der Potentiale sind auf Störungen der Regelung zurückzuführen.

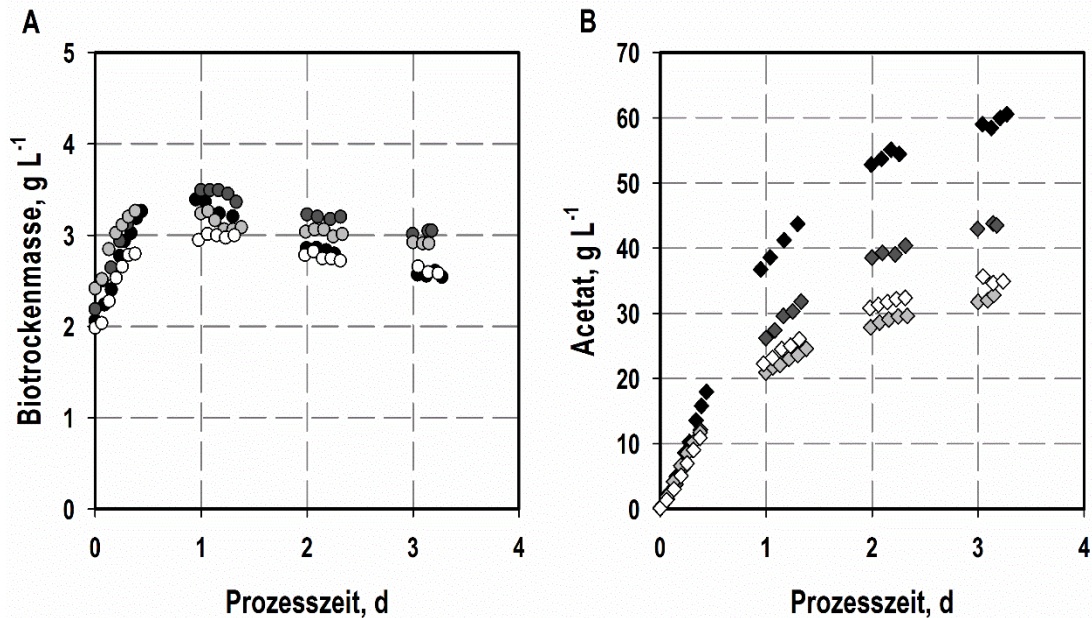


Abbildung 5.7: Einfluss des Redoxpotentials auf die Biotrockenmasse- (A) und Acetatbildung (B) bei autotropher Satzkultivierung von *A. woodii*. Das Redoxpotential wurde durch das Oxidationsmittel $K_3Fe(CN)_6$ auf -500 mV (dunkelgraue Symbole), -400 mV (hellgraue Symbole) oder -300 mV (weiße Symbole) eingestellt. Als Referenzprozess dient eine Satzkultivierung mit unkontrolliertem Redoxpotential (schwarze Symbole). Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar begast.

Der Einfluss eingestellter Redoxpotentiale (-300 mV, -400 mV und -500 mV) auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. woodii* im Vergleich zu einem Satzprozess bei dem das Potential nicht geregelt wurde, ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Aus den Verläufen der Biotrockenmassekonzentration ist ersichtlich, dass umso höhere Biotrockenmassekonzentrationen erreicht werden, je niedriger das Redoxpotential eingestellt wurde: 3,5 g L⁻¹ (-500 mV), 3,3 g L⁻¹ (-400 mV) und 3,0 g L⁻¹ (-300 mV) jeweils nach 24 h. Darüber hinaus wurden bei der auf -500 mV kontrollierten Gasfermentation höhere Biotrockenmassekonzentrationen wie bei dem unkontrollierten Prozess erreicht.

Bei Gegenüberstellung der gebildeten Acetatkonzentrationen konnten Unterschiede zwischen den Satzprozessen mit geregelten Redoxpotentialen erst nach 24 h gemessen werden. Dabei wies keine dieser Prozesse höhere Acetatkonzentration als der Prozess mit nicht kontrolliertem Potential (60,6 g L⁻¹) auf: 43,5 g L⁻¹ (-500 mV), 32,8 g L⁻¹ (-400 mV) und 34,9 g L⁻¹ (-300 mV).

Als ein alternatives Oxidationsmittel wurde steriler Luftsauerstoff zur Einstellung des Redoxpotentials für die Gasfermentation mit *A. woodii* verwendet (Liu et al. 2011). Aufgrund der Ergebnisse bei Verwendung von K₃Fe(CN)₆ wurde ein Redoxpotential von -500 mV eingestellt, wobei der sterile Luftsauerstoff über das Entleerungsrohr in den Rührkesselreaktor gepumpt, durch den Rührer dispergiert aber auch über den Gasvolumenstrom wieder aus dem Reaktor ausgetragen wurde. Wie in Abbildung 5.8 dargestellt, war das vorgegebene Potential (-500 mV) bei diesem Versuchsaufbau nicht konstant einzustellen.

Der Einfluss des Redoxpotentials auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. woodii* bei der Regelung mit Luftsauerstoff im Vergleich zum unregulierten Prozess sowie einer Gasfermentation bei der das Redoxpotential mit K₃Fe(CN)₆ auf -500 mV geregelt wurde ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Wie bei der Regelung mit K₃Fe(CN)₆ waren höhere Biotrockenmassekonzentrationen bei Regelung des Potentials mit Luftsauerstoff auf -500 mV zu erreichen. Bei Gegenüberstellung der gebildeten Acetatkonzentrationen konnten während der gesamten Prozesszeit für die Gasfermentationen mit geregelten Redoxpotentialen ausschließlich geringere Konzentrationen nachgewiesen werden: 60,6 g L⁻¹ (Referenzprozess), 41,9 g L⁻¹ (mit Luftsauerstoff geregeltes Redoxpotential) und 43,5 g L⁻¹ (mit K₃Fe(CN)₆ geregeltes Redoxpotential) nach jeweils 3,2 Tagen.

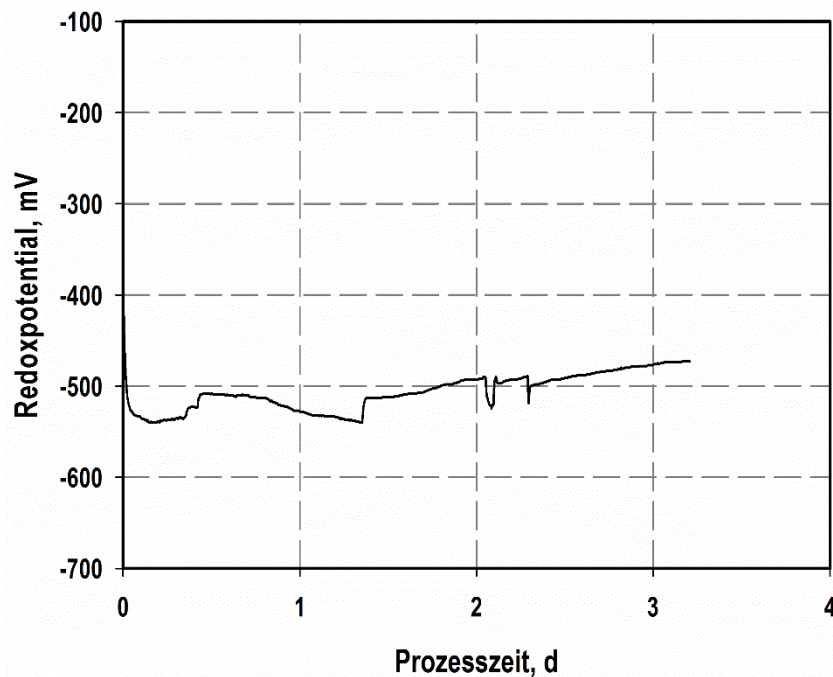


Abbildung 5.8: Verlauf des Redoxpotentials während der autotrophen Satzkultivierung im Rührkesselreaktor mit *A. woodii* bei Regelung mit sterilem Luftsauerstoff auf -500 mV.

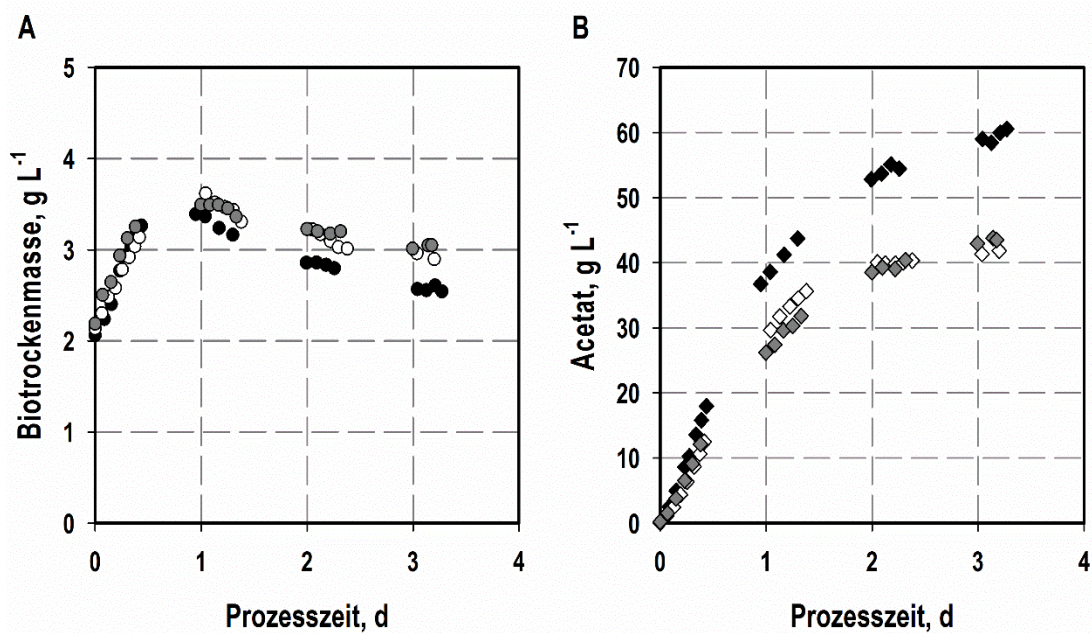


Abbildung 5.9: Einfluss des Redoxpotentials auf die Biotrockenmasse- (A) und die Acetatbildung (B) bei autotropher Satzkultivierung von *A. woodii*. Das Redoxpotential wurde durch sterilen Luftsauerstoff auf $-500 \text{ mV} \pm 30 \text{ mV}$ (weiße Symbole) eingestellt. Als Referenzprozess diente eine Satzkultivierung mit unkontrolliertem Redoxpotential (schwarze Symbole). Zudem ist eine Satzkultivierung mit *A. woodii* dargestellt bei der das Redoxpotential mit Kaliumhexacyanoferrat auf -500 mV (dunkelgraue Symbole) eingestellt wurde. Kultiviert wurde in allen Fällen bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und $\text{pH } 7$, titriert wurde mit KOH . Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar begast.

5.3.3 Einsatz von Reduktionsmitteln

Um das Redoxpotential auf negativere Potentiale (≤ -500 mV) zu regeln, wurden die Reduktionsmittel Natriumborhydrid, Natriumdithionit und Titaniumcitrat eingesetzt. Nachfolgend werden die Änderungen der Potentialverläufe über die Prozesszeit betrachtet bevor auf den Einfluss der eingestellten Potentiale sowie des Reduktionsmittels auf die Biotrockenmasse- und Produktbildung von *A. woodii* näher eingegangen wird.

Das Reduktionsmittel Natriumborhydrid zählt aufgrund seines hohen formalen Redoxpotentials von $-1,26$ V zu den starken Reduktionsmitteln und ermöglicht somit die Regelung des Redoxpotentials während der Gasfermentation mit *A. woodii* auf -550 mV. Da Natriumborhydrid nur in basischer Lösung stabil ist, wurde der Titrationslösung $0,1$ M Kaliumhydroxid zugesetzt. Wie in Abbildung 5.10 A ersichtlich, kann das Redoxpotential durch kontinuierliche Zugabe von Natriumborhydrid bereits nach etwa $2,5$ h erfolgreich auf -550 mV eingestellt werden. Der Abbau von Borhydrid durch *A. woodii* oder der Zerfall von Borhydrid zu Wasserstoff und Borat erfordern eine kontinuierliche Zugabe des Reduktionsmittels zur Aufrechterhaltung des gewünschten Potentials über eine längere Prozesszeit. Dadurch wird dem Reaktionsmedium ein zunehmendes Volumen Base (etwa 100 mL) zugeführt und der pH von $7,0$ auf pH $7,6$ erhöht. Aus diesem Grund wurde von einer Gasfermentation mit einem geregelten Redoxpotential von -600 mV abgesehen.

Des Weiteren wurde das Reduktionsmittel Natriumdithionit zur Einstellung des Redoxpotentials während einer Gasfermentation mit *A. woodii* verwendet. Es besitzt ein formales Redoxpotential von -660 mV und ermöglicht, wie in Abbildung 5.10 B dargestellt, die stabile Regelung des Redoxpotentials auf -600 mV ohne das Auftreten von Abweichungen von mehr als 5 mV.

Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei Verwendung des Reduktionsmittels Titaniumcitrat erzielt werden. Trotz des geringen formalen Potentials von -450 mV war eine konstante Regelung des Potentials auf -600 mV während der Gasfermentation mit *A. woodii* möglich (siehe Abbildung 5.10 C).

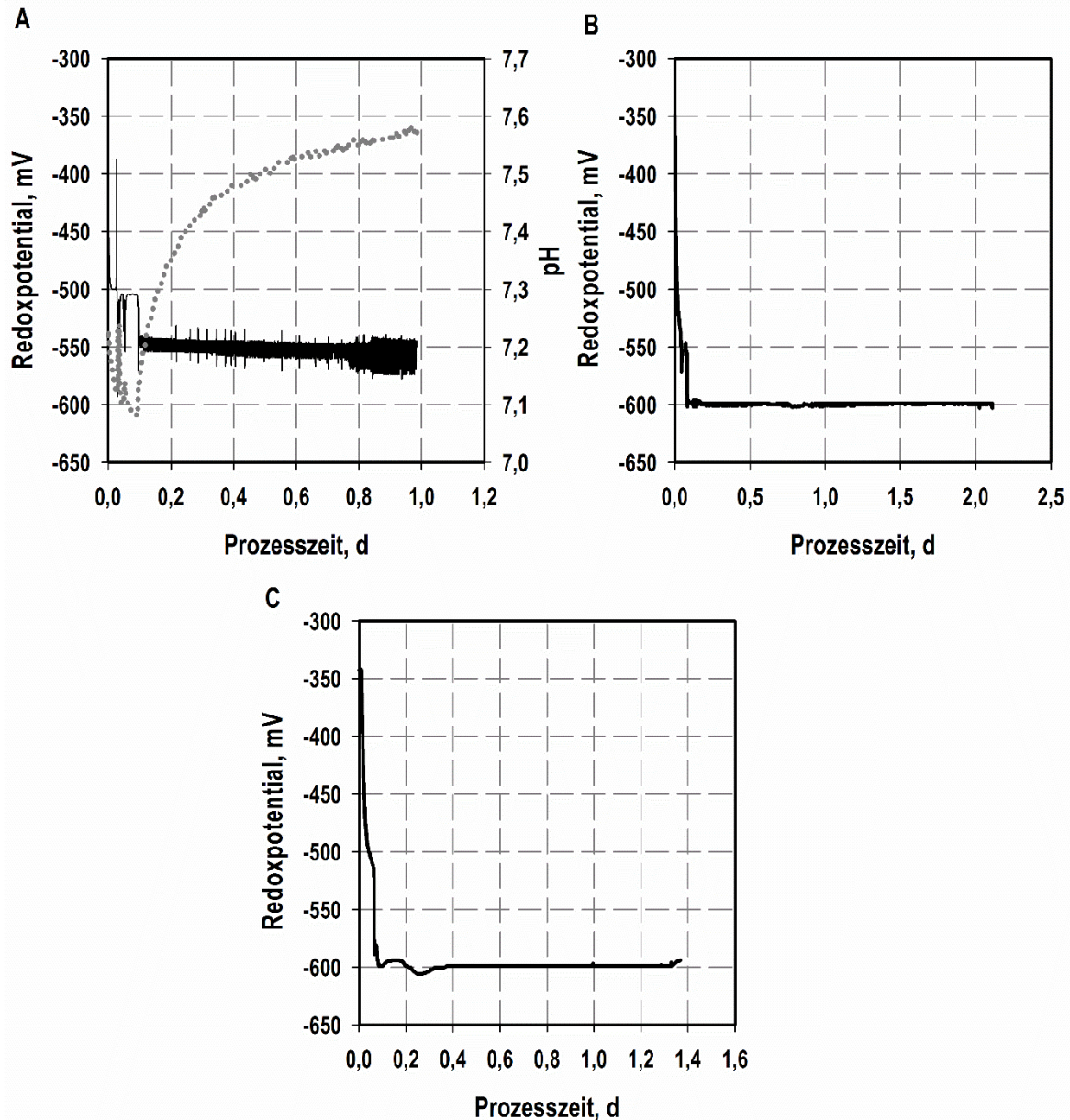


Abbildung 5.10: Verlauf des Redoxpotentials während der autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* bei Regelung mit Reduktionsmitteln. Die Regelung des Potentials mit Natriumborhydrid auf -550 mV sowie die Änderung des pH über die Prozesszeit sind in Teilabbildung A, die Regelung mit Natriumdithionit oder Titaniumcitrat auf jeweils -600 mV sind in Teilabbildung B oder C dargestellt.

Der Einfluss der verschiedenen Reduktionsmittel und das damit verbundene Absenken des Redoxpotentials auf die Biotrockenmasse- sowie Produktbildung von *A. woodii* sind in der nachfolgenden Abbildung 5.11 zusammengefasst. Im Vergleich zum Satzprozess ohne geregeltes Redoxpotential wird deutlich, dass das Wachstum bei Regelung des Potentials auf -550 mV oder -600 mV deutlich abnimmt. So lässt sich bei Verwendung der Reduktionsmittel Natriumdithionit oder Titaniumcitrat eine geringe Zunahme der

Biotrockenmasse von $0,8 \text{ g L}^{-1}$ auf eine maximale Konzentration von $2,8 \text{ g L}^{-1}$ nachweisen, welche jeweils bis zum Ende des Prozesses aufrechterhalten wurde. Bei Einsatz des Reduktionsmittels Natriumborhydrid konnte innerhalb des ersten Tages ausschließlich eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration festgestellt werden, weswegen die Gasfermentation nach dieser Prozesszeit beendet wurde.

Bei Gegenüberstellung der Acetatbildung (siehe Abbildung 5.11 B) wurden bei den Gasfermentationen mit geregelter Redoxpotential deutlich geringere Produktkonzentrationen gemessen. Während bei dem Satzprozess mit unkontrolliertem Redoxpotential $60,6 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Reaktionsmedium nachweisbar waren, konnte *A. woodii* bei einem Potential von -550 mV (Natriumborhydrid) nur $0,8 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und bei einem Potential von -600 mV (Natriumdithionit) nur $5,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat bilden. Da bei Verwendung von Titaniumcitrat eine Messung der Produktkonzentration mittels HPLC aufgrund der Schädigung des Säulenmaterials nicht möglich ist, wurde die finale Acetatkonzentration mit Hilfe eines Enzymtestes bestimmt und eine Konzentration von $4,8 \text{ g L}^{-1}$ Acetat ermittelt.

Bei Regelung des Redoxpotentials war außerdem eine erhöhte Formiatproduktion festzustellen (siehe Abbildung 5.11 C). Die Verwendung von Natriumdithionit und Natriumborhydrid führte bereits nach wenigen Stunden zu einer Nebenproduktbildung und zu finalen Formiatkonzentrationen von $0,6 \text{ g L}^{-1}$ oder $2,3 \text{ g L}^{-1}$. Bei der Referenzkultivierung war eine geringe Formiatbildung von maximal $0,3 \text{ g L}^{-1}$ erst nach etwa 2,0 Tagen messbar. Aus bereits genannten Gründen konnte bei Verwendung des Reduktionsmittels Titaniumcitrat die Bildung von Formiat nicht gemessen werden.

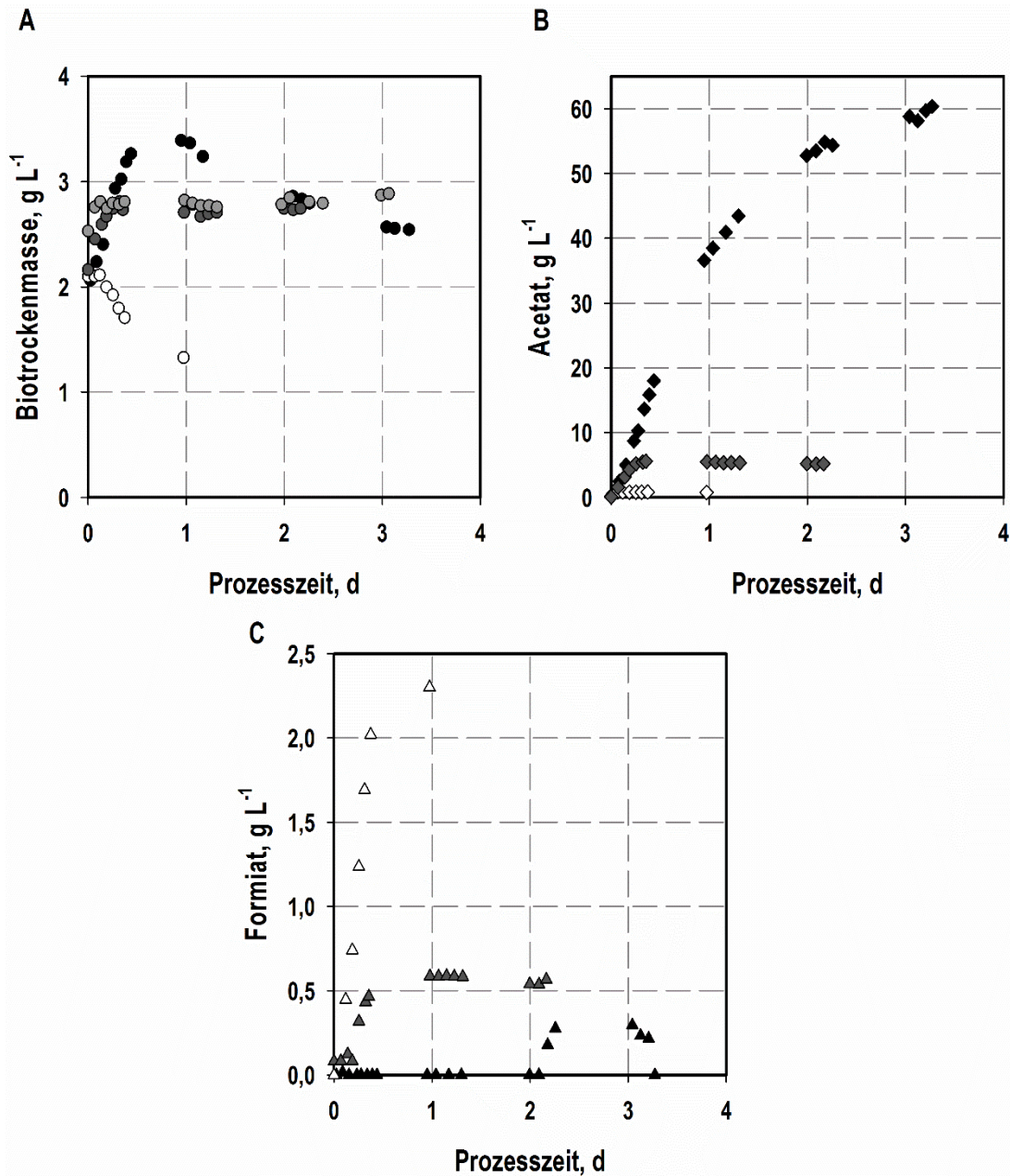


Abbildung 5.11: Einfluss der Regelung des Redoxpotentials mit Reduktionsmitteln auf die Biotrockenmasse- (A) sowie Acetat- (B) und Formiatbildung (C) bei autotropher Satzkultivierung von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im 1 L-Rührkesselreaktor. Die Regelung mit Natriumborhydrid auf -550 mV ist durch weiße Symbole, die Regelung mit Natriumdithionit auf -600 mV ist durch dunkelgraue Symbole und die Regelung mit Titaniumcitrat ebenfalls auf -600 mV durch hellgraue Symbole gekennzeichnet. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 400 mbar und einem p_{CO₂} von 167 mbar begast. Bei der Verwendung des Reduktionsmittels Titaniumcitrat ist keine Messung der Produkte Acetat und Formiat möglich, weswegen keine Produktkonzentrationen eingetragen wurden. Die Referenzkultivierung mit unkontrolliertem Potential ist in schwarz dargestellt.

5.3.4 Diskussion

Wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben wird bei einer autotrophen Kultivierung das extrazelluläre Redoxpotential stark vom vorherrschenden Wasserstoffpartialdruck (p_{H_2}) bestimmt. Die dargestellten Satzprozesse wurden ohne Ausnahmen bei einem p_{H_2} von 400 mbar durchgeführt, wofür sich ein formales Redoxpotential von -402 mV einstellen sollte. Vor Inokulation konnte ein Redoxpotential in dieser Größenordnung (-450 mV, Daten nicht gezeigt) gemessen werden.

Wird das Redoxpotential im Laufe einer Gasfermentation gemessen, ist in der Regel eine spezifische Veränderung des Redoxpotentials je nach Mikroorganismus zu beobachten (Brasca et al. 2007). Dies ist überwiegend auf die Umsetzung redoxaktiver Substanzen im Reaktionsmedium sowie der Bildung von redoxaktiven Verbindungen durch den Mikroorganismus zurückzuführen (Hunting et al. 2013). Anaerobe Mikroorganismen wie *A. woodii* bevorzugen ein stark negatives Redoxpotential, beziehungsweise senken das Redoxpotential um ihr Wachstum zu ermöglichen (Jacob 1971). Mit der Zugabe von *A. woodii* zum Reaktionsansatz ist ein starkes Absinken des Potentials auf -600 mV messbar, woraus sich schlussfolgern lässt, dass *A. woodii* durch die Produktion von redoxaktiven Substanzen mit deutlich niedrigeren Redoxpotentialen für diese Potentialänderung verantwortlich ist. So werden beispielsweise durch die Elektronenbifurkation an der multimeren Hydrogenase Elektronen von Wasserstoff auf Ferredoxin übertragen (Schuchmann et al. 2012). Ferredoxin besitzt im Vergleich zu Wasserstoff ein deutlich niedrigeres Redoxpotential ($E_0' \approx -500$ mV), somit wäre das Absinken des Potentials um 100 mV nach Inokulation beispielsweise durch redoxaktives Ferredoxin möglich. Diese Hypothese wird zudem durch das Wachstums- und Produktbildungsverhalten von *A. woodii* gestützt. Während der exponentiellen Wachstumsphase ist ein Anstieg des Redoxpotentials nachweisbar bevor das Potential während der Absterbephase erneut absinkt. Dabei kann ersteres auf den erhöhten Verbrauch von Ferredoxin und letzteres auf die Zellyse und die damit verbundene Freisetzung redoxaktiver Substanzen aus der Zelle zurückgeführt werden (Hunting et al. 2013). Des Weiteren sind extrazelluläre Elektronentransfersysteme sowie die Produktion von extrazellulären Mediatoren für eine Übertragung von Elektronen in Bakterien bekannt, die das Redoxpotential beeinflussen. Diese beinhalten beispielsweise membrangebundene Pilli, Elektronentransportsysteme sowie die Sekretion von Mediatoren wie Zytochrom b/c, Quinone oder Flavine (Juang et al. 2011; Lovley 2008; Marsili et al. 2008; Rabaey et al. 2007; Tachon et al. 2010).

Eine Korrelation des Redoxpotentials in der Zelle mit dem gemessenen Potential an der Elektrode lässt sich durch die Gegenüberstellung der zellspezifischen Acetatbildungsraten und der Änderung des Redoxpotentials jeweils über die Prozesszeit erfassen: In der stationären Wachstumsphase (nach ungefähr 24 h) ist ein Rückgang der Acetatproduktion nachweisbar. Die Bildung von Acetat über den Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel nimmt folglich ab und das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Ferredoxin steigt, was mit dem Absinken des gemessenen Redoxpotentials übereinstimmt. Somit ist das gemessene Redoxpotential umso niedriger je niedriger die Produktbildungsrate ist.

Um den Einfluss ausgewählter Redoxpotentiale auf die Gasfermentation mit *A. woodii* zu untersuchen, wurden zunächst die Oxidationsmittel $K_3Fe(CN)_6$ und Luftsauerstoff eingesetzt um das Redoxpotential auf -500 mV, -400 mV und -300 mV einzustellen. Die resultierenden zellspezifischen Raten für die exponentielle Wachstumsphase sind im Vergleich zu einem Ansatz bei dem das Redoxpotential nicht geregelt wurde in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Wie auch schon bei der grafischen Darstellung ist diesen Daten zu entnehmen, dass die zellspezifischen Wachstumsraten bei kontrollierten Redoxpotentialen, mit Ausnahme des von Potentials -300 mV, niedriger als bei dem unkontrollierten Referenzprozess sind. Jedoch steigt die Wachstumsrate mit steigendem Redoxpotential, so dass bei -300 mV die gleiche Wachstumsrate wie bei der unkontrollierten Gasfermentation erreicht wird. Die zellspezifischen Produktbildungsraten sind bei Versuchsansätzen mit kontrolliertem Redoxpotential deutlich niedriger als bei dem unkontrollierten Referenzprozess.

Der Einfluss der kontrollierten Redoxpotentiale (-300 mV, -400 mV und -500 mV) auf die Gasfermentation mit *A. woodii* verhält sich folglich negativ. Die zellspezifischen Acetatbildungsraten, die Wachstumsraten (außer -300 mV) und die erreichten Produktendkonzentrationen sind niedriger in den Satzprozessen mit höherem Redoxpotential als im Referenzansatz. Wie bereits erwähnt, musste zur Aufrechterhaltung der Redoxpotentiale das jeweilige Oxidationsmittel über die gesamte Prozesszeit kontinuierlich zugeführt werden. Bei der Verwendung von Kaliumhexacyanoferrat ist dies auf die Reduktion von $Fe(CN)_6^{3-}$ zu $Fe(CN)_6^{2-}$ an der NADH Dehydrogenase von *A. woodii* und bei der Verwendung von Luftsauerstoff auf die Reduktion von O_2 zu H_2O durch *A. woodii* zurückzuführen (Biegel et al. 2009; Boga et al. 2003). Hierfür werden Elektronen eingesetzt, welche folglich im Stoffwechsel zu einer Veränderung der Konzentrationen von NADH und NAD^+ sowie von oxidiertem und reduziertem Ferredoxin führen.

Tabelle 5.2: Spezifische Raten (maximale Wachstumsrate, zellspezifische Acetatbildungsrate) bei autotrophen Satzprozessen mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Redoxpotentialen in der exponentiellen Wachstumsphase und Endkonzentration an Acetat.

Redoxpotential, mV	Oxidationsmittel	μ_{\max}, d^{-1}	$q_p, g g^{-1} d^{-1}$	$c_{Ac., final}, g L^{-1}$
unkontrolliert	-	$1,42 \pm 0,02$	$15,84 \pm 0,66$	60,4
-500 mV	$K_3Fe(CN)_6$	$1,13 \pm 0,03$	$11,04 \pm 1,20$	43,5
-400 mV	$K_3Fe(CN)_6$	$1,22 \pm 0,05$	$12,00 \pm 1,44$	32,0
-300 mV	$K_3Fe(CN)_6$	$1,41 \pm 0,03$	$12,48 \pm 1,44$	34,9
-500 mV	Luftsauerstoff	$0,91 \pm 0,02$	$11,28 \pm 0,96$	41,9

Des Weiteren kann die Zugabe von Sauerstoff die Zelle, genauer gesagt sauerstoffempfindliche Proteine, Lipide, Polysaccharide sowie die DNA schädigen (Brioukhanov et al. 2007).

Im Gegensatz zur Zugabe von Oxidationsmitteln ist die Wirkung von stark reduziertem Medium bei Verwendung von Reduktionsmitteln weniger gut untersucht. Generell werden dem Reaktionsmedium für die Kultivierung anaerober Mikroorganismen Reduktionsmittel wie L-Cystein oder Natriumsulfid zugesetzt, um Reste von Sauerstoff zu entfernen und das Wachstum zu ermöglichen (Brioukhanov et al. 2007; Hungate et al. 1973). Des Weiteren wurden Reduktionsmittel wie Titaniumcitrat, Titaniumnitrioloessigsäure, Methyl- oder Benzylviologen erfolgreich für heterotrophe Satzkultivierungen einiger anaeroben Mikroorganismen, unter anderen auch *A. woodii*, eingesetzt (Heijthuijsen et al. 1989; Klasson et al. 1991; Zehnder et al. 1976). Um den Einfluss von Redoxpotentialen ≤ -550 mV auf die autotrophe Satzkultivierung von *A. woodii* zu untersuchen, wurden die Reduktionsmittel Natriumborhydrid, Natriumdithionit und Titaniumcitrat verwendet. Ähnlich wie bei den Oxidationsmitteln zeigt auch der Einsatz von Reduktionsmitteln eine Inhibierung des Zellwachstums sowie der Produktbildung. Hierbei ist unklar, ob die verwendete Substanz oder das niedrigere Redoxpotential für die deutlich schlechtere Produkt- sowie Biotrockenmassebildung verantwortlich ist. Schuchmann et al. (2012) konnten bereits für die Kultivierung von *Clostridium pasteurianum* zeigen, dass Dithionit das Ferredoxin ($E_0' \approx -500$ mV) im Zellinneren reduziert. Somit sollten auch die

Reduktionsmittel Natriumborhydrid und Titaniumcitrat aufgrund ihrer stark negativen, formalen Redoxpotentiale in der Lage sein, Ferredoxin ($E_0' \approx -500 \text{ mV}$) sowie NAD^+ ($E_0' \approx -320 \text{ mV}$) zu reduzieren und den Redoxhaushalt der Zelle zu verändern. In diesem Fall ist ein Überschuss von NADH ungünstig für die Zelle, da NAD^+ benötigt wird um Ferredoxin an den Hydrogenasen über die Oxidation von Wasserstoff zu regenerieren und um über den Rnf-Komplex ATP zu gewinnen (Du et al. 2006; Wang et al. 2012).

Ist NADH nicht ausreichend vorhanden, wird vor allem die Umsetzung von Kohlenstoffdioxid innerhalb des Methylzweiges des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweges beeinträchtigt. Ähnliche Auswirkungen sind im Hinblick auf Ferredoxin denkbar: Reduziertes Ferredoxin wird zur Energiegewinnung am Rnf-Komplex und für die Reduktion von Kohlenstoffdioxid innerhalb des Carbonylzweiges benötigt. Ist die Konzentration an reduziertem Ferredoxin zu hoch, läuft aus Mangel an oxidiertem Ferredoxin die Elektronenbifurkation an der Methylen-THF-Reduktase langsamer ab (Dürre 2005). Somit könnte der negative Einfluss auf das Überangebot an Reduktionsäquivalenten durch die Zugabe von Reduktionsmitteln erklärt werden. Die erhöhte Formiatproduktion bei Titration mit Reduktionsmitteln unterstützt diese Theorie. Das gebildete Formiat im Methylzweig des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels kann aufgrund des gestörten Redoxhaushalts (große Menge an NADH und reduziertem Ferredoxin) nicht weiter umgesetzt werden, weswegen der Mikroorganismus das gebildete Stoffwechselnebenprodukt aus der Zelle ausschleust.

Ein Rückgang der Wachstumsrate durch die Zugabe erhöhter Mengen an Reduktionsmitteln konnte auch für den acetogenen Mikroorganismus *C. ljungdahlii* festgestellt werden. Bei bestimmten Konzentrationen an Reduktionsmittel konnte jedoch zusätzlich das Verhältnis der gebildeten Produkte Ethanol zu Acetat in *C. ljungdahlii* durch Umleitung des Elektronenflusses auf NADH erhöht werden (Klasson et al. 1991; Mohammadi et al. 2011). Eine derartige Beeinflussung des Produktspektrums konnte auch für *Actinobacillus succinogenes* festgestellt werden (Li et al. 2010). Da *A. woodii* zu den Homoacetogenen zählt und ausschließlich Acetat produziert, kann nicht von einer Verschiebung des Elektronenflusses durch Beeinflussung des Redoxpotentials zu Gunsten des Produktes Ethanol ausgegangen werden. Aufgrund des negativen Einflusses von Oxidations- sowie Reduktionsmitteln wurde für alle nachfolgend dargestellten Gasfermentationen das Redoxpotential ausschließlich aufgezeichnet jedoch nicht auf ein bestimmtes Potential geregelt.

5.4 Gasfermentation mit *Acetobacterium woodii* bei höheren Drücken

5.4.1 Variation des Systemdruckes

Aufgrund der geringen Löslichkeit des gasförmigen Substrates Wasserstoff in wässrigen Lösungen ist bei Gasfermentationen davon auszugehen, dass der Stoffübergang von der Gas- in die Flüssigkeitsphase geschwindigkeitsbestimmend bei der Produktion von Acetat durch *A. woodii* sein könnte (Bredwell et al. 1999). Um einer möglichen Limitierung durch dieses schlecht wasserlösliche Substrat entgegenzuwirken, wurde *A. woodii* autotroph bei Überdruck kultiviert. Bei sonst gleichbleibenden Bedingungen (siehe Kapitel 4.4.4) wurde der Systemdruck auf 3,5 bar erhöht, was zu einer Steigerung des Eingangswasserstoffpartialdrucks (p_{H_2}) auf 1400 mbar sowie des Eingangskohlenstoffdioxidpartialdruckes (p_{CO_2}) auf 595 mbar führte. Die Ergebnisse dieses Satzprozesses sind im Vergleich zu einem Satzprozess bei Atmosphärendruck (1,0 bar) mit einem p_{H_2} von 400 mbar und einem p_{CO_2} von 167 mbar in Abbildung 5.12 dargestellt.

Vergleicht man zunächst das Wachstum von *A. woodii* so wird deutlich, dass die exponentielle Wachstumsphase bei einem Systemdruck von 1,0 bar länger andauert und somit eine um $0,6 \text{ g L}^{-1}$ höhere maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht werden kann. Nach einer Prozesszeit von 24 h nehmen die Zellkonzentrationen in beiden Satzprozessen kontinuierlich ab und erreichen nach 3,2 Tagen eine finale Biotrockenmassekonzentration von $2,3 \text{ g L}^{-1}$ (1,0 bar) und $2,2 \text{ g L}^{-1}$ (3,5 bar). Die gemessenen Zellkonzentrationen bei einem Systemdruck von 3,5 bar liegen während des gesamten Prozesszeitraums unterhalb der Konzentrationen bei Atmosphärendruck.

Des Weiteren ist ein Einfluss des Systemdruckes auf die Produktbildung festzustellen. Während bei beiden Satzprozessen eine Produktbildung unmittelbar nach Inokulation nachzuweisen ist, werden nach 3,2 Tagen bei dem Satzprozess bei 1,0 bar final $59,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat, bei 3,5 bar nur $45,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet. Stattdessen führte die Erhöhung des Systemdrucks auf 3,5 bar bereits unmittelbar nach der Inokulation zu einer signifikanten Zunahme der Formiatkonzentration. Am Ende des Satzprozesses wurden $4,2 \text{ g L}^{-1}$ Formiat gebildet. Bei Atmosphärendruck ist Formiat erst nach 24 h signifikant messbar und auch nach 3,2 Tagen wurden lediglich $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Formiat gebildet.

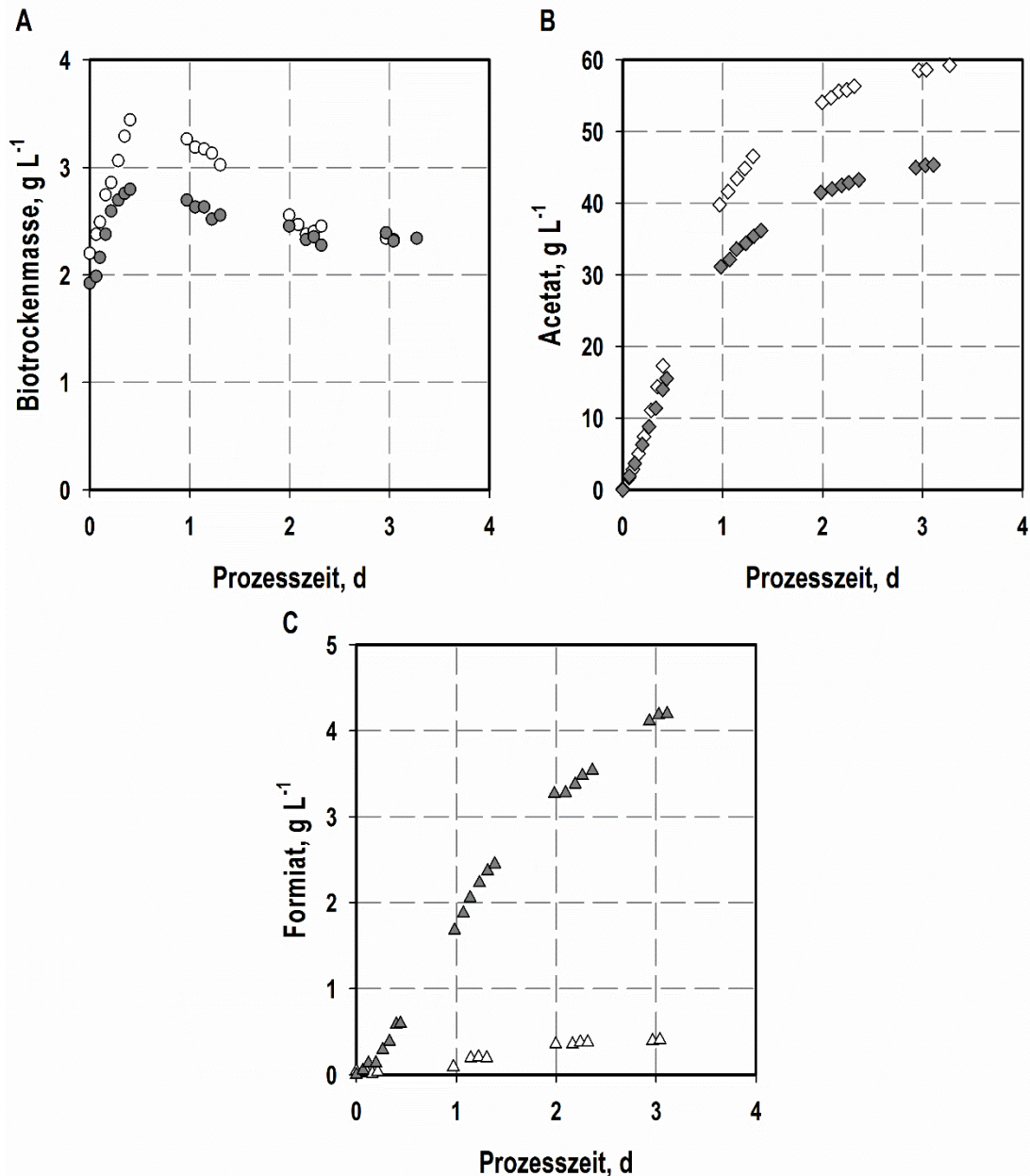


Abbildung 5.12: Einfluss des Systemsdrucks auf die Biotrockenmasse- (A), Acetat- (B) sowie Formiatbildung (C). Der Satzprozess bei Atmosphärendruck (1,0 bar, $p_{H_2} = 400$ mbar) ist durch weiße Symbole, der Satzprozess bei einem Systemdruck von 3,5 bar ($p_{H_2} = 1400$ mbar) durch graue Symbole dargestellt. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ begast.

5.4.2 Variation des Wasserstoffpartialdruckes

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse im vorangegangenen Abschnitt zum Einfluss des Systemdruckes auf die Gasfermentation mit *A. woodii* und die damit verbundene Nebenproduktbildung galt es zu klären, in wie weit die erhöhte Formiatproduktion auf die Erhöhung des Systemdruckes zurückgeführt werden kann, oder ob auch der erhöhten Wasserstoffpartialdruck (p_{H_2}) die Formiatbildung beeinflusst. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine weitere Gasfermentation bei gleichem Systemdruck (3,5 bar) durchgeführt, bei der der Wasserstoffpartialdruck des Eingangsvolumenstroms auf 60% (2100 mbar) erhöht wurde. Die Ergebnisse sind im Vergleich zu einem Satzprozess mit einem p_{H_2} von 400 mbar (Systemdruck 1,0 bar) und einem Satzprozess mit einem p_{H_2} von 1400 mbar (Systemdruck 3,5 bar) in Abbildung 5.13 dargestellt.

Bei Betrachtung des Wachstums von *A. woodii* ist ein negativer Einfluss des Wasserstoffpartialdruckes festzustellen. Die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen wurden bei dem niedrigsten Wasserstoffpartialdruck (400 mbar) gebildet. Mit der Erhöhung des p_{H_2} verlängert sich die Verzögerungsphase und verkürzt sich die exponentielle Wachstumsphase. Letzteres führt zu deutlich geringeren maximalen Biotrockenmassekonzentrationen (3,4 g L⁻¹ bei 400 mbar, 2,8 g L⁻¹ bei 1400 mbar und 2,7 g L⁻¹ bei 2100 mbar).

Die Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes hat des Weiteren einen starken Einfluss auf die Produkt- sowie Nebenproduktbildung. Eine Steigerung des p_{H_2} bewirkt eine erniedrigte finale Acetatkonzentration nach einem Prozesszeitraum von 3,1 Tagen: 59,3 g L⁻¹ (400 mbar), 45,3 g L⁻¹ (1400 mbar) und 29,2 g L⁻¹ (2100 mbar). Im Gegensatz dazu steigt die Formiatproduktion bei Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes. Nach einer anfänglichen Adaption kann während der Satzkultivierung bei 2100 mbar (p_{H_2}) nach 1,5 Tagen eine lineare Formiatzunahme nachgewiesen werden. Der Satzprozess wurde bei einer Formiatkonzentration von 7,3 g L⁻¹ beendet, wobei der Verlauf der Formiatkonzentration auf ein Erreichen deutlich höherer Konzentrationen bei längerer Prozesszeit hindeutet. Im Vergleich konnten bei einem Wasserstoffpartialdruck von 1400 mbar 4,2 g L⁻¹ Formiat und bei 400 mbar nur 0,4 g L⁻¹ Formiat gebildet werden.

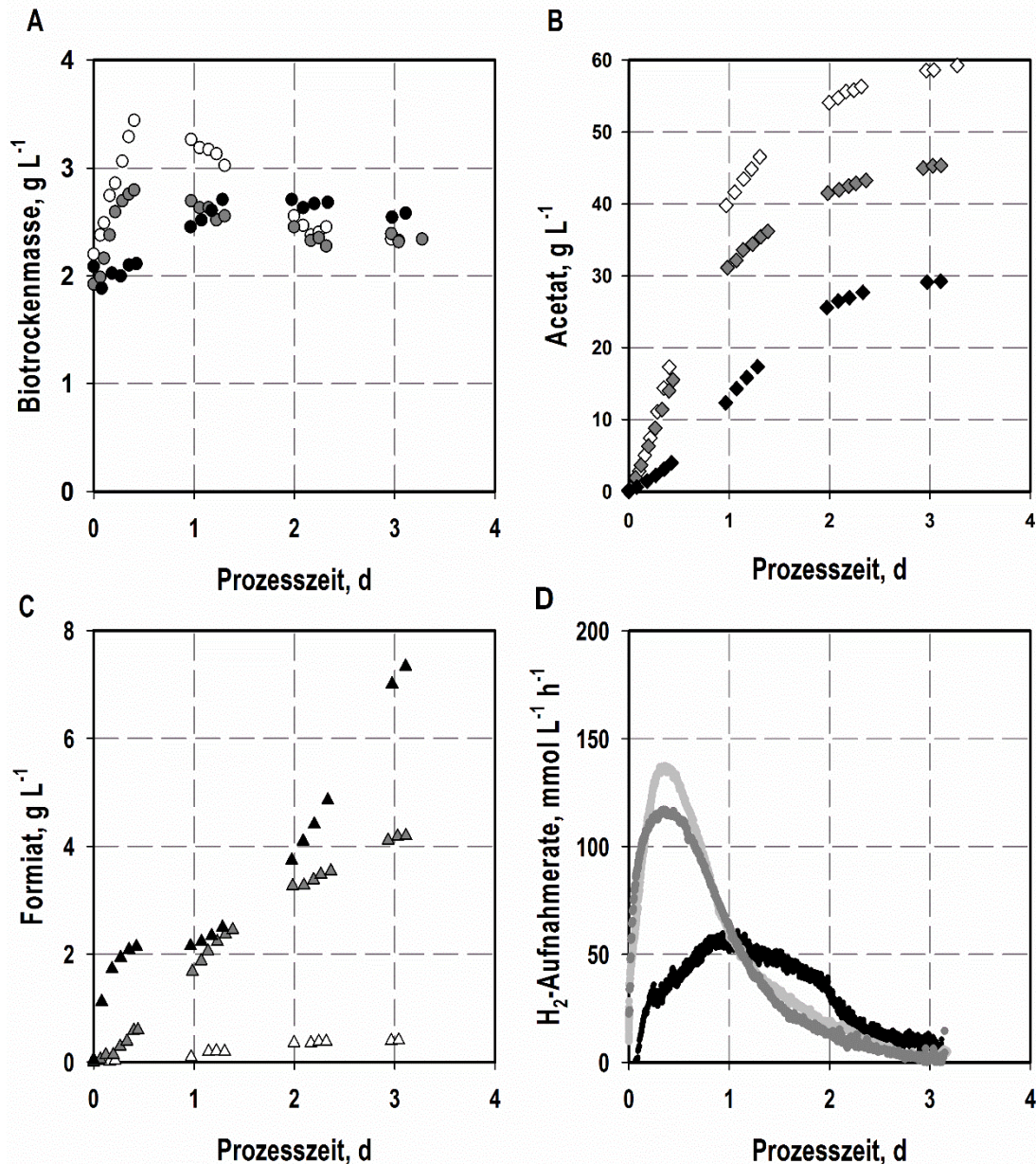


Abbildung 5.13: Einfluss des Wasserstoffpartialdruckes (p_{H_2}) auf die Biotrockenmasse- (A), Acetat- (B) und Formiatbildung (C) sowie die Wasserstoffaufnahme (D). Die Satzkultivierung bei einem p_{H_2} von 400 mbar (Systemdruck 1,0 bar) ist durch weiße (in Teilabbildung D durch hellgraue) Symbole, die Satzkultivierung bei einem p_{H_2} von 1400 mbar (Systemdruck 3,5 bar) durch dunkelgraue Symbole und die Satzkultivierung bei einem p_{H_2} von 2100 mbar (Systemdruck 3,5 bar) durch schwarze Symbole dargestellt. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 $L h^{-1}$ begast.

Durch die Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes konnte außerdem eine deutlich veränderte Wasserstoffaufnahme festgestellt werden. Bei dem niedrigsten Partialdruck (p_{H_2} 400 mbar) wird bereits nach 0,4 Tagen eine maximale Aufnahme von

137,3 mmol L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Durch die Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes auf 1400 mbar wird das Maximum zwar zur gleichen Prozesszeit (0,4 Tagen) erreicht, jedoch werden nur 117,0 mmol L⁻¹ h⁻¹ aufgenommen. Bei einem Wasserstoffpartialdruck von 2100 mbar werden hingegen erst nach einem Tag nur maximal 60,8 mmol L⁻¹ h⁻¹ aufgenommen.

5.4.3 Diskussion

Mit einer Henry Konstante von 0,75 mmol L⁻¹ bar⁻¹ ist Wasserstoff im Vergleich zu Kohlenstoffdioxid (23,39 mmol L⁻¹ bar⁻¹) in wässrigen Systemen schwer löslich (Wilhelm et al. 1977). Somit stellt Wasserstoff als gasförmiges Substrat während der Gasfermentation mit *A. woodii* einen möglichen prozesslimitierenden Parameter dar. Um die Löslichkeit von Wasserstoff zu steigern, wurde *A. woodii* im Druckreaktor bei einem Systemdruck von 3,5 bar kultiviert. Diese Druckerhöhung resultierte in einer erniedrigten Biomasse- sowie Acetatbildung, wohingegen die Bildung des Nebenproduktes Formiat zunahm (siehe Tabelle 5.3).

Da Gasfermentationen mit *A. woodii* in Anaerobflaschen sowie im 1 L-Rührkesselreaktor, bei denen die Formiatkonzentration manuell auf 6 g L⁻¹ erhöht wurde (Daten nicht gezeigt), keine Verschlechterungen des Prozess mit sich brachten, kann das schlechtere Wachstum sowie die Acetatbildungsrate nicht auf die erhöhten Formiatkonzentrationen im Reaktionsmedium zurückgeführt werden.

Inwieweit das schlechtere Wachstum sowie die erhöhte Nebenproduktbildung ausschließlich auf die Erhöhung des Systemdruckes zurückzuführen ist oder ob die damit verbundene Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes einen negativen Einfluss ausübt, wurde durch eine weitere Gasfermentation bei 3,5 bar absolut und einem p_{H₂} von 2100 mbar geklärt. Hierbei zeigte sich eine weitere Verschlechterung des Wachstums sowie der volumetrischen Acetatbildungsrate, während die volumetrische Formiatbildungsrate erhöht war. Zusätzlich konnte eine deutliche Veränderung der Gasaufnahmeraten festgestellt werden. Die Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes führt zunächst zu einer Erniedrigung der maximalen Wasserstoffaufnahme. Bei einem Wasserstoffpartialdruck von 2100 mbar wurde die maximale Aufnahme rate außerdem erst 0,6 Tage später erreicht.

Tabelle 5.3: Spezifische Raten (maximale Wachstumsrate, volumenspezifische Acetat- und Formiatbildungsrate) bei autotrophen Satzprozessen mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen System- sowie Wasserstoffpartialdrücken und Endkonzentrationen an Acetat und Formiat.

$p\text{H}_2$, mbar	Systemdruck, bar	μ_{max} , d^{-1}	C_{Acetat} , g L^{-1}	r_{Acetat} , $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	C_{Formiat} , g L^{-1}	r_{Formiat} , $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
400	1,0	$1,11 \pm 0,01$	59,3	43,7	0,4	0,1
1400	3,5	$1,11 \pm 0,01$	45,3	37,2	4,2	1,5
2100	3,5	$0,3 \pm 0,02$	29,2	15,7	7,3	1,8

Der Einfluss hoher Wasserstoffpartialdrücke auf *A. woodii* wurde bislang ausschließlich in begasten Anaerobflaschen untersucht. Dabei konnte bei heterotrophen Kultivierungen und unter Begasung des Kopfraums mit Wasserstoff und Stickstoff in unterschiedlichen Verhältnis bereits in Anwesenheit von 10% Wasserstoff eine 90%ige Inhibierung des Wachstums und der Acetatproduktion ermittelt werden (Braun et al. 1981). Peters et al. (1999) untersuchten ebenfalls die Wirkung des Wasserstoffpartialdrucks auf *A. woodii* in begasten Anaerobflaschen und berichteten erstmalig über eine gesteigerte Formiatproduktion durch Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes, wobei der maximal eingesetzte $p\text{H}_2$ nur 500 mbar betrug. Sie schlussfolgerten, dass durch die höhere Verfügbarkeit der gasförmigen Substrate in der Flüssigphase die Bildung von Formiat erhöht werden kann, der Zelle jedoch nicht genügend ATP zur Verfügung steht um Formiat im Methylzweig des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweges weiter umzusetzen. Das Nebenprodukt akkumuliert somit intrazellulär und wird bei Überschreiten eines kritischen Schwellenwertes aus der Zelle geschleußt. Welche Enzyme im Metabolismus von *A. woodii* genau von der Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes beeinflusst werden, wurde noch nicht untersucht. Allerdings konnte für den acetogenen Mikroorganismus *Clostridium* sp. ATCC 29797 bei Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes eine geringere Aktivität der elektronenübertragende [FeFe]-Hydrogenase festgestellt werden (Schmidt et al. 1986). Da es sich hierbei um ein Schlüsselenzym für die Elektronenübertragung von Wasserstoff auf NADH sowie Ferredoxin in acetogenen Mikroorganismen handelt (siehe Kapitel 3.1.3), ist von einem ähnlichen Einfluss auf *A. woodii* auszugehen. Dementsprechend würde dem Organismus für die Umsetzung von Formiat nicht nur ATP sondern auch Redoxäquivalente fehlen. Darüber hinaus untersuchten Schuchmann et al. (2013) die Kohlenstoffdioxidreduktase von

A. woodii, welche die Umsetzung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Formiat katalysiert. Innerhalb ihrer Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym für die Bildung von Formiat keine weiteren zellulären Elektronenübertragungssysteme benötigt und die Umsetzung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid somit unabhängig vom übrigen Metabolismus von *A. woodii* katalysiert werden kann. Die gesteigerte Formiatbildung kann folglich durch die eigenständige Umsetzung der Kohlenstoffdioxidreduktase bei Erhöhung der Partialdrücke erklärt werden, wobei die weitere Katalyse von Formiat durch den Mangel an Redoxäquivalenten und Energie bei hohen Wasserstoffpartialdrücken inhibiert ist.

5.5 Untersuchungen zur Nebenproduktbildung (Formiat) mit rekombinanten *Acetobacterium woodii* Stämmen

Unter Bezugnahme auf die Publikation von Straub et al. (2014) wurden Satzprozesse mit rekombinanten *A. woodii* Stämmen durchgeführt, um den Einfluss des Wasserstoffpartialdruckes sowie der Natriumionenkonzentration auf diese Stämme zu untersuchen und Engpässe im Metabolismus von *A. woodii* besser identifizieren zu können.

Für ein besseres Verständnis ist in Abbildung 5.14 der Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg schematisch dargestellt, wobei die rekombinanten Stämme von Straub et al. (2014) folgendermaßen gekennzeichnet sind: Der Stamm *A. woodii* pJIR750_THF enthält zusätzlich die Gene für die Überexpression der vier THF-abhängigen Enzyme Formyl-THF-Synthetase, Formyl-THF-Cyclohydrolase, Methylen-THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase (Kennzeichnung durch rote Pfeile) aus *C. ljungdahlii*, welche die folgenden Schritte nach der Bildung von Formiat katalysieren. Dadurch sollte die Weiterverarbeitung des Zwischenprodukts Formiat über den Methylzweig beschleunigt und ein möglicher Engpass im Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg umgangen werden. Der Stamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack enthält hingegen zusätzlich die Gene für die Überexpression der Enzyme Phosphotransacetylase (pta) und Acetatkinase (ack) (Kennzeichnung durch blaue Pfeile) aus *C. ljungdahlii*, welche die terminalen Reaktionen des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweges katalysieren. Hierdurch sollte die Acetatbildungsrate gesteigert und eine Akkumulation der Intermediate verhindert werden.

Beide rekombinanten Stämme wurden bereits von Demler (2012) im 1 L-Rührkesselreaktor bei einem Systemdruck von 1,0 bar ($p_{H_2} = 400$ mbar, $p_{CO_2} = 100$ mbar) eingesetzt, wobei

die Biotrockenmasse- und Produktbildung durch die Überexpression der oben genannten Enzyme jeweils um etwa 12% im Vergleich zum Stamm mit Leerplasmid verbessert werden konnte. Aufgrund des Einflusses des Systemdrucks auf das Produktspektrum (siehe Kapitel 5.4) von *A. woodii* sowie der Steigerung der Biotrockenmasse- sowie Acetatbildung durch die Gasfermentation bei einer geeigneten Natriumionenkonzentration (siehe Kapitel 5.2) wurden die rekombinanten Stämme im Laborbioreaktor bei einem Systemdruck von 3,5 bar erneut kultiviert und der Einfluss der Natriumionenkonzentration untersucht.

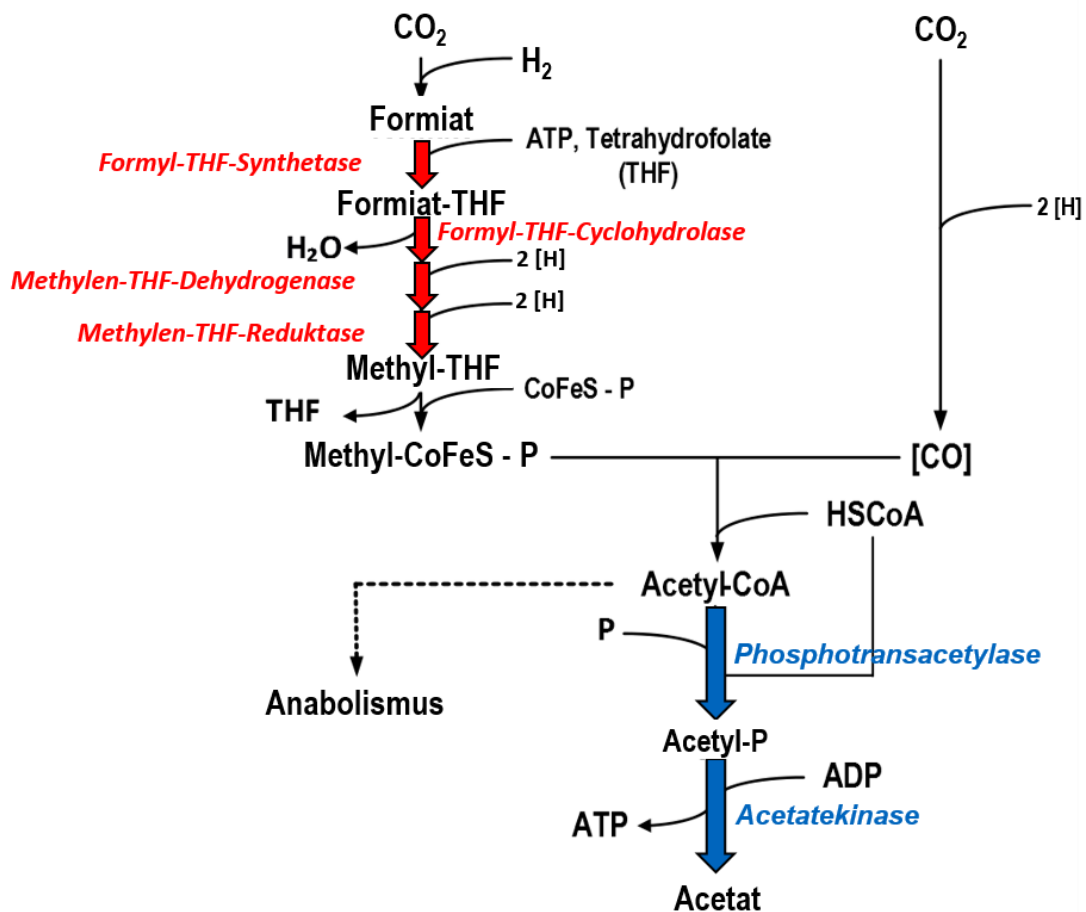


Abbildung 5.14: Schema des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweges zur Darstellung der gentechnisch veränderten *A. woodii* Stämme. Der Stamm *A. woodii* pJIR750_THF trägt die Überexpressionen der vier THF-abhängigen Enzyme (Kennzeichnung durch rote Pfeile) aus *C. ljungdahlii*. Der Stamm *A. woodii* pJIR750_pta-ack trägt die Überexpressionen der Enzyme Phosphotransacetylase (pta) und Acetatkinase (ack) (Kennzeichnung durch blaue Pfeile) ebenfalls aus *C. ljungdahlii*.

5.5.1 Bedeutung des Systemdruckes

Um den Einfluss des Systemdruckes auf die gentechnisch modifizierten Bakterienstämme *A. woodii* pJIR750_THF sowie *A. woodii* pJIR750_pta-ack zu untersuchen, wurden diese im 1 L-Rührkesselreaktor bei 3,5 bar absolut eingesetzt, was zu einer Steigerung des Eingangswasserstoffpartialdrucks (p_{H_2}) auf 1400 mbar sowie des Eingangskohlenstoffdioxidpartialdruckes (p_{CO_2}) auf 595 mbar führte. Die Ergebnisse dieser Satzprozesse sind im Vergleich zum Satzprozess mit *A. woodii* Wildtyp in der nachfolgenden Abbildung 5.15 dargestellt.

In Bezug auf die Biotrockenmassebildung wird ersichtlich, dass beide rekombinanten Stämme deutlich höhere Wachstumsraten und dadurch auch maximale Biotrockenmassekonzentrationen erreichten als der Wildtyp. Nach circa einem Tag betrug die maximal gebildete Biotrockenmassekonzentration der rekombinanten Stämme $3,4 \text{ g L}^{-1}$ (*A. woodii* pJIR750_THF) und $3,5 \text{ g L}^{-1}$ (*A. woodii* pJIR750_pta-ack), die des Wildtyps hingegen nur $2,6 \text{ g L}^{-1}$. Während der gesamten Prozesszeit verhielt sich die Biotrockenmassebildung von *A. woodii* pJIR750_THF und pJIR750_pta-ack ähnlich, die Zellkonzentrationen der Gasfermentation mit dem Wildtyp lagen stets darunter.

Bei Gegenüberstellung der gebildeten Acetatkonzentrationen wurden die höchsten Produktkonzentrationen bei dem Stamm *A. woodii* pJIR750_THF beobachtet. Am Ende der Satzprozesse, nach einer Prozesszeit von 3,1 Tagen, wurden finale Acetatkonzentrationen von $50,3 \text{ g L}^{-1}$ für *A. woodii* pJIR750_THF, $47,3 \text{ g L}^{-1}$ für *A. woodii* pJIR750_pta-ack und $45,3 \text{ g L}^{-1}$ für den Wildtyp gemessen.

Im direkten Vergleich der gebildeten Formiatkonzentrationen konnte für die Gasfermentation mit dem Wildtyp die höchste Formiatbildung ($4,2 \text{ g L}^{-1}$) festgestellt werden. Deutlich weniger Formiat bildeten die rekombinanten Stämme: $3,6 \text{ g L}^{-1}$ (*A. woodii* pJIR750_THF) und $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (*A. woodii* pJIR750_pta-ack).

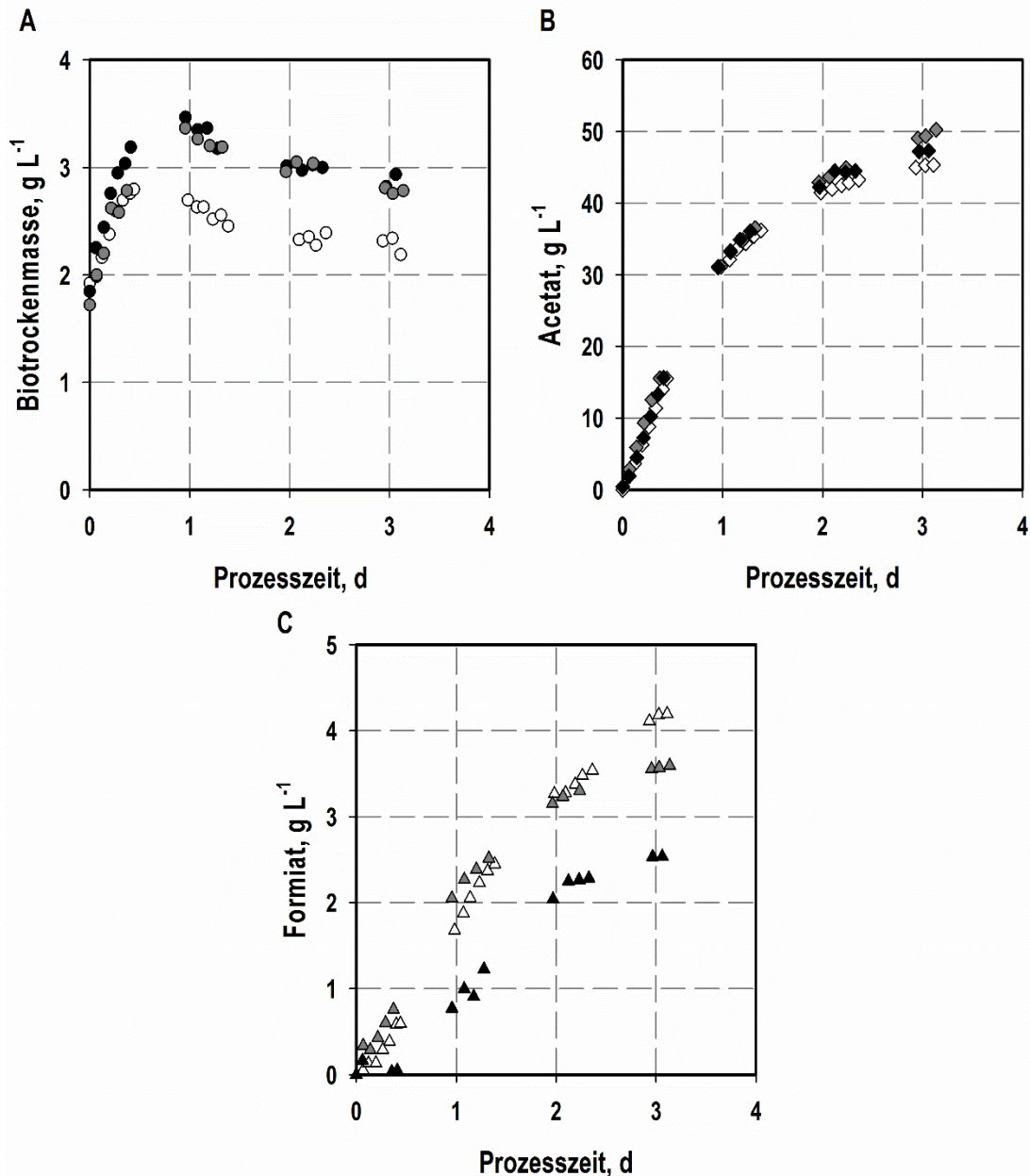


Abbildung 5.15: Vergleich der Biotrockenmasse- sowie Produktbildung von *A. woodii* Wildtyp (weiße Symbole), *A. woodii* pJIR750_THF (graue Symbole) und *A. woodii* pJIR750_pta-ack (schwarze Symbole). Dargestellt ist der Einfluss auf die Biotrockenmasse- (A), Acetat- (B) und Formiatbildung (C) während der autotrophen Satzkultivierung unter einem Systemdruck von 3,5 bar. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm, 50 mM NaHCO₃ und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 1400 mbar und einem p_{CO₂} von 595 mbar begast.

5.5.2 Bedeutung der Natriumionenkonzentration

Nachdem durch Erhöhung des Systemdrucks bei der Gasfermentation mit den rekombinanten Stämme von *A. woodii* im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Wildtyp eine Steigerung der Biotrockenmasse- sowie Acetatproduktion und eine Erniedrigung der Formiatbildung zu beobachten war, wurde außerdem der Einfluss der optimalen Natriumionenkonzentration untersucht und mit *A. woodii* Wildtyp verglichen (siehe Abbildung 5.16).

Bei Betrachtung der gebildeten Biotrockenmassekonzentrationen mit dem Wildtyp kann bei der Gasfermentation mit 50 mM Na⁺ nach 0,4 d⁻¹ eine maximale Zellkonzentration von 2,8 g L⁻¹ nachgewiesen werden, obwohl nur mit einer Biotrockenmassekonzentration von 1,9 g L⁻¹ inokuliert wurde. Nach einer Prozesszeit von einem Tag lagen die Biotrockenmassekonzentrationen stets über denen der Gasfermentation mit 120 mM Na⁺. Darüber hinaus konnte die Acetatproduktion deutlich gesteigert werden. Nach etwa 3,1 Tagen wurden bei der Gasfermentation mit 120 mM Na⁺ nur 36,5 g L⁻¹ Acetat, bei verringerter Natriumionenkonzentration 45,3 g L⁻¹ Acetat gebildet. Im Gegensatz dazu konnte die Nebenproduktbildung bei der Gasfermentation mit 50 mM Na⁺ reduziert werden. Hierbei wurde nach 3,1 Tagen eine finale Formiatkonzentration von 4,2 g L⁻¹ gemessen, wohingegen die Formiatkonzentration in Anwesenheit von 120 mM Na⁺ zu diesem Zeitpunkt 6,0 g L⁻¹ betrug und weiter zunahm.

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen konnte bei *A. woodii* pJIR750_THF ein Einfluss der Natriumionenkonzentration nur auf die Produkt- und nicht auf die Biotrockenmassebildung festgestellt werden. Im direkten Vergleich der Biotrockenmassekonzentrationen wird ersichtlich, dass unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Animpfdichten das Wachstum von *A. woodii* pJIR750_THF nicht signifikant beeinflusst wurde. Im Laufe der Satzkultivierung wurde allerdings eine geringere Absterberate bei niedrigen Natriumkonzentrationen deutlich. Ebenso kann eine erhöhte Acetatproduktion erst am Ende der Gasfermentation gemessen werden: 50,3 g L⁻¹ Acetat (bei 50 mM Na⁺) und 47,4 g L⁻¹ (bei 120 mM Na⁺). Bei niedrigen Natriumionenkonzentrationen konnten außerdem niedrigere Formiatkonzentrationen nachgewiesen werden. Nach 3,1 Tagen wurden bei extrazellulären Konzentrationen von 50 mM Na⁺ nur 3,6 g L⁻¹ Formiat gebildet. Im Vergleich dazu werden bei 120 mM NaHCO₃ zu diesem Zeitpunkt 5,5 g L⁻¹ Formiat gemessen, wobei weitaus höhere Konzentrationen bei längeren Prozesszeiten anzunehmen sind.

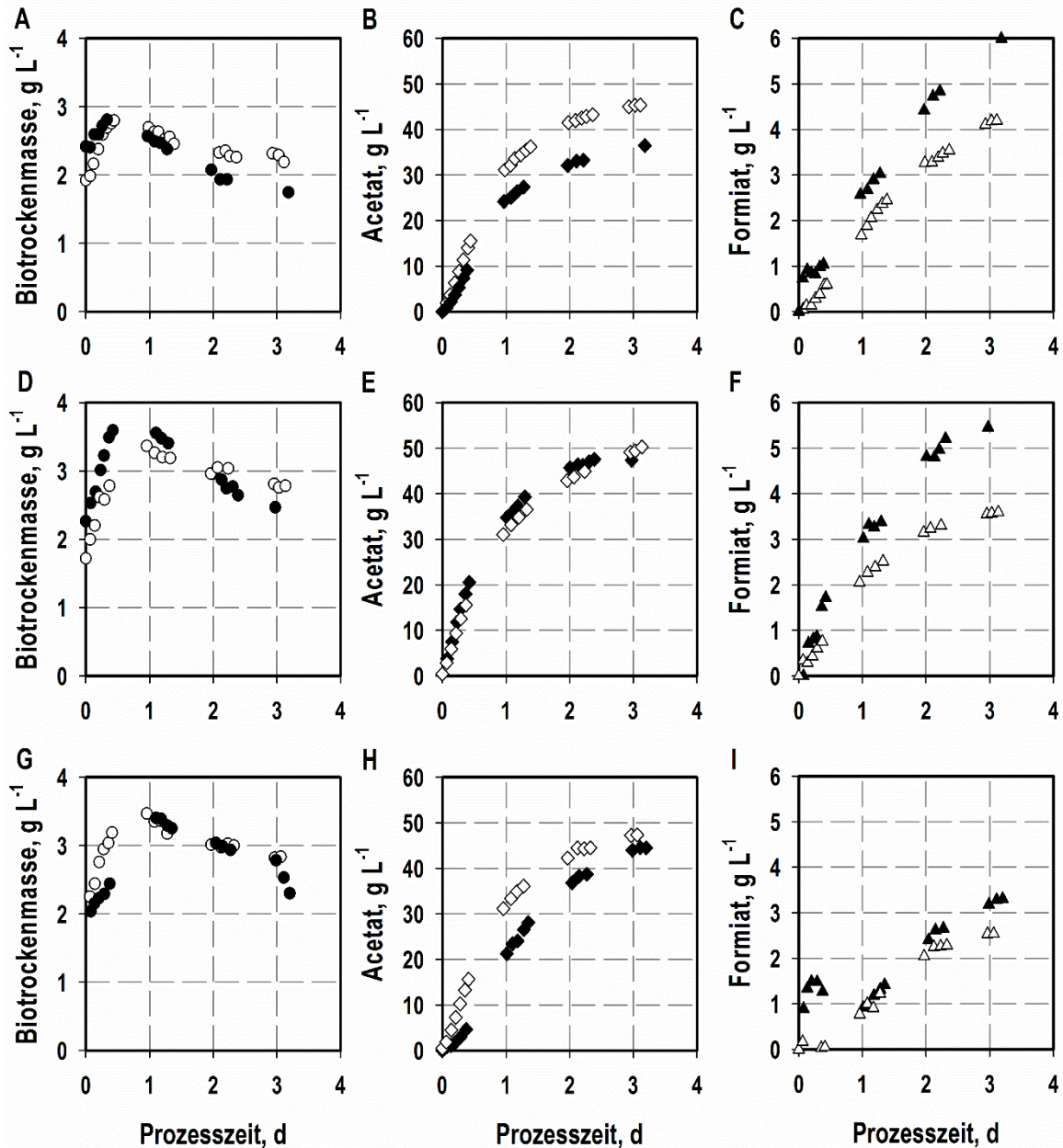


Abbildung 5.16: Einfluss der Natriumionenkonzentration auf die Biotrockenmasse- (Kreise), Acetat- (Rauten) und Formiatbildung (Dreiecke) von *A. woodii* Wildtyp (A – C), *A. woodii* pJIR750_THF (D – F) und *A. woodii* pJIR750_pta-ack (G – I) bei einem Systemdruck von 3,5 bar. Die Satzkultivierungen mit 120 mM NaHCO₃ und Titration mit Natriumhydroxid sind durch schwarze Symbole, die Satzkultivierungen mit 50 mM NaHCO₃ und Titration mit Kaliumhydroxid sind durch weiße Symbole dargestellt. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 1400 mbar und einem p_{CO₂} von 595 mbar begast.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Gasfermentationen mit dem Stamm *A. woodii* pJR750_pta-ack. Auch hier konnte die Biotrockenmassebildung durch Reduktion der Natriumionenkonzentration gesteigert und somit während des gesamten Prozesszeitraumes höhere Zellkonzentrationen festgestellt werden. Dementsprechend wurden deutlich höhere Acetatkonzentrationen unmittelbar nach der Inokulation gemessen. Dennoch betrug der Unterschied der finalen Produktkonzentrationen nur $2,86 \text{ g L}^{-1}$ ($47,3 \text{ g L}^{-1}$ bei 50 mM NaHCO_3 ; $44,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 120 mM NaHCO_3), was auf die geringere Acetatbildung nach einer Prozesszeit von 2,0 Tagen bei niedrigen Natriumkonzentrationen zurückzuführen ist. Trotz der erhöhten Acetatkonzentrationen konnte die Formiatproduktion nur wenig reduziert und am Ende der Gasfermentation nur $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (50 mM Na^+) im Vergleich zu $3,3 \text{ g L}^{-1}$ Formiat bei einer Natriumionenkonzentration von 120 mM nachgewiesen werden.

Bei allen drei Gegenüberstellungen ist bei Verwendung von 120 mM NaHCO_3 sowie dem Titrationsmittel Natriumhydroxid innerhalb der ersten 1,5 Tage zunächst eine gesteigerte Formiatproduktion zu beobachten, die stagniert oder aber bei der Gasfermentation mit *A. woodii* pJR750_pta-ack sogar abnimmt, bevor eine erneute Formiatproduktion einsetzt, die bis zum Ende des Prozesses anhält. Dies konnte bei keiner der dargestellten Gasfermentationen mit 50 mM NaHCO_3 und dem Titrationsmittel Kaliumhydroxid festgestellt werden.

5.5.3 Diskussion

Um mögliche enzymatische Limitierungen bei der autotrophen Acetatproduktion von *A. woodii* zu untersuchen, wurde der Mikroorganismus durch Straub et al. (2014) gentechnisch modifiziert. Basierend auf den Ergebnissen von Peters et al. (1999), die aufgrund der erhöhten Formiatkonzentrationen beim wasserstoffabhängigen Wachstum von acetogenen Bakterien einen Engpass bei der ATP-abhängigen Bildung von Formyl-THF ausgehend von Formiat feststellten, wurden in *A. woodii* selektiv zwei Gengruppen überexprimiert, um den Kohlenstofffluss im Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg zu steigern und die Bildung von Acetat zu erhöhen (siehe Abbildung 5.14). Da zum Zeitpunkt der Stammentwicklung das Genom von *A. woodii* noch nicht entschlüsselt war, wurden die Gensequenzen entsprechender Enzyme des naheverwandten *C. ljundahlia* herangezogen. Dadurch konnten erste Verbesserungen der zellspezifischen Acetatbildungsraten sowie der finalen Acetatkonzentration erzielt werden (Demler 2012).

Unter Berücksichtigung dieser Resultate konnte nun der Einfluss des Systemdruckes und der Natriumionenkonzentration auf die rekombinanten *A. woodii* Stämme untersucht und die daraus enthaltenen spezifischen Raten in Tabelle 5.4 zusammengefasst werden. Im direkten Vergleich der Gasfermentation mit dem Wildtyp und den rekombinanten Stämmen bei einem Systemdruck von 3,5 bar, konnte durch die Überexpression der Enzyme im Methylzweig oder der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase sowohl das Wachstum als auch die Acetatbildung gesteigert und die Bildung von Formiat verringert werden. Bei Überexpression der Enzyme Formyl-THF-Synthetase, Formyl-THF-Cyclohydrolase, Methylen-THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase wird die finale Acetatkonzentration um 11% erhöht und die finale Formiatkonzentration um 14% erniedrigt. Der verbesserte Kohlenstofffluss durch den Methylzweig des Stoffwechselweges fördert somit die Acetatproduktion. Dennoch werden die gemessenen Formiatkonzentrationen im Vergleich zu *A. woodii* Wildtyp nur geringfügig verändert, was auf einen noch vorhandenen Energiemangel zurückgeführt werden könnte (Peters et al. 1999). Die Überexpression der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase in *A. woodii* pJIR750_pta-ack bewirkt hingegen eine nur 4,4% Erhöhung der Acetatproduktion, jedoch eine 41,7% Erniedrigung der Formiatbildung. Letztere ist möglicherweise durch die schnellere Rückgewinnung von ATP bei der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat aufgrund der höheren Enzymkonzentration der Acetatkinase zurückzuführen. Da Formiat als einziges Zwischenprodukt gemessen werden konnte, lässt sich abschließend nicht klären ob weitere enzymatische Limitierungen vorliegen beziehungsweise ob durch die Überexpression ausgewählter Enzyme der Metabolismus an anderen Stellen negativ beeinflusst wird.

Mit Hilfe der rekombinanten Stämme lassen sich somit zwei Engpässe im Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg, im Methylzweig sowie bei den terminalen Reaktionen zur Umsetzung von Acetyl-CoA, identifizieren. Darüber hinaus ist von einer weiteren Steigerung der Biotrockenmasse- sowie Produktbildung auszugehen, wenn im Stoffwechselweg sowohl die Enzyme des Methylzweigs als auch die Phosphotransacetylase und Acetatkinase überexprimiert werden könnten. Die Veröffentlichung des Genoms von *A. woodii* durch Poehlein et al. (2012) sollte außerdem die Analyse weiterer Engpässe bei der autotrophen Acetatproduktion aufdecken und somit die zielgerichtete Änderung des Metabolismus ermöglichen (Straub et al. 2014).

Tabelle 5.4: Zellspezifische Raten (maximale Wachstumsrate, zellspezifische Acetatbildungsrate) bei autotrophen Satzprozessen mit *A. woodii* Wildtyp, pJIR750_THF und pJIR750_pta-ack im 1 L-Rührkesselreaktor bei einem Systemdruck von 3,5 bar und verschiedenen Natriumionenkonzentrationen für die exponentielle Wachstumsphase und Endkonzentration an Acetat und Formiat.

A. woodii Stamm	NaHCO ₃ , mM	μ_{\max} , d ⁻¹	C _{Acetat} , g L ⁻¹	Q _{Acetat} , g g ⁻¹ d ⁻¹	C _{Formiat} , g L ⁻¹	Q _{Formiat} , g g ⁻¹ d ⁻¹
Wildtyp	50	1,18	45,3	14,52	4,2	0,65
Wildtyp	120	0,55	36,5	9,28	6,0	2,76
pJIR750_THF	50	1,2	50,3	17,92	3,6	0,80
pJIR750_THF	120	1,2	47,4	16,34	5,5	1,48
pJIR750_pta-ack	50	1,0	47,3	14,43	2,5	(3,54)
pJIR750_pta-ack	120	0,46	44,5	9,50	3,3	-

Wie bereits bei dem Satzprozess mit *A. woodii* Wildtyp unter Atmosphärendruck (siehe Kapitel 5.2) konnte auch bei einem Systemdruck von 3,5 bar das Wachstum sowie die Produktbildung der rekombinanten Stämme durch Absenkung der Natriumionenkonzentration auf 50 mM und Verwendung von Kaliumhydroxid als Titrationsmittel verbessert werden. Mit Ausnahme von *A. woodii* pJIR750_THF bewirkten niedrigere NaHCO₃-Konzentrationen stets mehr als eine Verdopplung der maximalen Wachstumsrate.

Darüber hinaus konnten aber auch die zellspezifischen Acetatbildungsraten in Anwesenheit von 50 mM Na⁺ bei dem Satzprozess mit *A. woodii* pJIR750_THF um 10% und bei *A. woodii* Wildtyp sowie *A. woodii* pJIR750_pta-ack sogar um 57% oder 52% gesteigert werden. Entsprechend wurde die zellspezifische Formiatbildungsrate bei allen Gasfermentationen mit 50 mM Na⁺ gesenkt. Bei *A. woodii* pJIR750_pta-ack ist eine Ermittlung der zellspezifischen Formiatbildungsrate nur eingeschränkt (120 mM Na⁺) oder gar nicht (50 mM Na⁺) möglich, da hier während der exponentiellen Wachstumsphase wenig oder gar kein Formiat gebildet wurde. Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben beeinflusst die Natriumkonzentration primär die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten über die Membran zur Gewinnung von Energie in Form von ATP in *A. woodii*. Der Zelle steht bei der geeigneten Natriumkonzentration (50 mM) folglich mehr ATP zur Verfügung, was sich in verbesserten Wachstums- sowie

Acetatbildungsraten zeigt. Im Gegensatz zu dem rekombinanten Stamm *A. woodii* pJIR750_THF, bei dem die niedrigere Natriumkonzentration aus den eben beschriebenen Gründen vor allem einen Effekt auf die gebildeten Formiatkonzentration hat, kann bei *A. woodii* pJIR750_pta-ack durch Absenken der Natriumkonzentration überwiegend die Acetatbildung gesteigert und die Formiatbildung nur geringfügig reduziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass bereits die Überexpression der Phosphotransacetylase sowie der Acetatkinase den Energiemangel durch eine gesteigerte ATP-Generierung bei der Umsetzung von Acetyl-Phosphat zu Acetat durch diese Enzyme ausgleicht. Die verbesserte Acetatbildung bei 50 mM NaHCO₃ deutet daraufhin, dass die Natriumionenkonzentration einen weiteren, noch unbekanntem Einfluss auf den Metabolismus von *A. woodii* ausübt und müsste für zukünftige gentechnische Veränderungen weiter untersucht werden.

6 Reaktionstechnische Charakterisierung bei kontinuierlicher Prozessführung ¹

In den vorangegangenen Kapiteln wurden reaktionstechnische Untersuchungen der Umsetzung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff durch *A. woodii* zu Acetat im Satzverfahren beschrieben. Bei diesen Satzkultivierungen kann aufgrund der geringen Biotrockenmassebildung von limitierenden und / oder inhibierenden Faktoren ausgegangen werden. Hierbei sind Limitierungen einer oder mehrerer Medienkomponenten im Laufe der Prozesszeit sowie eine Inhibierung aufgrund der steigenden Acetatkonzentrationen im Reaktionsmedium denkbar. Die Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung stellt einen Ansatz dar, um Medienlimitierungen durch kontinuierliche Medienversorgung oder eine Produktinhibierung durch ständigen Entzug dieser Produktionslösung, zu umgehen. Da dabei aber gleichzeitig kontinuierlich Zellen entzogen werden, ist eine Verweilzeitkopplung über eine Mikrofiltrationseinheit im kontinuierlichen Prozess sinnvoll.

6.1 Kontinuierliche Prozessführung ohne Zellrückhaltung

Die kontinuierliche Prozessführung wurde ausgehend von der Satzkultivierung von *A. woodii* durchgeführt. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, 6,8 h nach Inokulation wurde mit der kontinuierlichen Zu- sowie Abführung des Reaktionsmediums begonnen. Die Durchflussrate wurde hierfür auf $0,035 \text{ h}^{-1}$ ($2/3 \mu_{\max}$) eingestellt, wodurch sich eine Verweilzeit von 28,6 h ergab. Um von einem 99,9% Austausch des Reaktionsmediums ausgehen zu können, wurde die kontinuierliche Prozessführung mindestens bis zum Erreichen von fünf hydraulischen Verweilzeiten durchgeführt.

¹ Teile dieses Kapitels sind publiziert in Kantzow et al. (2015): Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. J Biotechnol 212: 11-18

Die Ergebnisse eines exemplarischen kontinuierlichen Prozesses sind in Abbildung 6.1 dargestellt, wobei der Beginn der kontinuierlichen Prozessführung durch die vertikale Linie verdeutlicht ist. Nach Inokulation steigt die Biotrockenmassekonzentration nach der Satzphase (bis etwa 6,8 h) auf $2,9 \text{ g L}^{-1}$. Im Verlauf der ersten drei Kultivierungstage sinkt die Biotrockenmassekonzentration mit Beginn der kontinuierlichen Prozessführung aufgrund des Austrags der Bakterienzellen aus dem Rührkesselreaktor. Ab 3,9 Tagen ist eine konstante Biotrockenmassekonzentration von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ messbar, welche für weitere drei Verweilzeiten aufrechterhalten werden kann. Somit ist in Bezug auf die gebildete Biotrockenmasse das Einstellen eines Fließgleichgewichts nach 3,9 Tagen zu beobachten.

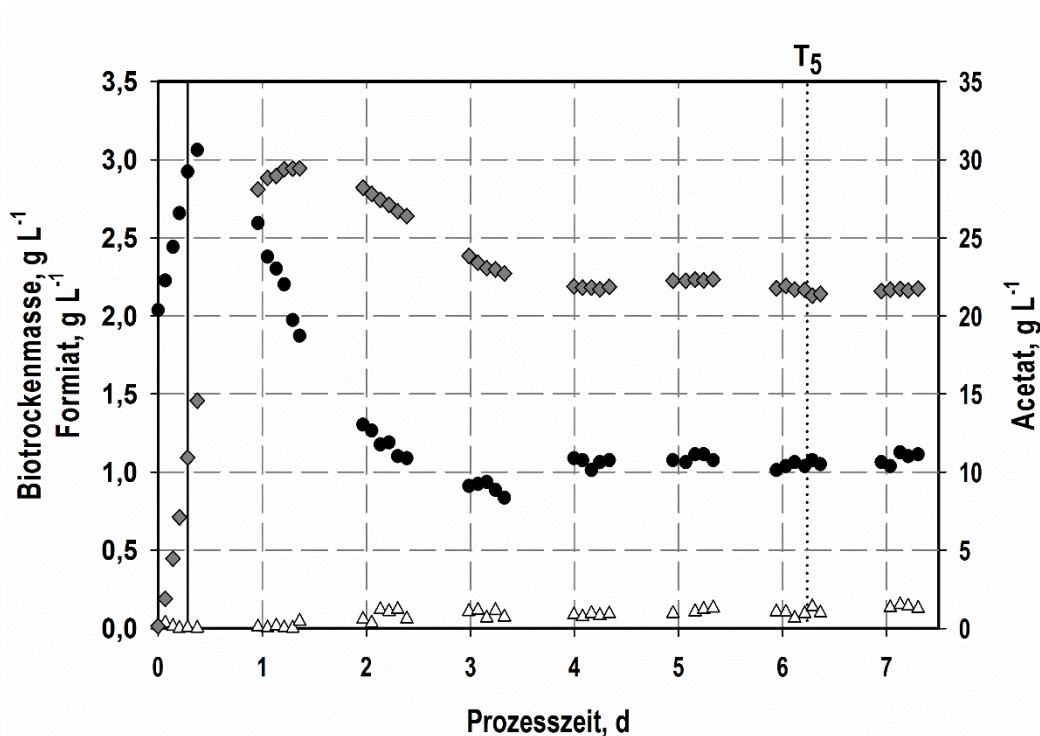


Abbildung 6.1: Darstellung der zeitlichen Verläufe der Biotrockenmasse- (●), Acetat- (◆) und Formiatkonzentration (△) über die Prozesszeit bei kontinuierlicher, autotropher Gasfermentation mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor. Mit dem kontinuierlichen Austausch ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) des Reaktionsmediums wurde nach 6,8 h (durchgezogene, vertikale Linie) begonnen. Ein 99,9% Austausch des Reaktionsmediums ist nach 6,2 Tagen erreicht (gepunktete, vertikale Linie). Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem $p\text{H}_2$ von 400 mbar und einem $p\text{CO}_2$ von 167 mbar begast.

Bei der Konzentration von Acetat ist bis zu einer Prozesszeit von 1,3 Tagen eine stetige Zunahme bis zu einer Konzentration von $29,4 \text{ g L}^{-1}$ festzustellen. Anschließend sinkt die Acetatkonzentration auf $21,9 \text{ g L}^{-1}$ und erreicht nach etwa 3,9 Tagen den Zustand des Fließgleichgewichts. Von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende der Gasfermentation ist eine annähernd konstant bleibende Acetatkonzentration von $22,0 \text{ g L}^{-1}$ nachweisbar.

Der Metabolit Formiat wird nach einer Prozesszeit von 2,0 Tagen gebildet und ist von diesem Zeitpunkt an mit einer Konzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ messbar.

Die aus der Abgasanalytik erhaltenen Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten bei der kontinuierlichen Prozessführung sind in Abbildung 6.2 A dargestellt. Auch hier ist der Beginn der kontinuierlichen Prozessführung durch die vertikale Linie nach 6,8 h gekennzeichnet. Die Gasaufnahmeraten beider Gase nehmen während des exponentiellen Zellwachstums in der Satzphase zu. Nach 10 h konnten maximale Aufnahmeraten für Wasserstoff ($124,9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Kohlenstoffdioxid ($67,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) gemessen werden. Anschließend nahm sowohl die Wasserstoff- als auch die Kohlenstoffdioxidaufnahmerate ab. Beide Gase werden entsprechend der Reaktionsgleichung für die Bildung von Acetat gleichzeitig aufgenommen (siehe Gleichung 3.3). Aus der Auftragung ist außerdem ersichtlich, dass entsprechend der Stöchiometrie des Wood-Ljungdahl Stoffwechsels während der ersten 3,0 Tage doppelt so viel Wasserstoff wie Kohlenstoffdioxid aufgenommen wird. Nach einem Kultivierungszeitraum von 3,0 Tagen stellt sich für Kohlenstoffdioxid eine konstante Aufnahmerate von $23,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ein. Bezüglich der gemessenen Wasserstoffaufnahmeraten wurde nach 3,0 Tagen eine stetige Zunahme ermittelt, was auf fehlerhafte Messungen der μ -Gaschromatographieeinheit zurückgeführt wurde.

Die ebenfalls aus der Abgasanalytik erhaltenen Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrücke am Reaktorausgang sind in Abbildung 6.2 B dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass der gemessene Wasserstoffpartialdruck zunächst auf 300 mbar sinkt, ehe nach 2 Tagen bis zum Ende des Prozesses ein konstanter Partialdruck von 360 mbar zu beobachten ist. Parallel hierzu verläuft der ermittelte Kohlenstoffdioxidpartialdruck. Dieser sinkt zunächst auf 220 mbar, ehe ebenfalls nach 2 Tagen und bis zum Ende der Gasfermentation ein konstanter Kohlenstoffdioxidpartialdruck von 150 mbar gemessen wird.

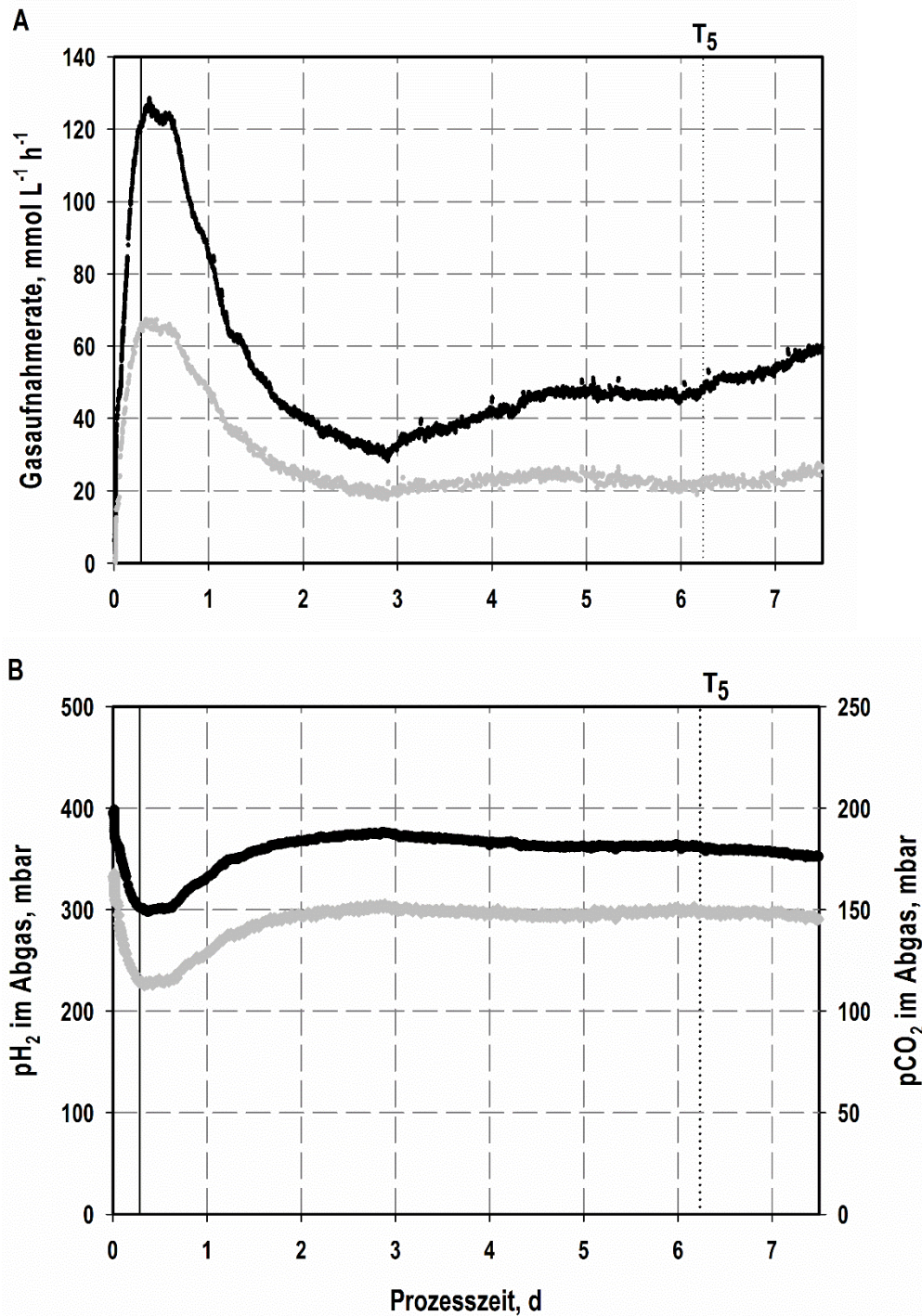


Abbildung 6.2: Der Verlauf der Gasaufnahmeraten von Wasserstoff (●) und Kohlenstoffdioxid (●) über die Prozesszeit bei kontinuierlicher, autotropher Gasfermentation mit *A. woodii* im 1 L-Rührkesselreaktor ist in Teilabbildung A und der Verlauf des Wasserstoffpartialdruckes (●) und des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes (●) ist in Teilabbildung B dargestellt. Mit dem kontinuierlichen Austausch ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) des Reaktionsmediums wurde nach 6,8 h (durchgezogene, vertikale Linie) begonnen. Ein 99,9% Austausch des Reaktionsmediums ist nach 6,2 Tagen erreicht (gepunktete, vertikale Linie). Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar begast.

Die integrale Kohlenstoffbilanz, bei der weder die Biotrockenmasse noch Hefeextrakt, sondern ausschließlich die Kohlenstoffquelle Kohlenstoffdioxid und die gebildeten Produkte Formiat und Acetat berücksichtigt wurden, ist zu 100,7% geschlossen. Dabei wurden 5,57 mol Kohlenstoff in Produkten fixiert und 5,54 mol Kohlenstoff aus der Gasphase aufgenommen. Die Elektronenbilanz, für die die Elektronenquelle Wasserstoff berücksichtigt wurde, konnte zu 106,7% geschlossen werden, wobei 21,41 mol Elektronen aus dem Gas aufgenommen und 22,85 mol Elektronen in Produkten fixiert wurden.

6.2 Kontinuierliche Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung

Eine weitere Erhöhung der Durchflussrate ist aufgrund der geringen Wachstumsrate von *A. woodii* ($0,052 \text{ h}^{-1}$) nicht möglich ohne dabei Gefahr zu laufen, die Zellen vollständig aus dem Rührkesselreaktor zu waschen, weswegen ein eigenhergestelltes Zellrückhaltungssystem aus getauchten Hohlfasermembranen in den Rührkesselreaktor eingebracht wurde. Dieses ermöglicht die Steigerung der Biotrockenmassekonzentration bei einem gleichzeitig kontinuierlichen Auswaschen des Produktes, wobei eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat zu erwarten ist.

6.2.1 Variation der Durchflussraten

Nachfolgend sind die Ergebnisse ausgewählter kontinuierlicher Gasfermentationen mit vollständiger Zellrückhaltung als Funktion der Prozesszeit dargestellt. Ausgehend von der Gasfermentation ohne Zellrückhaltung wurde die Durchflussrate verdoppelt ($0,070 \text{ h}^{-1}$), verfünffacht ($0,175 \text{ h}^{-1}$) sowie verzehnfacht ($0,350 \text{ h}^{-1}$). Aufgrund der Verwendung des Zellrückhaltungssystems konnte unmittelbar nach der Inokulation mit der kontinuierlichen Zuführung des Mediums, sowie der Abführung des Filtrats begonnen werden. Der Prozesszeitpunkt bei dem fünf hydraulische Verweilzeiten und folglich ein 99,9% Austausch des Reaktionsmediums erreicht wurden, ist in der jeweiligen Abbildung durch eine vertikale Linie gekennzeichnet.

Die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, die Kohlenstoffdioxid- und Wasserstoffaufnahmeleistungen sowie der Wasserstoffpartialdruck im Abgas und die Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat sind als Funktion der Prozesszeit bei einer Durchflussrate von $0,070 \text{ h}^{-1}$ in Abbildung 6.3 dargestellt. Wegen der guten chemischen Löslichkeit von

Kohlenstoffdioxid bei pH 7,0 in wässrigen Lösungen wurde auf die Darstellung des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes als Funktion der Prozesszeit verzichtet.

Nach Inokulation mit einer anfänglichen Biotrockenmassekonzentration von $2,4 \text{ g L}^{-1}$ war eine stetige Zunahme der Zellkonzentration nachweisbar, bis nach 1,2 Tagen eine maximale Konzentration von $5,4 \text{ g L}^{-1}$ gebildet wurde. Nachfolgend sank die Biotrockenmassekonzentration nach 2,1 Tagen auf $4,6 \text{ g L}^{-1}$ und stieg schließlich bis Versuchsende kontinuierlich auf eine maximale Biomassekonzentration von $6,1 \text{ g L}^{-1}$ an.

Acetat wurde unmittelbar nach Inokulation gebildet. Die Acetatkonzentration stieg innerhalb von 1,3 Tagen auf ein Maximum von $28,7 \text{ g L}^{-1}$. Anschließend sank die Produktkonzentration bis sich nach 2,9 Tagen und somit nach fünf Verweilzeiten eine Konzentration von $23,4 \text{ g L}^{-1}$ einstellte, die bis zum Ende des kontinuierlichen Prozesses mit einer Abweichung von $\pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ im Rührkesselreaktor nachweisbar war. Formiat konnte während der gesamten Gasfermentation nicht gemessen werden.

Die Kohlenstoffdioxidaufnahmerate stieg parallel zur exponentiellen Wachstumsphase auf ein Maximum von $86 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und fiel darauf auf $56 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Diese Aufnahmerate blieb entsprechend der Acetatbildung bis Versuchsende konstant. Parallel hierzu verlief die Wasserstoffaufnahmerate, wobei eine maximale Aufnahme von $168 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 16,8 h gemessen wurde und sich darauffolgend eine kontinuierliche Aufnahme von $114 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ einstellte. Entsprechend der Stöchiometrie des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels wurde zur Bildung von Acetat stets doppelt so viel Wasserstoff wie Kohlenstoffdioxid aufgenommen.

Der gemessene Wasserstoffpartialdruck am Reaktorausgang sinkt zunächst auf 275 mbar, ehe ein konstanter Partialdruck von 320 mbar zu beobachten ist.

Die erhaltene Raum-Zeit-Ausbeute dieser Gasfermentation verhielt sich analog zur gebildeten Acetatkonzentration. Am Ende konnte eine konstante Ausbeute von $39,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ermittelt werden.

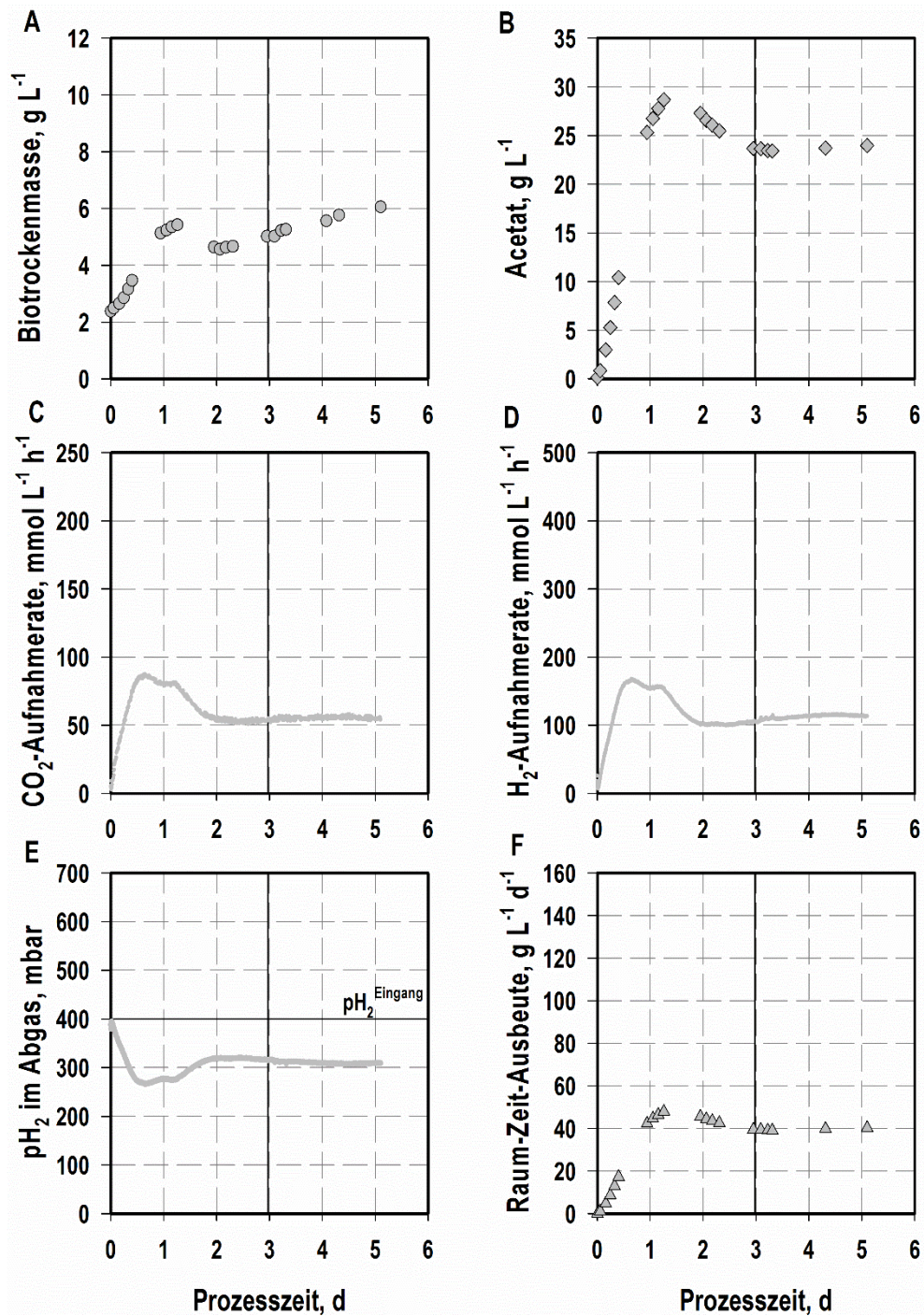


Abbildung 6.3: Autotrophe Gasfermentation mit *A. woodii* bei totaler Zellrückhaltung durch getauchte Hohlfasermembranen im 1 L-Rührkesselreaktor bei einer Durchflussrate von $0,070 \text{ h}^{-1}$. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (A) und Acetatkonzentrationen (B), die Kohlenstoffdioxid- (C) und Wasserstoffaufnahme- (D) sowie der Wasserstoffpartialdruck (E) und die Raum-Zeit-Ausbeute (F) als Funktion der Prozesszeit. Die vertikale Linie kennzeichnet stets den Zeitpunkt (3,0 d) zu dem 99,9% des Reaktionsmediums ausgetauscht und fünf hydraulischen Verweilzeiten erreicht wurden. Die horizontale Linie in Abbildung E gibt den eingestellten Wasserstoffpartialdruck (400 mbar) am Eingang des Reaktors wieder. Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem $p\text{H}_2$ von 400 mbar und einem $p\text{CO}_2$ von 167 mbar begast.

Nachdem erstmalig eine Biotrockenmassekonzentration von $6,1 \text{ g L}^{-1}$ bei der Gasfermentation mit *A. woodii* erreicht werden konnte, wurde die Durchflussrate auf $0,175 \text{ h}^{-1}$ erhöht und erneut der Einfluss auf die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, die Kohlenstoffdioxid- und Wasserstoffaufnahme sowie den Wasserstoffpartialdruck im Abgas und die Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat untersucht (siehe Abbildung 6.4).

Nach Inokulation des Rührkesselreaktors mit einer Biotrockenmassekonzentration von $2,3 \text{ g L}^{-1}$ und Beginn des kontinuierlichen Austausches des Reaktionsmediums nahm die Zellkonzentration kontinuierlich bis zum Ende des Bioprozesses zu. So konnte nach 2,4 Tagen erstmalig eine Konzentration von $10,0 \text{ g L}^{-1}$ bei der Gasfermentation mit *A. woodii* erreicht werden.

Auch die Acetatbildung setzte unmittelbar nach Inokulation ein, erreichte jedoch nach 1,9 Tagen eine maximale Produktkonzentration von $22,1 \text{ g L}^{-1}$, die bis zum Ende des Prozess mit einer Abweichung von $\pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ aufrechterhalten wurde. Erneut wurde die Gleichgewichtskonzentration von Acetat nach fünf hydraulischen Verweilzeiten und somit nach 99,9% Austausch des Mediums erreicht. Wie bereits bei der Gasfermentation mit einer Durchflussrate von $0,070 \text{ h}^{-1}$ konnte auch hier keine signifikante Formiatbildung nachgewiesen werden.

Entsprechend der Bildung von Acetat verliefen die Aufnahmeleistungen von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Mit Beginn des Prozesses stieg die Kohlenstoffdioxidaufnahmerate linear an und näherte sich asymptotisch einer maximalen Aufnahmeleistung von $124 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Diese maximale Kohlenstoffdioxidaufnahmerate konnte bis zum Ende des Prozesses nachgewiesen werden. Die Wasserstoffaufnahme verhielt sich erneut parallel hierzu, wobei stets doppelt so viel Wasserstoff wie Kohlenstoffdioxid aufgenommen wurde. Folglich war nach 1,2 Tagen bis zum Ende der Gasfermentation konstant eine maximale Wasserstoffaufnahmeleistung von $255 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ festzustellen.

Dementsprechend sank der Wasserstoffpartialdruck im Abgas von anfänglichen 400 mbar auf ein Minimum von 196 mbar, wobei dieser Wert bis zum Ende der Gasfermentation anhielt.

Die Erhöhung der Durchflussrate verbesserte wie erwartet die Raum-Zeit-Ausbeuten des kontinuierlichen Prozesses mit Zellrückhaltung. So konnte erstmalig eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $92,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gemessen werden.

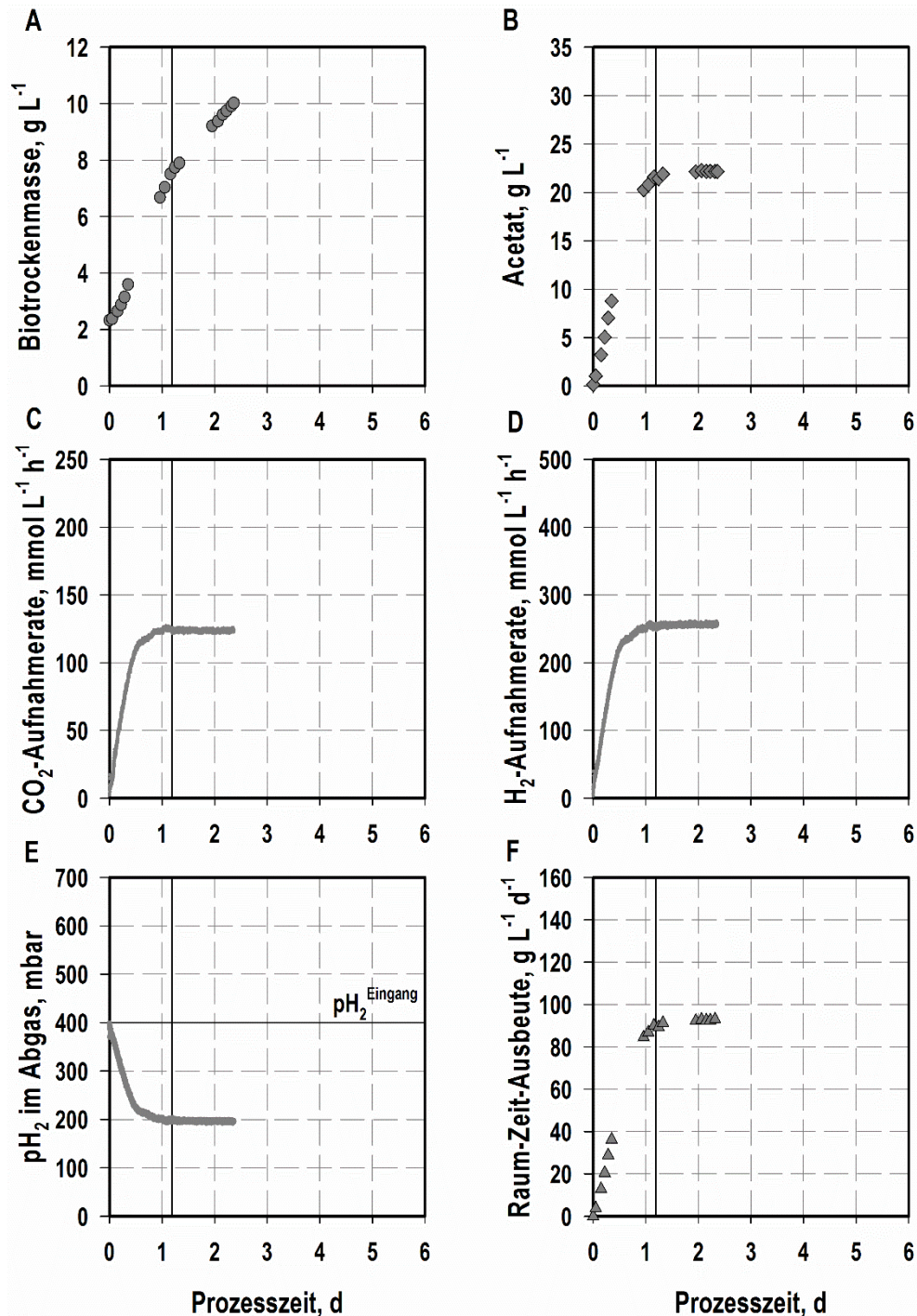


Abbildung 6.4: Autotrophe Gasfermentation mit *A. woodii* bei totaler Zellrückhaltung durch getauchte Hohlfasermembranen im 1 L-Rührkesselreaktor bei einer Durchflussrate von $0,175 \text{ h}^{-1}$. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (A) und Acetatkonzentrationen (B), die Kohlenstoffdioxid- (C) und Wasserstoffaufnahme (D) sowie der Wasserstoffpartialdruck (E) und die Raum-Zeit-Ausbeute (F) als Funktion der Prozesszeit. Die vertikale Linie kennzeichnet stets den Zeitpunkt (1,2 d) zu dem 99,9% des Reaktionsmediums ausgetauscht und fünf hydraulischen Verweilzeiten erreicht wurden. Die horizontale Linie in Abbildung E gibt den eingestellten Wasserstoffpartialdruck (400 mbar) am Eingang des Reaktors wieder. Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar begast.

Im Folgenden wurde die Durchflussrate noch einmal verdoppelt. Die Verläufe der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, die Kohlenstoffdioxid- und Wasserstoffaufnahmeleistungen sowie des Wasserstoffpartialdruckes im Abgas und die Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat bei dieser Durchflussrate sind in Abbildung 6.5 dargestellt.

Wie bei den anderen kontinuierlichen Gasfermentationen mit totaler Zellrückhaltung setzte das Wachstum unmittelbar nach der Inokulation ein, worauf eine stetige Zunahme der Biotrockenmassekonzentration festgestellt und nach 1,4 Tagen eine maximale Zellkonzentration von $10,8 \text{ g L}^{-1}$ gemessen wurde. Zu diesem Zeitpunkt musste der Prozess jedoch wegen der abnehmenden Filtrationsleistung abgebrochen werden. Die Deckschichtbildung auf den Membranen ist auf die hohen Biotrockenmassekonzentrationen sowie auf die hohe Durchflussrate bei einem maximalen Filtratstrom von $46,7 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ zurückzuführen.

Mit Beginn der Gasfermentation wurde auch Acetat gebildet, wobei die Gleichgewichtskonzentration, die sich bei den anderen Gasfermentationen bereits nach fünf Verweilzeiten einstellte auch nach 1,4 Tagen und somit über zehn hydraulische Verweilzeiten nicht ermittelt werden konnte. Die finale Acetatkonzentration betrug $17,6 \text{ g L}^{-1}$. Auch bei diesem Prozess war keine Formiatproduktion nachzuweisen.

Die Aufnahmeleistungen von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff stiegen innerhalb von 1,8 Tagen auf maximale Aufnahmeleistungen von $217 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $458 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an und wurden somit erneut parallel und in einem Verhältnis von 1:2 ($\text{CO}_2:\text{H}_2$) aufgenommen. Wie bereits in Bezug auf die Acetatproduktion erwähnt wurde, wären auch für die Bestimmung konstanter Gasaufnahmeleistungen längere Prozesszeiten nötig gewesen.

Der gemessene Wasserstoffpartialdruck im Rührkesselreaktor befand sich bei dem Prozess mit der Durchflussrate $0,175 \text{ h}^{-1}$ auf einem Minimum von ungefähr 200 mbar (siehe Abbildung 6.4 E). Um diesen oberhalb von 200 mbar zu halten und einer möglichen Wasserstofflimitierung zu umgehen, war der Eingangswasserstoffpartialdruck bei dieser Gasfermentation auf 600 mbar erhöht, so dass der Wasserstoffpartialdruck im Abgas während des Prozesses nicht unter 233 mbar absank.

Die erhaltene Raum-Zeit-Ausbeute verhielt sich analog zur gebildeten Acetatkonzentration. Am Ende dieser Gasfermentation wurde eine finale Ausbeute von $147,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ermittelt.

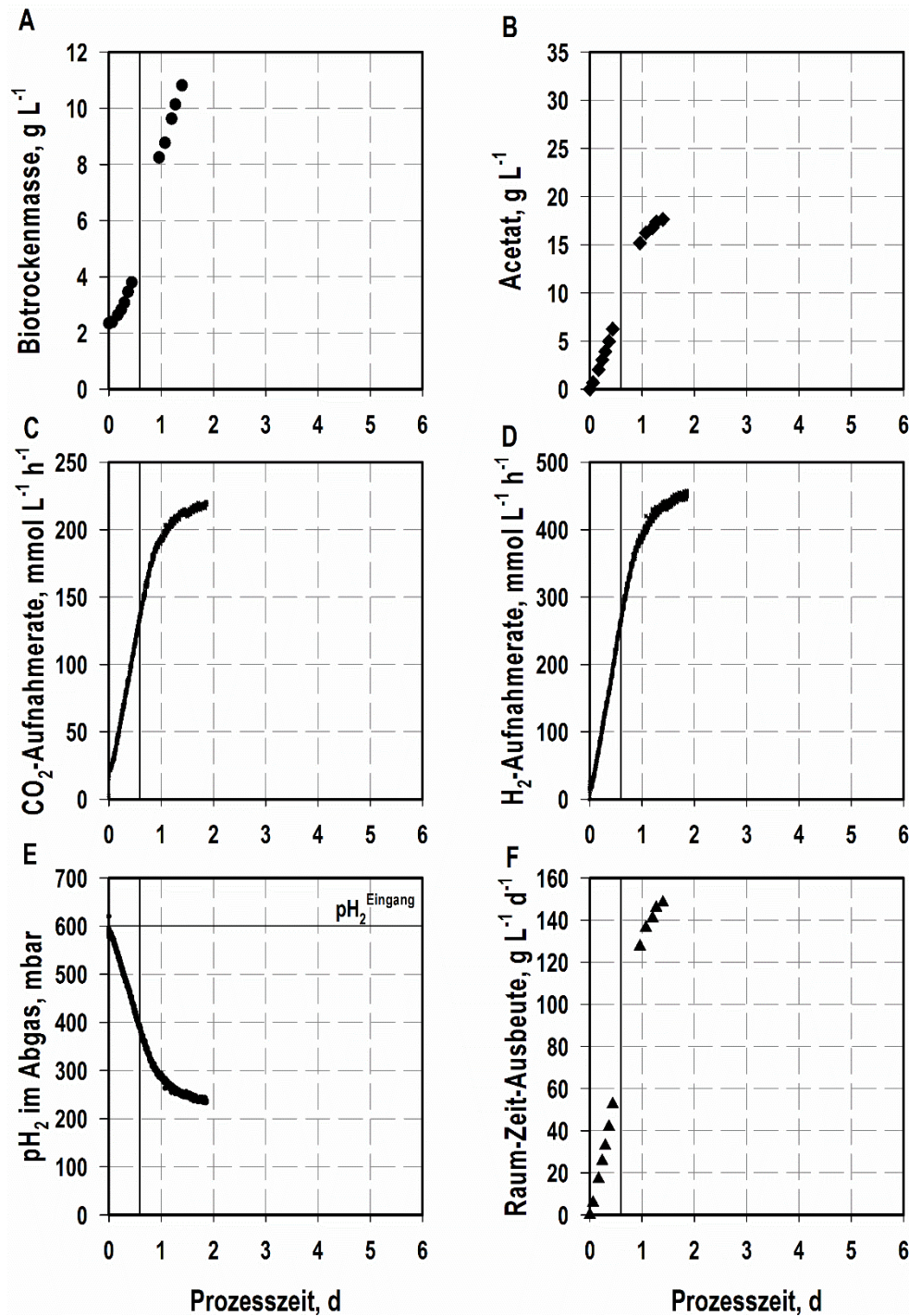


Abbildung 6.5: Autotrophe Gasfermentation mit *A. woodii* mit totaler Zellrückhaltung durch getauchte Hohlfasermembranen im 1 L-Rührkesselreaktor bei einer Durchflussrate von 0,350 h⁻¹. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (A) und Acetatkonzentrationen (B), die Kohlenstoffdioxid- (C) und Wasserstoffaufnahme- (D) sowie der Wasserstoffpartialdruck (E) und die Raum-Zeit-Ausbeute (F) als Funktion der Prozesszeit. Die vertikale Linie kennzeichnet stets den Zeitpunkt (0,6 d) zu dem 99,9% des Reaktionsmediums ausgetauscht und fünf hydraulische Verweilzeiten erreicht wurden. Die horizontale Linie in Abbildung E gibt den eingestellten Wasserstoffpartialdruck (600 mbar) am Eingang des Reaktors wieder. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 600 mbar und einem p_{CO₂} von 250 mbar begast.

6.2.2 Verdopplung der Hefeextraktkonzentration

Aufgrund der stetigen Steigerung des Wachstums durch die Erhöhung der Durchflussrate wurde der Einfluss des verwendeten Komplexmediums auf die Gasfermentation mit *A. woodii* genauer untersucht. Hierfür wurde der Anteil an Hefeextrakt im Medium von 4 g L^{-1} auf 8 g L^{-1} verdoppelt und erneut eine kontinuierliche Gasfermentation mit totaler Zellerückhaltung und einer Durchflussrate von $0,175 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Wie bei den vorherigen Prozessen wurde mit dem Austausch des Mediums unmittelbar nach Inokulation begonnen.

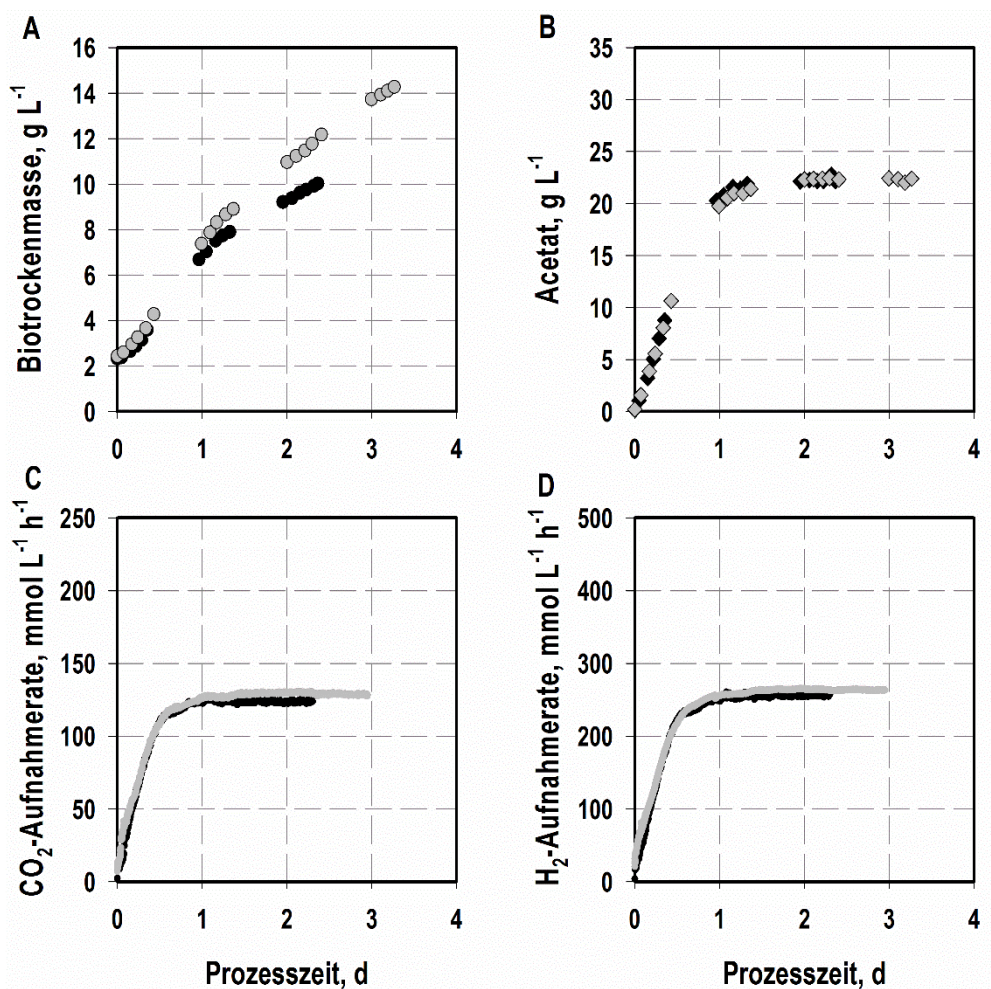


Abbildung 6.6: Verdopplung der Hefeextraktkonzentration bei kontinuierlicher Gasfermentation mit *A. woodii* bei totaler Zellerückhaltung und einer Durchflussrate von $0,175 \text{ h}^{-1}$. Dargestellt sind die Biotrockenmasse- (A) und Acetatkonzentrationen (B), sowie die Kohlenstoffdioxid- (C) und Wasserstoffaufnahme (D) als Funktion der Prozesszeit. Dabei ist der Prozess mit 4 g L^{-1} Hefeextrakt durch schwarze Symbole und der mit 8 g L^{-1} durch graue Symbole gekennzeichnet. Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und $\text{pH } 7$, titriert wurde mit KOH . Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar begast.

Die Ergebnisse dieser kontinuierlichen Gasfermentation mit totaler Zellrückhaltung sind im Vergleich zu einem Referenzprozess, bei dem standardmäßig 4 g L^{-1} Hefeextrakt eingesetzt und ebenfalls mit einer Durchflussrate von $0,175 \text{ h}^{-1}$ gearbeitet wurde, in Abbildung 6.6 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Verdopplung der Hefeextraktkonzentration das Wachstum von *A. woodii* eindeutig steigert, da bei Verwendung einer Hefeextraktkonzentration von 8 g L^{-1} bereits nach einem Tag eine höhere Biotrockenmassekonzentration nachgewiesen werden konnte. Nach 2,3 Tagen wurde bei der Gasfermentation mit 4 g L^{-1} Hefeextrakt eine finale Zellkonzentration von $10,0 \text{ g L}^{-1}$ und bei der Gasfermentation mit 8 g L^{-1} eine Konzentration von $11,8 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Letzterer Prozess wurde weitere 0,9 Tage weiterverfolgt, worauf final $14,3 \text{ g L}^{-1}$ gebildet und die maximal gebildete Biotrockenmassekonzentration somit nochmals gesteigert werden konnte.

Die Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration hatte keinen Einfluss auf die Acetatbildung. So wurden nach 1,9 Tagen unabhängig von der eingesetzten Hefeextraktkonzentration Gleichgewichtskonzentrationen von $22,1 \text{ g L}^{-1}$ Acetat (4 g L^{-1} Hefeextrakt) und $22,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat (8 g L^{-1} Hefeextrakt) gemessen, die bis zum Prozessende nachweisbar waren.

Entsprechend der Acetatbildung wurde Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff aufgenommen. Die Gasaufnahmearten wurden folglich nicht durch die Verdopplung der Hefeextraktkonzentration erhöht. Nach 1,2 Tagen und bis zum Ende beider Prozesse konnte eine konstante Aufnahme von $124 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ CO}_2$ und $255 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ H}_2$ (4 g L^{-1} Hefeextrakt) beziehungsweise $128 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ CO}_2$ und $262 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ H}_2$ (8 g L^{-1} Hefeextrakt) gemessen werden.

6.3 Diskussion

Mit der erfolgreichen Etablierung der kontinuierlichen Gasfermentation von *A. woodii* im kontrollierten Rührkesselreaktor ohne Zellrückhaltung konnte bei einer Durchflussrate von $0,035 \text{ L h}^{-1}$ ($2/3 \mu_{\text{max}}$) nach 3,9 Tagen (3,3 hydraulische Verweilzeiten) das Einstellen eines Fließgleichgewichtes beobachtet werden. Im Fließgleichgewicht konnte eine konstante Biotrockenmassekonzentration von $1,0 \text{ g L}^{-1}$, eine konstante Acetatkonzentration von $22,0 \text{ g L}^{-1}$ und eine konstante Kohlenstoffdioxidaufnahmerate von $23,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nachgewiesen werden. Für das gasförmige Substrat Wasserstoff wurde keine konstante

Aufnahmerate ermittelt, was auf eine fehlerhafte Messung der Abgasanalytik zurückzuführen war. Da während vorangegangenen Gasfermentationen mit *A. woodii* entsprechend der Stöchiometrie des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel stets ein Verhältnis von Wasserstoff zu Kohlenstoffdioxid von 2:1 festgestellt werden konnte, ist für den kontinuierlichen Prozess ebenfalls von einer konstanten Wasserstoffaufnahme nach 3,9 Tagen auszugehen. Der Zustand des Fließgleichgewichtes konnte auch nach dem Erreichen von fünf Verweilzeiten und somit dem 99,9% Austausch des Reaktionsmediums für weitere 24 h aufrechterhalten und somit die Stabilität des Systems bestätigt werden. Für den dargestellten kontinuierlichen Prozess konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $18,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ermittelt werden, welche der ermittelten Ausbeute eines Satzprozesses entspricht (siehe Tabelle 6.1). In der Literatur ist die kontinuierliche Prozessführung für die Gasfermentation mit *A. woodii* nur wenig untersucht. Peters (1998) veröffentlichte die Ergebnisse zur kontinuierlichen Prozessführung in definiertem Medium und einer Durchflussrate von $0,012 \text{ h}^{-1}$, wobei im Vergleich zu dem hier dargestellten Prozess deutlich geringere Gleichgewichtskonzentrationen von nur $0,82 \text{ mg L}^{-1}$ Biotrockenmasse und $7,9 \text{ g L}^{-1}$ Acetat berichtet wurden. Die sich daraus ergebende Raum-Zeit-Ausbeute von $2,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (aus den Literaturdaten abgeleiteter Wert) konnte folglich um den Faktor neun erhöht werden. Diese Steigerung ist auf die Verwendung des optimierten Reaktionsmediums in dieser Arbeit zurückzuführen, welches im Vergleich zum definierten Medium von Peters (1998) 4 g L^{-1} Hefeextrakt, 5 mg L^{-1} FeSO_4 und die doppelte Menge an Vitaminen und Spurenelementen enthält.

Eine weitere Steigerung der gebildeten Biotrockenmassekonzentrationen sowie der Raum-Zeit-Ausbeute war durch die Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung möglich. Die Rückhaltung der Zellen im Rührkesselreaktor bewirkt eine Entkopplung der Durchflussrate und der Wachstumsrate, wodurch die Durchflussrate höher als die maximale Wachstumsrate ($0,052 \text{ h}^{-1}$) eingestellt und eine erhöhte Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet werden kann, ohne Bakterienzellen aus dem Rührkesselreaktor auszutragen.

Hierzu wurde ein getauchtes Hohlfasermembranmodul für die kontinuierlichen Prozesse mit totaler Zellrückhaltung gestaltet und drei Gasfermentationen mit unterschiedlichen Durchflussraten ($0,070 \text{ h}^{-1}$, $0,175 \text{ h}^{-1}$ und $0,350 \text{ h}^{-1}$) durchgeführt bis mindestens fünf hydraulische Verweilzeiten erreicht waren (Vergleich siehe Abbildung 6.7 und Abbildung 6.8).

Alle Prozesse zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten von *A. woodii* mit einer maximalen Wachstumsrate (μ_{\max}) von $1,2 \text{ d}^{-1}$ während der exponentiellen Wachstumsphase der Gasfermentationen. Wie erwartet konnte eine stetige Zunahme der Biotrockenmassekonzentration aufgrund der Zellrückhaltung im Membranreaktor beobachtet und die höchste Biotrockenmassebildung bei der höchsten Durchflussrate ($0,35 \text{ h}^{-1}$) erzielt werden. Während dieser Gasfermentation wurden nach 1,4 Tagen finale Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 11 g L^{-1} erreicht, woraufhin die kontinuierliche Prozessführung aufgrund der geringen Filtrationsleistung des Membranmoduls beendet werden musste.

Im Gegensatz zu den Biotrockenmassekonzentrationen war die finale Acetatkonzentration umso niedriger, je höher die angewendete Durchflussrate gewählt wurde ($17,6 \text{ g L}^{-1}$ bei $0,350 \text{ h}^{-1}$, $22,6 \text{ g L}^{-1}$ bei $0,175 \text{ h}^{-1}$ und $23,5 \text{ g L}^{-1}$ bei $0,070 \text{ h}^{-1}$) und war damit unter Berücksichtigung der gebildeten Produktkonzentrationen bei einer Satzkultivierung (60 g L^{-1}) vergleichsweise gering. Durch die Steigerung der Durchflussraten erhöhten sich entsprechend der jeweiligen Acetatproduktion die stabilen Gasaufnahmeleistungen am Ende der kontinuierlichen Gasfermentation.

Wie zu erwarten war, konnten die Raum-Zeit-Ausbeuten durch die Erhöhung der Durchflussraten ebenfalls gesteigert werden und betragen für die jeweiligen Durchflussraten $40 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $95 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $148 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (siehe ebenfalls Tabelle 6.1).

Erste Hohlfasermembranmodule im Bypass eines Rührkesselreaktors wurden bereits von Morinaga et al. (1990) eingeführt und die volumetrischen Produktbildungsraten von *Acetobacterium* sp. BR-446 von $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Satzprozess auf $149 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im kontinuierlichen Prozess mit Zellrückhaltung gesteigert.

Die Aufzeichnung der Gasaufnahmeleistungen und die Bestimmung der Acetatkonzentration im Reaktionsmedium ermöglicht die Berechnung von Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen für jeden der dargestellten Prozesse unter der Annahme, dass die Biotrockenmasse ausschließlich aus dem im Medium zur Verfügung gestellten Hefeextrakt gebildet wird. Nach Levy et al. (1981) ist die Umsetzung von Komponenten im Hefeextrakt zu Acetat unter diesen Bedingungen vernachlässigbar und wurde folglich für die Bilanzierungen nicht berücksichtigt. Dabei konnten die Kohlenstoff- sowie Elektronenbilanzen mit einer Wiederfindung zwischen 97 - 102% (siehe Tabelle 6.1) sehr gut geschlossen werden.

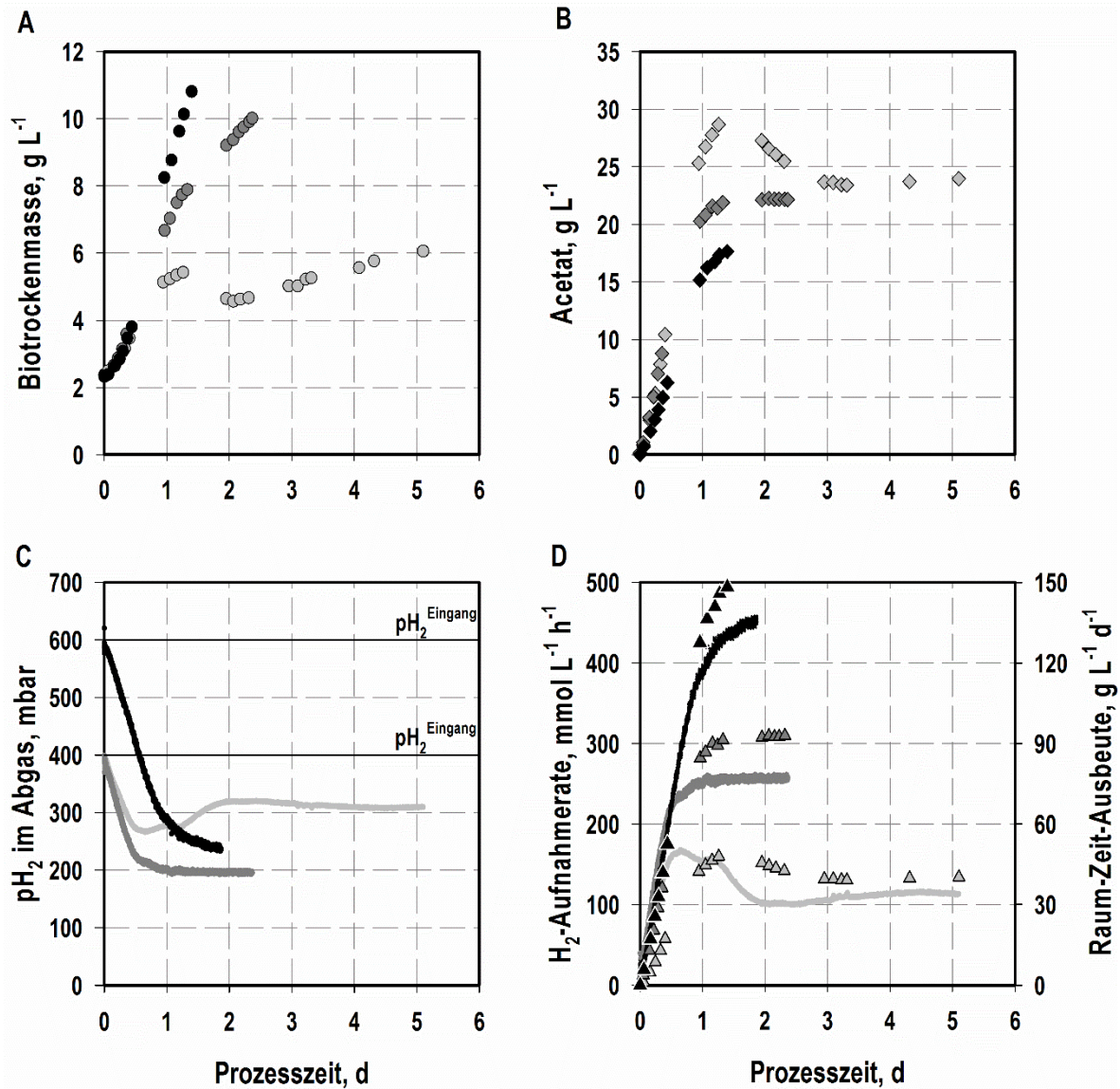


Abbildung 6.7: Vergleichende Darstellung der Gasfermentation mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor bei totaler Zellrückhaltung. Dargestellt sind die gebildeten Biotrockenmasse- (A, Kreise) sowie Acetatkonzentrationen (B, Rauten), der gemessene Wasserstoffpartialdruck (p_{H₂}) im Abgas (C) als auch die Wasserstoffaufnahme (D) und die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten (D, Dreiecke) als Funktion der Prozesszeit. Die Durchflussrate 0,070 h⁻¹ ist durch hellgraue, 0,175 h⁻¹ durch dunkelgraue und 0,350 h⁻¹ durch schwarze Symbole dargestellt. Die horizontalen Linien in C kennzeichnen den Wasserstoffpartialdruck am Reaktoreingang. Kultiviert wurde bei 30 °C, 1200 rpm und pH 7, titriert wurde mit KOH. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h⁻¹ mit einem p_{H₂} von 400 mbar und einem p_{CO₂} von 167 mbar oder einem p_{H₂} von 600 mbar und einem p_{CO₂} von 250 mbar für die Gasfermentation mit D = 0,35 h⁻¹ begast.

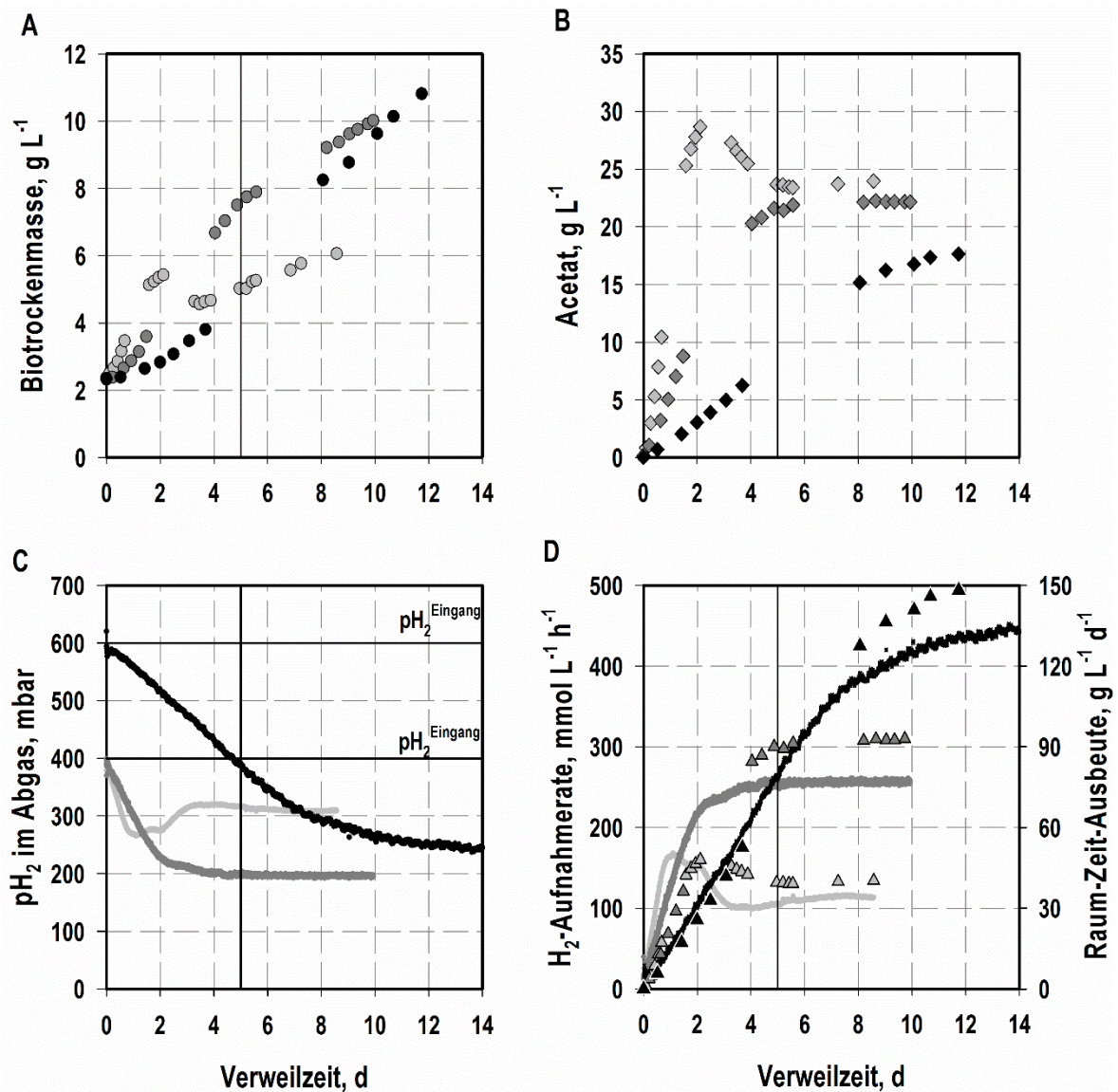


Abbildung 6.8: Vergleichende Darstellung der Gasfermentation mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor bei totaler Zellrückhaltung. Dargestellt sind die gebildeten Biotrockenmasse- (A, Kreise) sowie Acetatkonzentrationen (B, Rauten), der gemessene Wasserstoffpartialdruck (pH_2) im Abgas (C) als auch die Wasserstoffaufnahme (D) und die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten (D, Dreiecke) als Funktion der Verweilzeit. Die Durchflussrate $0,070 \text{ h}^{-1}$ ist durch hellgraue, $0,175 \text{ h}^{-1}$ durch dunkelgraue und $0,350 \text{ h}^{-1}$ durch schwarze Symbole dargestellt. Die vertikalen Linien kennzeichnen den Zeitpunkt zu dem 99,9% des Reaktionsmediums ausgetauscht wurden. Die horizontalen Linien in C kennzeichnen den Wasserstoffpartialdruck am Reaktoreingang. Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und $\text{pH } 7$, titriert wurde mit KOH . Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar oder einem pH_2 von 600 mbar und einem pCO_2 von 250 mbar für die Gasfermentation mit $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$ begast.

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Kohlenstoff- sowie Elektronenbilanzen, Endkonzentrationen an Acetat und Biotrockenmasse sowie die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten der Gasfermentation mit *A. woodii* bei unterschiedlicher Prozessführung. (*): Gasfermentation mit doppelter Hefeextraktkonzentration im Reaktions- sowie Zulaufmedium.

Prozessführung	C-Bilanz, %	e ⁻ -Bilanz, %	c _{Acetat} , g L ⁻¹	c _x , g L ⁻¹	RZA _{Acetat} , g L ⁻¹ d ⁻¹
STR	101,9	103,7	59,2	2,7	18,7
CSTR D = 0,035 h ⁻¹	100,7	104,1	21,7	1,1	18,2
Membranreaktor D = 0,070 h ⁻¹	97,0	98,5	23,5	6,1	39,5
Membranreaktor D = 0,175 h ⁻¹	102,0	99,6	22,6	10,0	94,9
Membranreaktor D = 0,350 h ⁻¹	97,0	98,0	17,6	10,8	147,8
* Membranreaktor D = 0,175 h ⁻¹	101,4	99,8	22,2	14,3	93,2

Die Annahme, dass die Biotrockenmasse überwiegend aus dem zur Verfügung stehenden Hefeextrakt im Medium gebildet wird, wurde durch die Verdopplung der Hefeextraktkonzentration auf 8 g L⁻¹ im Reaktions- sowie Zulaufmedium während der Gasfermentation im Rührkesselreaktor mit getauchten Hohlfasermembranen (D = 0,175 L h⁻¹) untersucht. Hierbei waren während der ersten 12 h keine signifikanten Unterschiede bezüglich der anfänglichen maximalen Wachstumsrate von 1,2 d⁻¹ im Vergleich zu der Referenzkultivierung mit 4 g L⁻¹ Hefeextrakt festzustellen. Danach konnte die Biotrockenmassebildung durch eine Verdopplung der Hefeextraktkonzentration im Vergleich zur Referenz stetig gesteigert und die höchste bislang veröffentlichte Zellkonzentration von 14,3 g L⁻¹ für eine Gasfermentation mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor nach einer Prozesszeit von nur 3,2 Tagen erreicht werden. Im Gegensatz zur Erhöhung der Biotrockenmassebildung veränderten sich die Gasaufnahme- sowie die Acetatproduktionsraten nicht signifikant. Trotz höherer Zellkonzentrationen im Rührkesselreaktor konnte somit die Acetatproduktion nicht gesteigert werden. Dies beweist, dass die Biotrockenmasse überwiegend aus dem Hefeextrakt gebildet wird und die Umsetzung von Hefeextrakt zu Acetat vernachlässigbar ist.

Aufgrund der geringen volumetrischen Membranfläche von 75 cm² L⁻¹ wird eine weitere Steigerung sowohl der Biotrockenmassebildung als auch der Raum-Zeit-Ausbeute durch den maximalen Filtratstrom von 46,7 L m⁻² h⁻¹ beschränkt. Die Vergrößerung der volumetrischen

Membranfläche durch die Verwendung von mehr als sechs Hohlfasern würde folglich eine weitere Erhöhung ermöglichen. Um das Verstopfen der Membranen bei weiterer Steigerung der Biotrockenmassekonzentrationen und das damit verbundene Absinken des Filtratstroms zu verhindern, könnte die Biotrockenmasse außerdem auf eine bestimmte Konzentration eingestellt werden. Hierfür wäre es denkbar die Hefeextraktkonzentration des Zulaufmediums zu reduzieren oder aber einen Bleedstrom ohne Zellrückhaltung aus dem Reaktor abzuführen.

Da durch die Verdopplung der Hefeextraktkonzentration ausschließlich die Biotrockenmassekonzentration jedoch nicht die Acetatkonzentrationen gesteigert werden konnte und sich für Acetat eine Gleichgewichtskonzentrationen zwischen 18 und 24 g L⁻¹ einstellt, wurde der Einfluss der Acetatkonzentration auf die zellspezifische Acetatbildungsrate untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 6.9 dargestellt.

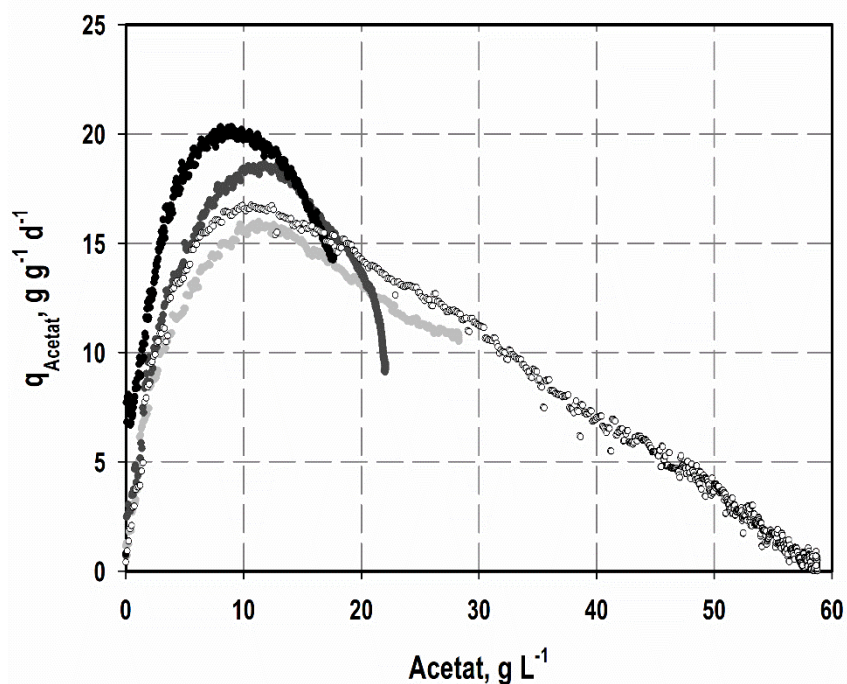


Abbildung 6.9: Zellspezifische Acetatbildungsraten verschiedener Gasfermentationen mit *A. woodii* als Funktion der vorherrschenden Acetatkonzentration im Reaktionsmedium. Dargestellt sind die kontinuierlichen Prozesse im Membranreaktor mit den Durchflussraten 0,070 h⁻¹ (hellgrau), 0,175 h⁻¹ (dunkelgrau) und 0,350 h⁻¹ (schwarz) sowie eine Satzkultivierung (weiß).

Daraus ist zu entnehmen, dass für einen Satzprozess eine maximale zellspezifische Acetatbildungsrate bei einer Produktkonzentration zwischen 10 - 12 g L⁻¹ erreicht wird. Für die kontinuierlichen Gasfermentationen im Membranreaktor wurde, mit Ausnahme der höchsten Durchflussrate, ebenfalls die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate für den gleichen Konzentrationsbereich an Acetat beobachtet. Für die Durchflussrate 0,350 h⁻¹ lag das Maximum bei einer Acetatkonzentration zwischen 8 - 10 g L⁻¹.

Im Gegensatz hierzu unterschied sich die Höhe der ermittelten zellspezifischen Acetatbildungsrate in Bezug auf die Durchflussrate. Die höchste Produktbildungsrate (20,3 g g⁻¹ d⁻¹) wurde für die höchste Durchflussrate (0,350 h⁻¹) und die niedrigste Rate für 0,070 h⁻¹ bestimmt, was erneut auf die zur Verfügung gestellte Menge an Hefeextrakt im Reaktionsmedium zurückzuführen ist.

Zusammengefasst bewirkt die Inhibierung durch das Produkt Acetat eine stetige Abnahme der zellspezifischen Acetatbildung sofern eine Produktkonzentration von 8 - 12 g L⁻¹ überschritten wird, wobei im Satzprozess eine geringe Acetatbildung auch noch bei einer Acetatkonzentration von etwa 60 g L⁻¹ gemessen werden konnte. Die starke Abnahme der zellspezifischen Acetatbildungsraten gegen Ende der Prozesse mit Zellrückhaltung ist auf die Einstellung der Gleichgewichtskonzentrationen von Acetat bei dennoch zunehmenden Biotrockenmassekonzentrationen zurückzuführen.

In der Literatur wird berichtet, dass *A. woodii* intrazelluläre Acetatkonzentrationen von mindestens 21 g L⁻¹ toleriert (Boenigk et al. 1989). Diese Konzentration deckt sich, mit Ausnahme der Gasfermentation mit der höchsten Durchflussrate (0,350 h⁻¹), mit den Acetatkonzentrationen, die sich bei den kontinuierlichen Prozessführungen mit totaler Zellrückhaltung nach fünf Verweilzeiten einstellen. Möglicherweise werden bei höheren Acetatkonzentrationen Enzyme im Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel inhibiert, weswegen sich bei einem kontinuierlichen Prozess diese kritische Konzentration einstellt. Enzyme die hiervon betroffen sein könnten sind die Carboanhydrase oder die Acetatkinase. Für erstere wurde in *A. woodii* bereits bei zellinternen Acetatkonzentrationen von 6,6 g L⁻¹ eine Erniedrigung der Enzymaktivität um 50% berichtet (Braus-Stromeyer et al. 1997). Eine inhibierende Wirkung von Acetat auf die Acetatkinase, welche die terminale Reaktion des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels bei der Produktion von Acetat katalysiert, wurde bislang nur für *A. kivui* publiziert, wobei eine Inhibierung erst ab Acetatkonzentrationen von mehr als 48 g L⁻¹ auftrat (Klemps et al. 1987).

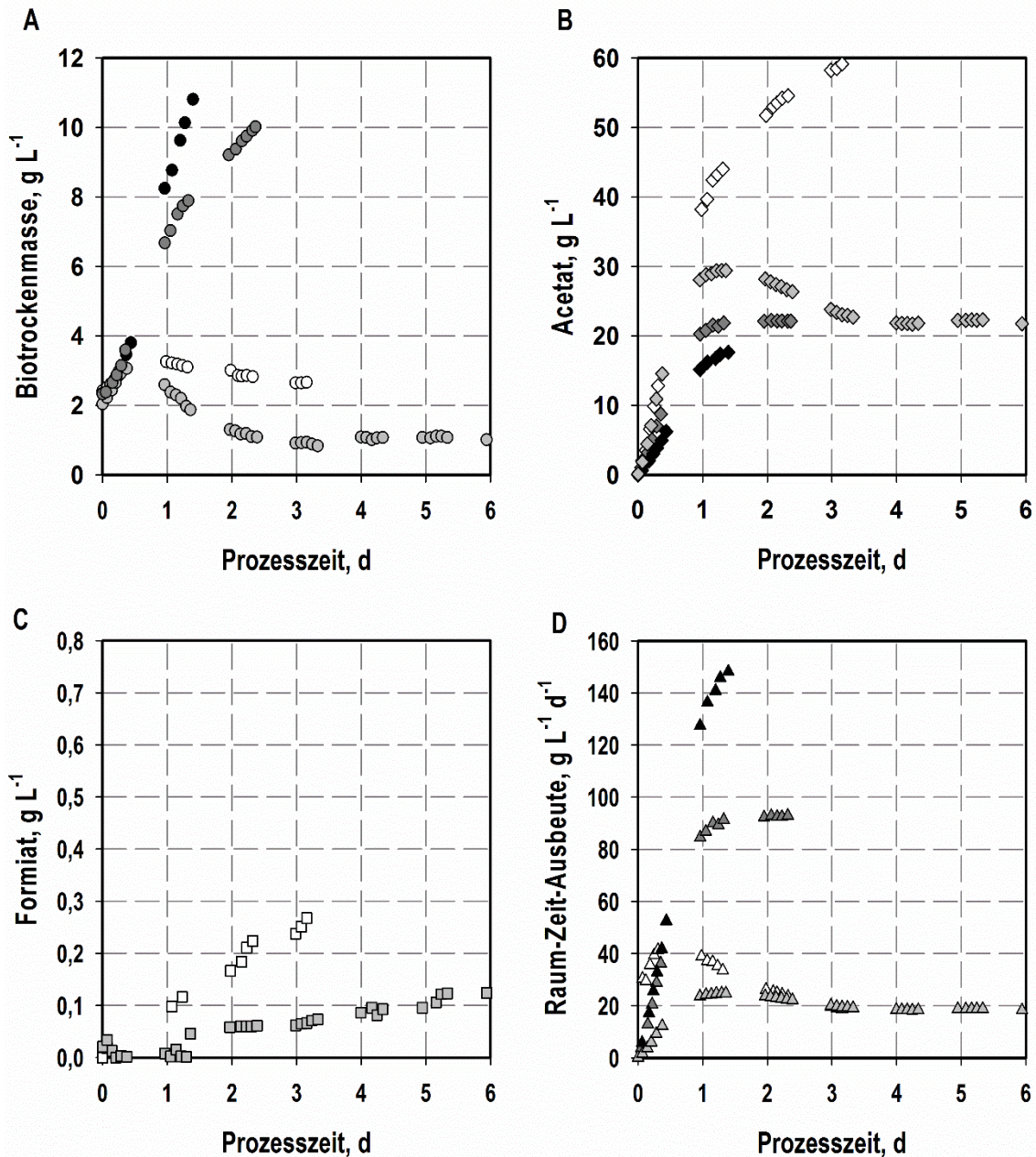


Abbildung 6.10: Vergleichende Darstellung der Gasfermentation mit *A. woodii* im Rührkesselreaktor. Dargestellt sind die gebildeten Biotrockenmasse- (A, Kreise), Acetat- (B, Rauten) sowie Formiatkonzentrationen (C, Quadrate) und die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten (D, Dreiecke) als Funktion der Prozesszeit. Die Ergebnisse des Satzprozesses (STR) sind durch weiße Symbole, die der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung (CSTR, $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) durch hellgraue Symbole und die des Membranreaktors mit vollständiger Zellrückhaltung (MBR) durch dunkelgraue Symbole ($D = 0,175 \text{ h}^{-1}$) oder schwarze Symbole ($D = 0,350 \text{ h}^{-1}$) dargestellt. Kultiviert wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1200 rpm und $\text{pH } 7$, titriert wurde mit KOH . Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit einem Gesamtvolumenstrom von 30 L h^{-1} mit einem pH_2 von 400 mbar und einem pCO_2 von 167 mbar oder einem pH_2 von 600 mbar und einem pCO_2 von 250 mbar für die Gasfermentation mit $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$ begast.

Ein abschließender Vergleich der gebildeten Biotrockenmasse-, Acetat- und Formiatkonzentration sowie der ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten (siehe Abbildung 6.10) ermöglicht die Zusammenfassung der Gasfermentation mit *A. woodii* vom anfänglichen Satzprozess (STR) bis zur kontinuierlichen Prozessführung mit vollständiger Zellrückhaltung.

Die Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses ohne Zellrückhaltung (CSTR) genügte nicht, um die Biotrockenmassekonzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute zu steigern. Aufgrund der geringen Wachstumsrate war eine weitere Erhöhung der Durchflussrate ohne Rückhaltung der Zellen im Rührkesselreaktor nicht möglich, ohne die Gefahr, dass die Zellen vollständig aus dem Reaktor ausgetragen werden. Durch die Erweiterung des kontinuierlichen Prozesses mit einem internen Hohlfasermembranmodul und Erhöhung der Durchflussrate ($D = 0,35 \text{ h}^{-1}$) konnte die gewünschte Steigerung der Biotrockenmassekonzentration durch eine Vervierfachung der finalen Konzentration im Satzbetrieb und eine Verzehnfachung der finalen Konzentration im kontinuierlichen Betrieb ohne Zellrückhaltung ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) erzielt werden. Des Weiteren wurde die Raum-Zeit-Ausbeute im Rührkesselreaktor mit getauchten Hohlfasermembranen sowohl im Vergleich zum Satzbetrieb als auch zum kontinuierlichen Betrieb um das Achtfache auf $148 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht. In der Literatur wird bislang für eine autotrophe Satzkultivierung mit *A. woodii* über eine höchstmögliche Raum-Zeit-Ausbeute von $4,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ berichtet (Demler et al. 2011), die durch die Etablierung des Membranreaktors um das 37-fache übertroffen werden konnte.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Gegenwärtig basiert die Herstellung von Grundchemikalien wie Essigsäure überwiegend auf chemischen Syntheseverfahren unter Verwendung fossiler Rohstoffe. Ein vielversprechendes, alternatives Produktionsverfahren stellt die Gasfermentation dar, bei der Kohlenstoffdioxid, welches als Abfallprodukt bei der Verbrennung fossiler und nachwachsender Rohstoffe anfällt, durch acetogene Mikroorganismen zu Acetat umgesetzt wird. Als ein Modellorganismus für die Gasfermentation ist das homoacetogene Bakterium *Acetobacterium woodii* zu nennen, welches Kohlenstoffdioxid mit Wasserstoff als Elektronenquelle in Acetat fixiert. Bereits 1977 wurde über eine derartige Umsetzung mit *A. woodii* im Satzverfahren bei kontinuierlicher Begasung berichtet, wobei jedoch in 6 Tagen nur geringe Acetatkonzentrationen von 11 g L^{-1} erreicht werden konnten (Balch et al. 1977). Erst 2012 konnte das Satzverfahren wesentlich verbessert werden, indem der pH kontrolliert, der Leistungseintrag zur Überwindung der Stofftransportlimitierung gas-flüssig erhöht und Medienbestandteilen variiert wurden, so dass innerhalb von 3 Tagen 50 g L^{-1} Acetat hergestellt werden konnten (Demler 2012).

Trotz dieser Fortschritte stehen der Gasfermentation mit *A. woodii* im bislang angewandten Satzbetrieb zu geringe Produktkonzentrationen sowie zu niedrige Raum-Zeit-Ausbeuten im Wege, um zur konventionellen, chemischen Synthese konkurrenzfähig werden zu können.

Um die Zelldichten im Satzverfahren zu erhöhen und damit potentiell die Acetatproduktion zu steigern, wurde zunächst der Einfluss verschiedener, bislang nicht berücksichtigter Prozessgrößen untersucht, bevor zur Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute verschiedene kontinuierliche Prozessführungsstrategien (kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor ohne und mit vollständiger Zellrückhaltung über getauchte Membranen) verfahrenstechnisch analysiert wurden.

Da *A. woodii* wie andere Acetogene einen transmembranen Natriumgradienten zur Biosynthese des essentiellen Energieträgers ATP verwendet, wurde dessen Wachstums- und Produktbildungsverhalten in Abhängigkeit verschiedener extrazellulärer Natriumionenkonzentrationen im Satzverfahren untersucht. Um zunächst die pH Titration von der extrazellulären Natriumionenkonzentration zu entkoppeln, wurde das Titrationsmittel Natriumhydroxid durch Kaliumhydroxid ersetzt und zunächst eine konstante Natriumionenkonzentration von 120 mM vorgegeben. Dadurch konnte eine 5% Steigerung der gebildeten Acetatkonzentration erzielt werden. Anschließend wurde durch systematische Untersuchungen zunächst in anaeroben Septumflaschen (0,3 mM bis 1 M Na⁺) und anschließend im Rührkesselreaktor (20mM, 50 mM, 120 mM Na⁺) 50 mM Na⁺ als eine geeignete Natriumkonzentration identifiziert, bei welcher im Vergleich zum Referenzprozess (Titration mit NaOH und 120 mM Na⁺) die maximale Wachstumsrate auf 1,4 h⁻¹ verdoppelt und die finale Acetatkonzentration um 24% auf 60,4 g L⁻¹ im Satzverfahren gesteigert werden konnte.

Eine weitere Prozessgröße, die Einfluss auf die Produktbildung von acetogenen Mikroorganismen haben kann und bislang nicht bei der Gasfermentation mit *A. woodii* berücksichtigt wurde, ist das extrazelluläre Redoxpotential (Wang et al. 2012). Um die Wirkung verschiedener Redoxpotentiale auf Wachstum- und Produktbildung von *A. woodii* untersuchen zu können, wurde zunächst der zeitlich Verlauf des extrazellulären Redoxpotentials bei der Gasfermentation im Satzverfahren aufgezeichnet. Diese Aufzeichnung zeigte zunächst, dass das Potential des Kulturmediums zu Beginn der Gasfermentation durch die metabolische Aktivität von *A. woodii* von -450 mV auf -600 mV sinkt. Im weiteren Verlauf konnte eine Korrelation zwischen dem Redoxpotential und der zellspezifischen Acetatbildungsrate festgestellt werden: je niedriger die ermittelte zellspezifische Acetatbildungsrate war, desto niedriger war das Redoxpotential. Die Regelung des Redoxpotentials durch Titration mit redoxaktiven Substanzen (Kaliumhexacyanoferrat, Luftsauerstoff, Natriumborhydrid, Natriumdithionit oder Titaniumcitrat) auf konstante Redoxpotentiale wirkte sich jedoch negativ auf Wachstum und Produktbildung im Satzverfahren aus.

Um eine ausreichende Versorgung von *A. woodii* mit dem in Wasser schlecht löslichen Substrat Wasserstoff bei reduziertem Leistungseintrag zu ermöglichen, wurde *A. woodii* bereits bei erhöhtem Systemdruck (1,8 bar) im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor kultiviert (Demler et al. 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Erhöhung des Systemsdrucks um nahezu das Doppelte (3,5 bar) auf das Wachstum und die Produktbildung von

A. woodii im Satzverfahren in einem speziell dafür ausgelegten Rührkesselreaktor reaktionstechnisch untersucht. Im direkten Vergleich zu Gasfermentationen bei Umgebungsdruck wurde dabei jedoch eine um 24% geringere Acetatkonzentration ($45,3 \text{ g L}^{-1}$) nach 3,2 Tagen und stattdessen eine um das Zehnfache erhöhte Bildung des Nebenproduktes Formiat ($4,2 \text{ g L}^{-1}$) festgestellt. Letztere wurde anhand weiterer Experimente mit abweichenden Gasmischungsverhältnissen auf die Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes zurückgeführt. Die Tatsache, dass die Systemdruckerhöhung zu einer geringeren Acetatproduktion führte, deutet auf Limitierungen im Stoffwechsel von *A. woodii* bei der Umsetzung des Intermediates Formiat hin. Daher wurden zwei rekombinante Stämme von *A. woodii*, welche entweder die THF-abhängigen Enzyme des Methylzweiges oder die Phosphotransacetylase (pta) und die Acetatkinase (ack) überexprimieren (Straub et al. 2014), ebenfalls bei einem Systemdruck von 3,5 bar im Satzverfahren untersucht. Bei beiden rekombinanten Stämmen konnte im Vergleich zum Wildtyp die Acetatbildung um 11% (THF) oder 4% (pta-ack) gesteigert und die Formiatproduktion um 14% (THF) oder 41% (pta-ack) verringert werden. Somit konnten Engpässe sowohl im Methylzweig als auch in den terminalen Reaktionen des Wood-Ljungdahl-Stoffwechsels identifiziert werden.

Zur Erhöhung der niedrigen Raum-Zeit-Ausbeuten ($18,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) der Gasfermentation in bislang durchgeführten Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene kontinuierliche Prozessführungsstrategien untersucht. Im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor konnte bei einer Durchflussrate von $0,035 \text{ h}^{-1}$ (entspricht etwa $2/3$ der maximalen Wachstumsrate) nach drei hydraulischen Verweilzeiten das Einstellen eines Fließgleichgewichts beobachtet und eine konstante Acetatkonzentration von 22 g L^{-1} festgestellt werden. Mit einer ermittelten Raum-Zeit-Ausbeute von $18,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte damit die volumetrische Produktivität im Vergleich zum Satzverfahren jedoch nicht erhöht werden. Eine weitere Erhöhung der Durchflussrate zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute war aufgrund der geringen maximalen Wachstumsrate von *A. woodii* nicht möglich ohne dabei Gefahr zu laufen, die Zellen vollständig aus dem Rührkesselreaktor auszuwaschen. Eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute ist durch die Entkopplung der Verweilzeiten von Zellen und Medium prinzipiell möglich. Eine mögliche Technik stellt dabei die Zellrückhaltung mittels Querstromfiltration im Bypass zum Rührkesselreaktor dar, die jedoch in der Regel mit einem hohen Leistungseintrag aufgrund der hohen Umströmungsgeschwindigkeit der Membranfläche und der notwendigen kurzen Verweilzeit der Mikroorganismen im Bypass zur Vermeidung einer Substratlimitierung

verbunden ist. Eine Alternative hierzu stellen getauchte Membranen, die beispielsweise bei der Abwasserreinigung eingesetzt werden, dar. Da sterilisierbare, getauchte Membranmodule nicht kommerziell erhältlich sind, wurde für die kontinuierliche Gasfermentation mit Zellrückhaltung ein *in situ* sterilisierbares, submerses Hohlfasermembranmodul mit einer spezifischen Membranfläche von $75 \text{ cm}^2 \text{ L}^{-1}$ (Eigenbau) angefertigt und in den Rührkesselreaktor integriert. Im Vergleich zu den geringen Durchflussraten ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) bei der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung konnte die Durchflussrate dadurch um das Zwei- bis Zehnfache erhöht und somit die Raum-Zeit-Ausbeute entsprechend gesteigert werden (siehe Abbildung 7.1). Im Vergleich zur Satzkultivierung ($18,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) und der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung ($18,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) wurde die volumetrische Ausbeute bei vollständiger Verweilzeitkopplung um das Achtfache auf $148 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($D = 0,35 \text{ h}^{-1}$) erhöht. Dies entspricht der höchsten, bislang veröffentlichten Raum-Zeit-Ausbeute für die Gasfermentation mit *A. woodii*.

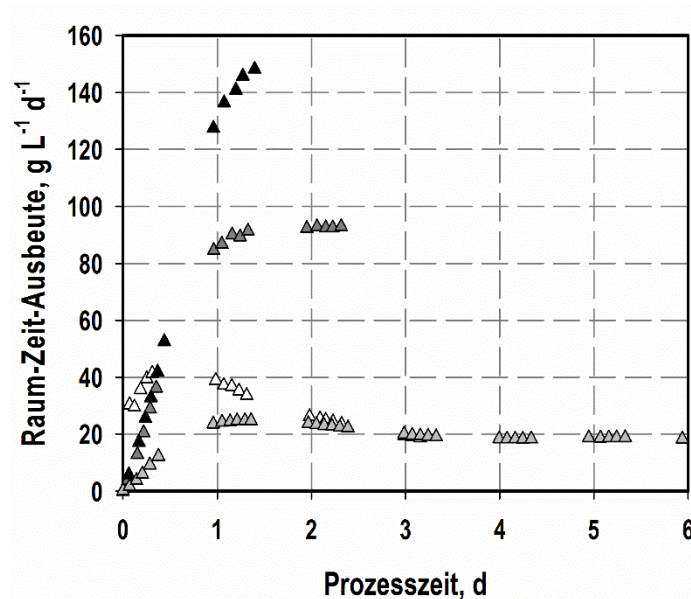


Abbildung 7.1: Vergleichende Darstellung der Gasfermentation im 1 L-Rührkesselreaktor. Dargestellt sind die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten als Funktion der Prozesszeit. Die Ergebnisse des Satzprozesses sind durch weiße Symbole, die der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung ($D = 0,035 \text{ h}^{-1}$) durch hellgraue Symbole und die mit vollständiger Zellrückhaltung durch dunkelgraue Symbole ($D = 0,175 \text{ h}^{-1}$) oder schwarze Symbole ($D = 0,350 \text{ h}^{-1}$) dargestellt.

Bei allen kontinuierlichen Prozessen, mit Ausnahme der Gasfermentation mit der höchsten Durchflussrate ($D = 0,35 \text{ h}^{-1}$), stellte sich nach fünf hydraulischen Verweilzeiten eine Gleichgewichtskonzentration zwischen 18 und 24 g L^{-1} Acetat ein, die zudem umso niedriger war, je höher die Durchflussrate gewählt wurde. Weiterhin konnte eine Abnahme der zellspezifischen Acetatbildungsrate ab dem Überschreiten einer kritischen Acetatkonzentration zwischen 8 und 12 g L^{-1} beobachtet und somit eine begrenzende Produktinhibierung in diesem Konzentrationsbereich identifiziert werden.

Durch die totale Zellrückhaltung im Rührkesselreaktor ($D = 0,35 \text{ h}^{-1}$) konnte außerdem innerhalb von nur 1,4 Tagen im Vergleich zur Literatur (Demler 2012) eine um den Faktor 3,5 höhere Zelldichte von 11 g L^{-1} erreicht werden. Eine weitere Steigerung der Zelldichten ($14,3 \text{ g L}^{-1}$ in 3,2 Tagen, $D = 0,175 \text{ h}^{-1}$) wurde durch die Erhöhung der Hefeextraktkonzentration im Zulaufmedium erzielt. Gemeinsam mit den Ergebnissen aus der Abgasanalytik konnte daraus eindeutig gezeigt werden, dass Kohlenstoffdioxid nahezu vollständig zum Aufbau des Produktes Acetat eingesetzt wird und das Zellwachstum nahezu vollständig mit Hefeextrakt erfolgt.

Ausblick

Nachdem sich geringe Gleichgewichtskonzentrationen zwischen 18 und 24 g L⁻¹ Acetat bei der kontinuierlichen Prozessführung mit Zellrückhaltung einstellen und eine begrenzte Produktinhibierung ab dem Überschreiten einer kritischen Acetatkonzentration zwischen 8 und 12 g L⁻¹ im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnte, stellen die Identifikation der von der Produktinhibierung betroffenen Enzyme im Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel und nachfolgend die Beseitigung dieser Inhibierung mit Hilfe gentechnischer Methoden weitere, wichtige Schritte zur Verbesserung der Gasfermentation mit *A. woodii* dar. Mit einem derartigen Stamm könnten bei hohen Produktkonzentrationen außerdem höhere Raum-Zeit-Ausbeuten bei der kontinuierlichen Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung erzielt werden.

Aufgrund der gesteigerten Formiatbildung bei erhöhten Wasserstoffpartialdrücken im Satzverfahren im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor ist es zudem nötig, die unter diesen Bedingungen inhibierten Enzyme zu identifizieren und ebenfalls mit Hilfe molekularbiologischer Arbeiten die Beseitigung dieser Inhibierung zu erarbeiten.

Mit dem Identifizieren zweier Engpässe im Methyl-Zweig sowie den terminalen Reaktionen im Wood-Ljungdahl-Stoffwechsel wird zudem die Notwendigkeit eines rekombinanten Stammes, bei dem sowohl die THF-abhängigen Enzyme des Methylzweiges als auch die Phosphotransacetylase und die Acetatkinase überexprimiert werden, für zukünftige Arbeiten deutlich.

8 Referenzen

- Aivasidis A, Wandrey C (1988). Recent developments in process and reactor design for anaerobic wastewater treatment. *Water Science & Technology* 20 (1): 211–218.
- Antranikian, G. (2006) *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag.
- Bache R, Pfennig N (1981). Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* 130 (3): 255–261.
- Balch WE, Schoberth S, Tanner RS, Wolfe RS (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27 (4): 355–361.
- Barker HA, Kamen MD, Haas V (1945). Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic and butyric acids by *Butyribacterium rettgeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 31 (11): 355–360.
- Baronofsky JJ, Schreurs WJ, Kashket ER (1984). Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (6): 1134–1139.
- Biegel E, Müller V (2010). Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (42): 18138–18142.
- Biegel E, Schmidt S, Müller V (2009). Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.* 11 (6): 1438–1443.
- Boenigk R, Dürre P, Gottschalk G (1989). Carrier-mediated acetate transport in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 152 (6): 589–593.
- Boga HI, Brune A (2003). Hydrogen-Dependent Oxygen Reduction by Homoacetogenic Bacteria Isolated from Termite Guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 779–786.
- Brandt K, Müller DB, Hoffmann J, Hübner C, Brutschy B, Deckers-Hebestreit G, Müller V (2013). Functional production of the Na⁺ F₁F₀ ATP synthase from *Acetobacterium woodii* in *Escherichia coli* requires the native AtpI. *J. Bioenerg. Biomembr.* 45 (1-2): 15–23.

- Brasca M, Morandi S, Lodi R, Tamburini A (2007). Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103 (5): 1516–1524.
- Braun K, Gottschalk G (1981). Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium acetivum*. *Arch. Microbiol.* 128 (3): 294–298.
- Braus-Stromeyer SA, Schnappauf G, Braus GH, Gössner AS, Drake HL (1997). Carbonic anhydrase in *Acetobacterium woodii* and other acetogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 179 (22): 7197–7200.
- Bredwell, Srivastava, Worden (1999). Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. *Biotechnol. Prog.* 15 (5): 834–844.
- Brioukhanov AL, Netrusov AI (2007). Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43 (6): 567–582.
- Carstensen F, Apel A, Wessling M (2012). In situ product recovery: Submerged membranes vs. external loop membranes. *J. Membr. Sci.* 394-395 1–36.
- Chang IS, Kim BH, Kim DH, Lovitt RW, Sung HC (1999). Formulation of defined media for carbon monoxide fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612 and the growth characteristics of the bacterium. *J. Biosci. Bioeng.* 88 (6): 682–685.
- Hosea Cheung, Robin S. Tanke und Paul Torrence (2000) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Chmiel, H. (2011) Bioprozesstechnik. 3., neu bearb. Aufl. Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.
- Datar RP, Shenkman RM, Cateni BG, Huhnke RL, Lewis RS (2004). Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 86 (5): 587–594.
- Demler M (2012) Reaktionstechnische Untersuchungen zur autotrophen Herstellung von Acetat mit *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Technische Universität München.
- Demler M, Weuster-Botz D (2011). Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2): 470–474.
- Diekert G, Wohlfarth G (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 66 (1-3): 209–221.
- Doran, P. M. (1995) Bioprocess engineering principles, Academic Press.
- Harold L. Drake (1995) Acetogenesis. Boston, MA, Springer US.
- Drake HL, Gössner AS, Daniel SL (2008). Old acetogens, new light. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125 100–128.

- Drake HL, Küsel K, Matthies C (2006) Acetogenic Prokaryotes. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): The Prokaryotes. New York, NY: Springer New York 354–420.
- Du C, Yan H, Zhang Y, Li Y, Cao Z (2006). Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69 (5): 554–563.
- Dürre P, Eikmanns BJ (2015). C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. Curr. Opin. Biotechnol. 35 63–72.
- Dürre, P. (2005) Handbook on clostridia. Boca Raton, Taylor & Francis.
- Friedlingstein P, Andrew RM, Rogelj J, Peters GP, Canadell JG, Knutti R, Luderer G, Raupach MR, Schaeffer M, van Vuuren, D. P., Le Quéré C (2014). Persistent growth of CO₂ emissions and implications for reaching climate targets. Nature Geosci 7 (10): 709–715.
- Fritz M, Müller V (2007). An intermediate step in the evolution of ATPases - the F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. FEBS J. 274 (13): 3421–3428.
- Fuchs G (1986). CO₂ fixation in acetogenic bacteria: Variations on a theme. FEMS Microbiol. Lett. 39 (3): 181–213.
- G. Fuchs und H.-G. Schlegel (2007) Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Gaddy, J. L. (2000) Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*, Patent, US 6136577.
- Geerligs G, Schönheit P, Diekert G (1989). Sodium dependent acetate formation from CO₂ in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). FEMS Microbiol. Lett. 48 (3): 253–257.
- Grethlein AJ, Worden RM, Jain MK, Datta R (1990). Continuous production of mixed alcohols and acids from carbon monoxide. Appl. Biochem. Biotechnol. 24-25 (1): 875–884.
- Guo Y, Xu J, Zhang Y, Xu H, Yuan Z, Li D (2010). Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. Bioresour. Technol. 101 (22): 8784–8789.
- Haddad M, Cimpoia R, Guiot SR (2014). Performance of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* in a gas-lift reactor for syngas upgrading into hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy 39 (6): 2543–2548.
- Hass, V. C.; Pörtner, R. (2011) Praxis der Bioprozesstechnik Mit virtuellem Praktikum. 2. Aufl. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.

- Heijthuijsen JH, Hansen TA (1989). Selection of sulphur sources for the growth of *Butyribacterium methylotrophicum* and *Acetobacterium woodii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (2): 186–192.
- Heise R, Müller V, Gottschalk G (1989). Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* 171 (10): 5473–5478.
- Heiskanen H, Virkajärvi I, Viikari L (2007). The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (3): 362–367.
- Hess V, Schuchmann K, Müller V (2013). The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential. *J. Biol. Chem.* 288 (44): 31496–31502.
- Hungate RE, Macy J (1973). The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bull. Ecol. Res. Comm.* 17 123–126.
- Hunting ER, Kampfraath AA (2013). Contribution of bacteria to redox potential (E_h) measurements in sediments. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10 (1): 55–62.
- Husson F, Tu VP, Santiago-Gomez M, Cachon R, Feron G, Nicaud J, Kermasha S, Belin J (2006). Effect of redox potential on the growth of *Yarrowia lipolytica* and the biosynthesis and activity of heterologous hydroperoxide lyase. *J. Mol. Catal.* 39 (1-4): 179–183.
- Ivey DM, Ljungdahl LG (1986). Purification and characterization of the F₁-ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 165 (1): 252–257.
- Jacob H (1970). Influence of pretreatment of the redoxpotential electrode on the determination of oxygen pressure in bacterial cultures. *Pathobiology* 36 (1): 57–62.
- Jacob H (1971). Das Redoxpotential in Bakterienkulturen. *Z. Allg. Mikrobiol.* 11 (8): 691–734.
- Juang DF, Yang PC, Lee CH, Hsueh SC, Kuo TH (2011). Electrogenic capabilities of gram negative and gram positive bacteria in microbial fuel cell combined with biological wastewater treatment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8 (4): 781–792.
- Kantzow C, Mayer A, Weuster-Botz D (2015). Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *J. Biotechnol.* 212 11–18.
- Klasson KT, Ackerson MD, Clausen EC, Gaddy JL (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel* 70 (5): 605–614.
- Klasson KT, Elmore BB, Vega JL, Ackerson MD, Clausen EC, Gaddy JL (1990). Biological production of liquid and gaseous fuels from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24-25 (1): 857–873.

- Klemps R, Schoberth S, Sahn H (1987). Production of acetic acid by *Acetogenium kivui*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 (3): 229–234.
- Kundiyana DK, Huhnke RL, Maddipati P, Atiyeh HK, Wilkins MR (2010). Feasibility of incorporating cotton seed extract in *Clostridium* strain P11 fermentation medium during synthesis gas fermentation. Bioresour. Technol. 101 (24): 9673–9680.
- Kundiyana DK, Wilkins MR, Maddipati P, Huhnke RL (2011). Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by *Clostridium ragsdalei*. Bioresour. Technol. 102 (10): 5794–5799.
- Küsel K, Wagner C, Drake HL (1999). Enumeration and metabolic product profiles of the anaerobic microflora in the mineral soil and litter of a beech forest. FEMS Microbiol. Ecol. 29 (1): 91–103.
- Li J, Jiang M, Chen K, Ye Q, Shang L, Wei P, Ying H, Chang H (2010). Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Bioprocess. Biosyst. Eng. 33 (8): 911–920.
- Liu C, Lin Y, Bai F (2011). Development of redox potential-controlled schemes for very-high-gravity ethanol fermentation. J. Biotechnol. 153 (1-2): 42–47.
- Liu K, Atiyeh HK, Stevenson BS, Tanner RS, Wilkins MR, Huhnke RL (2014). Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. Bioresour. Technol. 151 69–77.
- Liu S, Suflita JM (1993). H₂-CO₂-dependent anaerobic O-demethylation activity in subsurface sediments and by an isolated bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 59 (5): 1325–1331.
- Ljungdahl LG (1986). The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 40 415–450.
- Lovley DR (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. Curr. Opin. Biotechnol. 19 (6): 564–571.
- Maddipati P, Atiyeh HK, Bellmer DD, Huhnke RL (2011). Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. Bioresour. Technol. 102 (11): 6494–6501.
- Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (10): 3968–3973.
- Mohammadi M, Najafpour GD, Younesi H, Lahijani P, Uzir MH, Mohamed AR (2011). Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15 (9): 4255–4273.

- Mohammadi M, Younesi H, Najafpour G, Mohamed AR (2012). Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87 (6): 837–843.
- Monod J (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3 (1): 371–394.
- Morinaga T, Kawada N (1990). The production of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by an anaerobic bacterium. *J. Biotechnol.* 14 (2): 187–194.
- Morvan B, Bonnemoy, Gérard, Frédérique (1996). Quantitative Determination of H₂ - Utilizing Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea from Digestive Tract of Different Mammals. *Curr. Microbiol.* 32 (3): 129–133.
- Müller V (2003). Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11): 6345–6353.
- Müller V, Aufurth S, Rahlfs S (2001). The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na⁺ translocating F₁F₀-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1505 (1): 108–120.
- Müller V, Frerichs J (2013). *Acetogenic Bacteria*. eLS. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Müller V, Imkamp F, Rauwolf A, Küsel K, Drake HL (2004). Molecular and cellular biology of acetogenic bacteria. *Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects* 251–281.
- Munasinghe PC, Khanal SK (2010a). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresour. Technol.* 101 (13): 5013–5022.
- Munasinghe PC, Khanal SK (2010b). Syngas fermentation to biofuel: evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (k_{La}) in different reactor configurations. *Biotechnol. Prog.* 26 (6): 1616–1621.
- Munasinghe PC, Khanal SK (2011). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels. *Biofuels* 79.
- Onderdonk AB, Johnston J, Mayhew JW, Gorbach SL (1976). Effect of dissolved oxygen and E_h and *Bacteroides fragilis* during continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (2): 168–172.
- Orgill JJ, Atiyeh HK, Devarapalli M, Phillips JR, Lewis RS, Huhnke RL (2013). A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, hollow fiber membrane and stirred tank reactors. *Bioresour. Technol.* 133 340–346.
- Perski H, Moll J, Thauer RK (1981). Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* 130 (4): 319–321.
- Peters V (1998). Efficiency of hydrogen utilization during unitrophic and mixotrophic growth of *Acetobacterium woodii* on hydrogen and lactate in the chemostat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26 (4): 317–324.

- Peters V, Conrad R (1995). Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4): 1673–1676.
- Peters V, Janssen PH, Conrad R (1999). Transient Production of Formate During Chemolithotrophic Growth of Anaerobic Microorganisms on Hydrogen. *Curr. Microbiol.* 38 (5): 285–289.
- Poehlein A, Schmidt S, Kaster A, Goenrich M, Vollmers J, Thürmer A, Bertsch J, Schuchmann K, Voigt B, Hecker M, Daniel R, Thauer RK, Gottschalk G, Müller V (2012). An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS ONE* 7 (3): e33439.
- Rabaey K, Rodríguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, Verstraete W, Neelson KH (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J.* 1 (1): 9–18.
- Ragsdale SW, Pierce E (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (12): 1873–1898.
- Sahm, H.; Antranikian, G.; Stahmann, K.-P.; Takors, R. (2013) *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26 (2): 100–108.
- Schmidt RL, Conney CL (1986). Production of acetic acid from hydrogen and carbon dioxide by *Clostridium* species ATCC 29797. *Chem. Eng. Commun.* 45 (1-6): 61–73.
- Schmidt S, Biegel E, Müller V (2009). The ins and outs of Na⁺ bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (6): 691–696.
- Schuchmann K, Müller V (2012). A bacterial electron-bifurcating hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 287 (37): 31165–31171.
- Schuchmann K, Müller V (2013). Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* 342 (6164): 1382–1385.
- Schuchmann K, Müller V (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat. Rev. Micro.* 12 (12): 809–821.
- Sharak Genthner B, Bryant MP (1987). Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (3): 471–476.
- Shen Y, Brown R, Wen Z (2014). Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. *Biochem. Eng. J.* 85 21–29.
- Sim JH, Kamaruddin AH, Long WS, Najafpour G (2007). *Clostridium aceticum* - A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of

- response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (5): 1234–1243.
- Simankova MV, Kotsyurbenko OR, Stackebrandt E, Kostrikina NA, Lysenko AM, Osipov GA, Nozhevnikova AN (2000). *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil. *Arch. Microbiol.* 174 (6): 440–447.
- Speers AM, Cologgi DL, Reguera G (2009). Anaerobic cell culture. *Curr Protoc Microbiol* Appendix 4 F.
- Stephenson, T.; Judd, S.; Jefferson, B.; Brindle, K.; International Water Association (2000) Membrane bioreactors for wastewater treatment, Citeseer.
- Straub M, Demler M, Weuster-Botz D, Dürre P (2014). Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*. *J. Biotechnol.* 178 67–72.
- Tachon S, Brandsma JB, Yvon M (2010). NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (5): 1311–1319.
- Tanner RS, Stackebrandt E, Fox GE, Woese CR (1981). A phylogenetic analysis of *Acetobacterium woodii*, *Clostridium barkeri*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium lituseburense*, *Eubacterium limosum*, and *Eubacterium tenue*. *Curr. Microbiol.* 5 (1): 35–38.
- Vega JL, Prieto S, Elmore BB, Clausen EC, Gaddy JL (1989). The biological production of ethanol from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20-21 (1): 781–797.
- Vogel, H. C.; Todaro, C. C. (1997) Fermentation and biochemical engineering handbook Principles, process design, and equipment. 2nd ed. Westwood, N.J., Noyes Publications.
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (3): 1021–1030.
- Wieringa KT (1936). Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek* 3 (1-4): 263–273.
- Wilhelm E, Battino R, Wilcock RJ (1977). Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* 77 (2): 219–262.
- Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1963). Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238 2882–2886.
- Wood HG, Ragsdale SW, Pezacka E (1986). The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 39 (4): 345–362.

- Worden RM, Grethlein AJ, Zeikus JG, Datta R (1989). Butyrate production from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. Appl. Biochem. Biotechnol. 20-21 (1): 687–698.
- Yang HC, Drake HL (1990). Differential effects of sodium on hydrogen- and glucose-dependent growth of the acetogenic bacterium *Acetogenium kivui*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (1): 81–86.
- Yu Y, Wang Y, Chu J, Zhuang Y, Zhang S (2007). The influence of controlling redox potential on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Chin. J. Biotechnol. 23 (5): 878–884.
- Zehnder AJ, Wuhrmann K (1976). Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science 194 (4270): 1165–1166.
- Zoski, C. G. (2007) Handbook of electrochemistry. 1st ed. Amsterdam, Boston, Elsevier.

9 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bezeichnung</i>
ack	Acetatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>
BTM	Biotrockenmasse, g L ⁻¹
CoA	Coenzym A
CoFeS-P	Corrinoid/Eisen-Schwefel Protein (engl. <i>corrinoid iron sulphur protein</i>)
CSTR	Kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (engl. <i>continuous stirred tank reactor</i>)
D	Durchflussrate, h ⁻¹
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Ech	energiekonservierende Hydrogenase
Fd/Fd ²⁻	Ferredoxin
HEPA	Filter (engl. <i>high efficiency particulate arrestance filter</i>)
HFMR	Rührkesselreaktor mit submersen Hohlfasermembranen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
Hyd	Hydrogenase
k _L a	Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient
μ _{max}	Maximale Wachstumsrate
μ-GC	μ-Gaschromatographie
MFC	Massendurchflussregler (engl. <i>mass flow controller</i>)
MFM	Massendurchflussmesser (engl. <i>mass flow meter</i>)
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphatpuffer (engl. <i>phosphate buffered system</i>)
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pCO ₂ ^{Eingang}	Kohlenstoffdioxidpartialdruck am Gaseingang des Reaktors
pH ₂	Wasserstoffpartialdruck
pH ₂ ^{Eingang}	Wasserstoffpartialdruck am Gaseingang des Reaktors
P _i	Monophosphat
PPG	Polypropylenglycol
pta	Phosphotransacetylase
q _P	Zellspezifische Produktbildungsrate, g g ⁻¹ d ⁻¹
Q _P	Volumetrische Produktbildungsrate, g L ⁻¹ d ⁻¹
Rnf	Ferredoxin-NAD ⁺ Oxidoreduktase
rpm	Drehzahl (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, g L ⁻¹ d ⁻¹
SLP	Substratkettenphosphorylierung
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>stirred tank reactor</i>)
τ	Verweilzeit, d
TBR	Rieselbettreaktor (engl. <i>trickle bed reactor</i>)
THF	Tetrahydrofolat
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser

10 Anhang

10.1 Medien, Medienzusätze und Puffer

Tabelle 10.1: Zusammensetzung des PBS-Puffers

Komponente	Konzentration	Einheit
KCl	0,20	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,24	g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44	g L ⁻¹
NaCl	8,00	g L ⁻¹

Tabelle 10.2: Zusammensetzung der Vitaminlösung für das Medium DSMZ 135 (Wolin et al. 1963)

Komponente	Konzentration	Einheit
Biotin	2,00	mg L ⁻¹
D-Ca-Panθοthenat	5,00	mg L ⁻¹
Folsäure	2,00	mg L ⁻¹
Liponsäure	5,00	mg L ⁻¹
Nikotinsäure	5,00	mg L ⁻¹
p-Aminobenzoessäure	5,00	mg L ⁻¹
Pyridoxin-HCl	10,00	mg L ⁻¹
Riboflavin	5,00	mg L ⁻¹
Thiamin-HCl · H ₂ O	5,00	mg L ⁻¹
Vitamin B ₁₂	0,10	mg L ⁻¹

Tabelle 10.3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Medium DSMZ 135. Zunächst wird Nitritotriessigsäure eingewogen und der pH auf mit KOH auf 6,5 eingestellt. Nachdem alle weiteren Komponenten eingewogen wurden wird der pH mit KOH auf 7,0 eingestellt.

Komponente	Konzentration	Einheit
Nitritotriessigsäure	1,50	g L ⁻¹
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10	g L ⁻¹
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18	g L ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	10,0	mg L ⁻¹
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10	g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	10,0	mg L ⁻¹
KAl(SO ₄) · 12 H ₂ O	20,0	mg L ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,00	g L ⁻¹
MnSO ₄ · H ₂ O	0,50	g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	10,0	mg L ⁻¹
Na ₂ SeO ₄ · 5 H ₂ O	0,20	mg L ⁻¹
NaCl	1,00	g L ⁻¹
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	25,0	mg L ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18	g L ⁻¹

Tabelle 10.4: Thiamphenicol diente als Selektionsmarker für das Plasmid pJIR750. Die Stammlösung des Antibiotikums (20 mg mL⁻¹) wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Thiamphenicol	N,N-Dimethylformamid	20 mg L ⁻¹

10.2 μ -GC-Methodik

Zur Bestimmung der Gasanteile im Abgas der Rührkesselreaktoren wurden μ -Gaschromatographen eingesetzt, welche online im Abstand von 10 Minuten die Gaszusammensetzung ermittelten. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 10 mL min^{-1} verwendet. Während Gasfermentationen im Rührkesselreaktor von Infors wurde mit dem Gaschromatographen CP-4900 von Varian (siehe Tabelle 10.5) und der in Tabelle 10.6 zusammengefassten Methode gearbeitet. Für Gasfermentationen im Druckreaktor von Bioengineering wurde mit dem μ -Gaschromatograph 490 von Agilent (siehe Tabelle 10.7) und der in Tabelle 10.8 dargestellten Methode gemessen.

Tabelle 10.5: μ -Gaschromatograph für Gasfermentationen im Rührkesselreaktor von Infors

Komponente	Typ/ Version	Hersteller
μ -Gaschromatograph	CP-4900	Varian
GC-Modul für H ₂ (Vorsäule, Säule, Detektor)	Mol Sieve 5Å, 10 m	Varian
GC-Modul für CO ₂ (Vorsäule, Säule, Detektor)	Plora Plot PPQ, 10 m	Varian

Tabelle 10.6: Methodik zur Bestimmung der Konzentration an H₂ und CO₂ im Abgas bei Verwendung des μ -Gaschromatographen von Varian

Parameter	Kanal A (H ₂)	Kanal B (CO ₂)
Säulentemperatur	45°C	60°C
Injektionszeit	50 ms	100 ms
Backflush	6 s	-
Druck	25 psi	25 psi
Trägergas	Stickstoff	Stickstoff

Tabelle 10.7: μ -Gaschromatograph für Gasfermentationen im Druckreaktor von Bioengineering

Komponente	Typ/ Version	Hersteller
μ -Gaschromatograph	490 Micro GC	Agilent
Säulentyp	1 m CO _x	Agilent
Software	Open LAB CDS (EZ Chrome Edition)	Agilent

Tabelle 10.8: Methodik zur Bestimmung der Konzentration an H₂ und CO₂ im Abgas bei Verwendung des μ -Gaschromatographen von Agilent

Parameter	Kanal
Säulentemperatur	80°C
Injektionszeit	60 ms
Backflush	30 s
Druck	200 kPa
Trägergas	Stickstoff

10.3 Geräte

Tabelle 10.9: Allgemeine Geräte

Gerät	Ausführung	Hersteller
Analytische Waage	Explorer E121245 (0,1 mg - 210 g)	Ohaus
Analytische Waage	Explorer E1N213 (5 g - 32 kg)	Ohaus
Analytische Waage	Scout Pro 4000g	Ohaus
Autoklav	H+P 500 EC-Z	H+P Labortechnik

Autoklav	H+P Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
Magnetrührer	Variomag 90750	2mag AG
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich
pH-Meter	Lab 850	Schott
-Elektrode	BlueLine 14 pH	Schott
Mobiles pH-Meter	PCE-PHD2	PCE Group
pH-Elektrode	HI 1330 B	HANNA- Instruments
Einstrahlphotospektrometer	Spectronic Genesys 10S UV- Vis	Thermo Scientific
MTP-Photometer	Multiscan FC	Thermo Scientific
Schüttelinkubator	AJ 119	Infors
Brutschrank/Inkubator	INB 200 (30 °C)	Memmert
Trockenschrank	Serie E 28 L (80 °C)	Binder
Heizpilz	U2/2000 2L	Heraeus- Wittman
Pipetten	Transferpette S 200 µL, 1000 µL, 10 mL	Brand
Vortexer	Reax top	Heidolph
Schlauchpumpe	Reglo Digital MS-CA-4/12-100	IDEX Healthcare and Science
Schlauchpumpe	501U	Watson Marlow

Tabelle 10.10: Geräte für den Betrieb der Anaerobwerkbank

Gerät	Ausführung	Hersteller
Anaerobe Kammer aus Vinyl, mit 2 manuell betriebenen Rundscheulen	Typ A	Coy Laboratory, Vertrieb: Toepffer GmbH
Vakuumpumpe für Betrieb der Rundscheulen	G608NGX	Coy Laboratory Products
HEPA-Filtereinheit		Coy Laboratory Products
Gasmessgerät	für Sauerstoff und Wasserstoff	Coy Laboratory Products
Lüftergehäuse, unbeheizt	mit Trockenmittel und Palladiumkatalysatoren (StakPak)	Coy Laboratory Products
Trockenofen zum Ausheizen der Katalysatoren	UNB 100 (bis 200 °C)	Memmert

Tabelle 10.11: Verwendeter Laborrührkesselreaktor einschließlich der Peripheriegeräte

Gerät	Ausführung	Hersteller
Gasmischstation	WMR 4000	Westphal Mess- & Regelungstechnik
Laborrührkesselreaktor mit Steuereinheit	Labfors 4, Glasgefäß mit Doppelmantel	Infors
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo
Redoxelektrode	Pi 4805-SC-DPAS-K8S/120 combination	Mettler Toledo
Schnellprobenahmesystem ohne Totvolumen	Prototyp, Patent DE 102005049226	2 mag AG
Software	IrisNT Pro Balance Version 4.11	Infors

Tabelle 10.12: Verwendeter Druckreaktor einschließlich Peripheriegeräte

Gerät	Ausführung	Hersteller
Gasmischstation	F-101D-RAD-33-V	Bronkhorst
Laborrührkesselreaktor mit Steuereinheit	KLF 2000, <i>in-situ</i> sterilisierbar	Bioengineering
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo
Redoxelektrode	Pi 4805-SC-DPAS-K8S/120 combination	Mettler Toledo
Software	BioSCADA Lab	Bioengineering

Tabelle 10.13: Verwendete Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Komponente	Typ/ Version	Hersteller
Autosampler	HPLC Autosampler Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Manager	Smartline 5000	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Pumpe	HPLC LC Pumpe Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
RI-Detektor	HPLC RI Detektor	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Säulenofen	Jet Stream 5 – 85 °C	Knauer
Software	Agilent EZChrom Elite	Agilent
Trennsäule	Aminex HPX-87H, 300x7, 8 mm (125-0140)	Bio-Rad
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge (125-0129)	Bio-Rad

10.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10.14: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure	$C_6H_{13}NO_4S$	Carl Roth
Aluminiumkaliumsulfat- Dodecahydrat	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	Merck
Ammoniak, ca. 25%	NH_3	Seelze Honeywell
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Carl Roth
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Carl Roth
Borsäure	H_3BO_3	Sigma Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	Merck
Cobaltsulfat-Heptahydrat	$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck
Cyanocobalamin	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Carl Roth
D-Calciumpanthotenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth
Eisen(III) citrat	$C_6H_5FeO_7$	Sigma Aldrich
Folsäure	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	Carl Roth
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Carl Roth
Glycerin, 99,5%	$C_3H_8O_3$	Hugo Häffner Vertrieb
Hefeextrakt	-	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth
Kaliumhexacyanoferrat(III)	$K_3Fe(CN)_6$	Carl Roth
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Carl Roth

L-Cystein · HCl	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl$	Carl Roth
Liponsäure	$C_8H_{14}O_2S_2$	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth
Mangansulfat-Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	Merck
Natriumacetat	$NaCH_3COO$	Carl Roth
Natriumacetat-Trihydrat	$NaC_2H_3O_2 \cdot 3 H_2O$	Carl Roth
Natriumborhydrid	$NaBH_4$	Merck
Natriumchlorid	$NaCl$	Merck
Natriumchlorid	$NaCl$	Merck
Natriumdithionit	$Na_2S_2O_4$	Sigma Aldrich
Natriumformiat	$NaCOOH$	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck
Natriumnitrat	$NaNO_3$	Carl Roth
Natriumnitrit	$NaNO_2$	Merck
Natriumselenit	Na_2SeO_3	Sigma Aldrich
Natriumsulfid-Nonahydrat	$Na_2S \cdot 9 H_2O$	Sigma Aldrich
Natriumsulfit	Na_2SO_3	Merck
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck
Nikotinsäure	$C_6H_5NO_2$	Merck
Nitrilotriessigsäure	$C_6H_9NO_6$	Merck
p-Aminobenzoessäure	$NH_2C_6H_4COOH$	Merck
Phosphinsäure	H_3PO_2	Fluka
Phosphorige Säure	H_3PO_3	Sigma Aldrich
Polypropylenglykol	$H[OCH(CH_3)CH_2]_nOH$	Sigma Aldrich
Pyridoxin · HCl	$C_8H_{12}ClNO_3$	Carl Roth
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma Aldrich

Thiamin · HCl	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Sigma Aldrich
Titanium(III) chlorid	$TiCl_3$	Sigma Aldrich
Zinksulfat-Heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck

Tabelle 10.15: Verwendete Gase

Gas	Produktnummer	Lieferant
Formiergas (ARCAL F5), 50 L, 200 bar	I2513L50R2A001	Air liquide
Kohlenstoffdioxid 4.5, 50 L, 37,5 kg	P0760L50R0A001	Air liquide
Stickstoff 5.0, 50 L, 200 bar	P1709L50R2R001	Air liquide
Wasserstoff 5.0, 50 L, 300 bar	P1713L50R3A001	Air liquide

Tabelle 10.16: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Anaerobe Kulturröhrchen	Hungate Typ, 16 x 125 mm, mit Butylgummi-Septum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
Butylstopfen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Einmalkanülen	0,6 x 30 mm, 0,9 x 70 mm	B. Braun Melsungen
Einwegküvetten	Ratiolab Küvetten, Halbmikro	Ratiolab
Einwegspritzen	1, 5, 10 mL	B. Braun Melsungen
Einwegspritzen	20 und 50 mL	Becton Dickinson
Filterplatten	AcroPrep 96-Well Filterplatte 1 mL	Pall Corporation

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	Duran protect mit DIN Gewinde GL45, PU-ummantelt, 50, 250, 1000 und 2000 mL	Sigma Aldrich
Lochkappen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Mikrotiterplatte	Deepwell, 96	Nunc
Pipettenspitzen	200 und 1000 µL	Gilson
Pipettenspitzen, steril	200 und 1000 µL	VWR
Pipettenspitzen	10 mL	Brand
Probenahmeröhrchen	BD Vacutainer, 5 mL	Becton Dickinson
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Spritzenvorsatzfilter	Porengröße, 0,2 µm, steril	VWR
Zu-/Abluftfilter	AcroR 37 TF, PTFE 0,2 µM auf PP-Träger	Pall Corporation
