

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Charakterisierung der Anodenatmung von *Pseudomonas putida*  
in Rührkesselreaktoren**

**Sarah Beate Hintermayer**

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. rer. nat. Sonja Berensmeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 17.05.2016 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 20.07.2016 angenommen.



*„Überall geht ein frühes Ahnen dem späten Wissen voraus.“*

Alexander von Humboldt



## **Danksagung**

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und hilfreichen Ratschläge, den großen Freiraum bei der Durchführung der Forschungsarbeiten und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Beim Coreferenten Prof. Dr. Siegfried Scherer (Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM) und bei der Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Sonja Berensmeier (Fachgebiet für Selektive Trenntechnik, TUM) bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe. Den Projektpartnern an der University of Queensland (UQ, Australien), Dr. Jens Krömer, Bin Lai und Shiqin Yu, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Aufnahme während meines Forschungsaufenthaltes. Bei Dr. Marianne Hanzlik (Fachgebiet Elektronenmikroskopie, TUM) bedanke ich mich für die Raster-elektronenmikroskopaufnahmen, bei Markus Brammen (Fachgebiet für Selektive Trenntechnik, TUM) für die freundliche Unterstützung bei den BET-Messungen, bei Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich und Dr. Claudia Huber (Lehrstuhl für Biochemie, TUM) für GC-MS-Messungen, bei Julia Tröndle (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) für LC-MS-Messungen und bei Dr. Panos Chrysanthopoulos und Bin Lai (UQ) für HPLC- und GC-MS-Messungen. Für die Finanzierung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) der Technischen Universität München (finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG). Besonderer Dank gilt Andreas Apel, Timm Severin, Hannes Löwe, Markus Brammen und Dr. Ilka Sührer für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation. Ich bedanke mich bei allen Kollegen für die schöne Zeit, besonders bei meiner Bürokollegin Eva Strillinger. Meinen Studenten Tuan Nygen Khac, Felix Block, Marco Hochhaus, Johanna Göbel, Luisa Metzler, Christian Preischel und Lukas Franzgrote danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für das Verständnis bedanken, wenn die Arbeit wieder einmal Vorrang hatte. Bei meinen Eltern Anne und Johannes und meinem Bruder Felix möchte ich mich dafür bedanken, dass Sie in allen Lebenslagen immer für mich da waren. Meinen Großeltern Gudrun und Helmuth danke ich für die kulturelle Abwechslung. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Freund Andreas bedanken, der die ganze Zeit wie kein Zweiter für mich da war und mich immer unterstützt hat.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>6</b>
3.1	Elektrochemische Prozesse.....	6
3.1.1	Elektrochemische Zellen und Reaktoren.....	6
3.1.2	Besonderheiten elektrochemischer Reaktionen.....	9
3.1.3	Stoff- und Ladungsbilanzen .....	9
3.1.4	Reaktionstechnik .....	10
3.1.5	Zellspannung .....	12
3.1.6	Elektrodenspannung .....	14
3.1.7	Referenzelektroden.....	14
3.1.8	Elektrochemische Spannungsreihe und Redoxpotentiale.....	16
3.1.9	Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Redoxpotentials.....	18
3.1.10	Messungen mit drei Elektroden.....	18
3.1.11	Zyklische Voltammetrie .....	19
3.2	Bio-elektrochemische Prozesse .....	23
3.2.1	Bio-elektrochemische Reaktoren.....	23
3.2.2	Einflüsse zentraler Komponenten in bio-elektrochemischen Systemen.....	26
3.2.3	Eigenschaften von Graphit .....	30
3.3	Mikrobieller Elektronentransfer .....	31
3.3.1	Intrazelluläre Elektronentransferreaktionen .....	31
3.3.2	Extrazelluläre Elektronentransferreaktionen .....	33
3.4	<i>Pseudomonas putida</i> .....	36
3.4.1	Zentraler Kohlenstoffmetabolismus .....	37
3.4.2	<i>para</i> -Hydroxybenzoesäure Produktionsstoffwechselweg .....	41
3.5	<i>para</i> -Hydroxybenzoesäure.....	42
3.5.1	Verwendung .....	42
3.5.2	Industrielle Produktion von <i>pHBA</i> .....	42
3.5.3	Mikrobielle Produktion von <i>pHBA</i> .....	43
3.6	Bioprozesstechnische Grundlagen .....	45
3.6.1	Mikrobielles Wachstum.....	45
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>49</b>
4.1	Mikroorganismen.....	49
4.2	Medien .....	49
4.3	Stammhaltung .....	52
4.4	Vorkulturherstellung.....	52
4.5	Aerobe Satzprozesse in Laborrührkesselreaktoren .....	53
4.6	Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung im 0,1 L-Parallelsystem .....	53

4.7	Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung im 1 L-System.....	55
4.8	Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung in Laborrührkesselreaktoren .....	58
4.8.1	Laborrührkesselreaktor.....	59
4.9	Genomweite Stoffflussabschätzung.....	63
4.10	Reaktionstechnische Analyse.....	64
4.10.1	Abschätzung von Konzentrations-Zeit-Verläufen bei Satzverfahren.....	64
4.10.2	Interpolation von Biomasse-, Produkt- und Substratkonzentrationen.....	66
4.10.3	Abgasanalyse.....	66
4.10.4	Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen.....	66
4.11	Analytische Methoden .....	68
4.11.1	Bestimmung der optischen Dichte und der Biomassekonzentration .....	68
4.11.2	HPLC zur Quantifizierung von Glucose und organischen Säuren .....	69
4.11.3	Photometrische Messung von $K_3Fe(CN)_6$ .....	69
4.11.4	Zyklische Voltagramme .....	70
4.11.5	Messung der spezifischen Elektrodenoberflächen.....	70
4.11.6	Rasterelektronenmikroskopie der Anoden .....	70
4.11.7	Gaschromatographie-Massenspektroskopie Messungen.....	71
<b>5</b>	<b>Modellgestützte Analyse von Sauerstoff- und Anodenatmung zur pHBA-Produktion</b>	<b>72</b>
5.1	Modellvalidierung.....	72
5.2	<i>In silico</i> Abschätzung von pHBA-Erträgen für <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC76	
5.3	Diskussion.....	78
<b>6</b>	<b>Reaktionstechnische Analyse der aeroben pHBA-Produktion</b>	<b>79</b>
6.1	Satzprozesse mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC.....	79
6.1.1	Nebenproduktbildung.....	85
6.1.2	Diskussion .....	88
6.2	Effekte der gentechnischen Modifikationen auf Satzprozesse mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC.....	91
6.2.1	Satzprozesse mit <i>P. putida</i> KT2440.....	91
6.2.2	Nebenproduktbildung.....	96
6.2.3	Diskussion .....	97
6.3	Vergleich von <i>P. putida</i> KT2440 und KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC.....	99
6.3.1	Diskussion .....	104
<b>7</b>	<b>Untersuchungen zum externen Elektronentransfer</b>	<b>106</b>
7.1	Einfluss anaerober Bedingungen auf das Wachstum von <i>P. putida</i> KT2440.....	106
7.1.1	Diskussion .....	107
7.2	Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 .....	108
7.2.1	Intrazellulärer oder extrazellulärer Elektronentransfer: Untersuchungen im Komplexmedium .....	108
7.2.2	Direkter oder indirekter externer Elektronentransfer: Untersuchungen im definierten Medium .....	111



7.2.3	Definiertes Medium mit künstlichen Mediatoren.....	113
7.2.4	Diskussion .....	117
7.3	Inhibierender Einfluss von $K_3Fe(CN)_6$ .....	120
7.3.1	Diskussion .....	121
<b>8</b>	<b>Einfluss verschiedener Substrate auf die Herstellung von <i>p</i>HBA mit <i>P. putida</i> KT2440 <math>\Delta</math><i>pobA</i>/<i>p</i>SEVA-<i>ubiC</i> bei Anodenatmung</b>	<b>122</b>
8.1	Anodenatmung mit unterschiedlichen Substraten .....	122
8.1.1	Vergleich der <i>p</i> HBA-Erträge bei Anoden- und Sauerstoffatmung.....	126
8.1.2	Diskussion .....	127
8.2	Untersuchungen zur Umsetzung von <i>p</i> HBA bei Anodenatmung .....	131
8.2.1	Untersuchungen zu elektrochemischen Reaktionen und chemischen Redoxreaktionen von <i>p</i> HBA .....	131
8.2.2	Umsetzung von <i>p</i> HBA mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA</i> / <i>p</i> SEVA- <i>ubiC</i> .....	134
<b>9</b>	<b>Untersuchung der Anodenatmung in einem Rührkesselreaktor</b>	<b>136</b>
9.1	Einfluss der Arbeitselektrodenoberfläche.....	136
9.1.1	Diskussion .....	140
9.2	Einfluss eines erhöhten Stofftransportes auf die Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA</i> / <i>p</i> SEVA- <i>ubiC</i> .....	143
9.2.1	Diskussion .....	145
9.3	Einfluss des Redoxpotentials im Medium auf die Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA</i> / <i>p</i> SEVA- <i>ubiC</i> .....	149
9.3.1	Diskussion .....	151
9.4	Identifikation verbesserter Prozessbedingungen für die <i>p</i> HBA-Bildung bei Anodenatmung.....	153
9.4.1	Diskussion .....	155
9.5	<i>p</i> HBA-Bildung bei Anodenatmung im Rührkesselreaktor unter verbesserten Prozessbedingungen .....	156
9.5.1	Diskussion .....	160
9.6	Vergleich zwischen Sauerstoffatmung und mediatorvermittelter Anodenatmung .....	163
9.6.1	Diskussion .....	166
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>169</b>
<b>11</b>	<b>Ausblick</b>	<b>177</b>
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>178</b>
<b>13</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>197</b>
<b>14</b>	<b>Anhang</b>	<b>205</b>
14.1	Chemikalienliste .....	205
14.2	Materialienliste .....	207
14.2.1	Reaktoren.....	207
14.2.2	Allgemeine Geräte.....	209

14.2.3	Flüssigkeitschromatographie .....	210
14.3	IRIS-Sequenz zur Redoxpotentialregelung.....	211
14.4	Reduktionszustände ausgewählter Substrate bezüglich <i>p</i> HBA.....	212
14.5	Modifikationen des Modells iJP815 .....	213
14.5.1	iJP815 <sub>mod</sub> .....	213
14.5.2	iJP815 <sub>mod,pHBA</sub> .....	213
14.5.3	<i>p</i> HBA-Produktion.....	214
14.5.4	Anaerobe Bedingungen .....	214
14.5.5	Anodenatmung .....	214
14.6	OD-Biomassekorrelationsfaktor .....	215
14.7	HPLC-Retentionszeiten .....	216
14.8	Identifikation von Nebenprodukten .....	217
14.8.1	Malat.....	217
14.8.2	Fumarat.....	218
14.9	Tabellenverzeichnis .....	219
14.10	Abbildungsverzeichnis.....	221

# 1 Einleitung

Die chemische Industrie nutzt gegenwärtig vor allem fossile Rohstoffe wie Erdöl. Konventionelle chemische Prozesse können in vielen Fällen durch nachhaltige biotechnologische Verfahren ersetzt werden (Schüler, 2016). Diese lassen sich gegenüber herkömmlichen Prozessen energie- und emissionsärmer gestalten und ermöglichen die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen (Umweltbundesamt, 2014). 2009 lag der weltweite Anteil nachwachsender Rohstoffe, die in der chemischen Industrie für die Herstellung von Chemikalien eingesetzt wurden, bei etwa 3-4 %. Schätzungen gehen davon aus, dass sich dieser Anteil bis 2025 auf etwa 17 % erhöhen könnte, was einem Umsatz von etwa 70 - 100 Mrd. USD entspricht (Reisch, 2009). Damit Unternehmen der chemischen Industrie etablierte Prozesse durch neue biotechnologische Verfahren ersetzen, müssen diese erhebliche Vorteile wie beispielsweise niedrigere Produktionskosten bieten.

Eine der wesentlichen Einflussgrößen auf die Prozesskosten ist die Produktselektivität, die in biotechnologischen Verfahren durch Optimierung des mikrobiellen Metabolismus gesteigert werden kann. Mikrobielle Produktionsstoffwechselwege können durch die Verfügbarkeit von Ausgangsmetaboliten des Syntheseweges und von Energie in Form von ATP sowie durch den Redoxzustand von Substrat, Produkt und Mikroorganismus beeinflusst werden. Diese Faktoren sind voneinander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig. In Abhängigkeit der Redoxzustände von Substrat und Produkt werden Energie- und Redoxzustand des Mikroorganismus beeinflusst und damit die Verfügbarkeit von Ausgangsstoffen für den Produktionsstoffwechselweg (Harnisch *et al.*, 2015).

Sämtliche Prozesse unterliegen der Erhaltung der Masse und der Ladung. Dies führt oft zur Bildung von Nebenprodukten und einer Verminderung der Produktselektivität (Doran, 2013). Eine Möglichkeit zur Entkopplung von Massen- und Ladungserhaltung ergab sich durch die Entdeckung exoelektrogener Mikroorganismen vor etwa einem Jahrhundert (Potter, 1911). Diese Mikroorganismen sind in der Lage, überschüssige Elektronen über die äußere Zellmembran auf externe Akzeptoren zu übertragen. Werden Anoden als externe Elektronenakzeptoren genutzt, wird dieser Prozess als Anodenatmung (engl. „*anodic respiration*“) bezeichnet (Lovley, 2006; Torres *et al.*, 2008). Dies eröffnet neue Gestaltungsmöglichkeiten in der biotechnologischen Prozessentwicklung, da damit anaerobe Produktionsprozesse realisierbar werden, die nicht der stöchiometrischen Bilanzierung der Redoxzustände von Substraten und Produkten unterliegen (Sturm-Richter *et al.*, 2015). In der mikrobiellen Produktion von Chemikalien verspricht der Einsatz der Anodenatmung aufgrund der Verminderung der Nebenproduktbildung daher signifikante Verbesserungen der Produktselektivität und der Prozessführung.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Entwicklung innovativer biotechnologischer Prozesse ist notwendig, um eine effiziente und ökonomische Herstellung von Chemikalien mittels Mikroorganismen zu ermöglichen (Weusthuis *et al.*, 2011). Bisher entwickelte Prozesse finden unter aeroben oder anaeroben Bedingungen statt. Aerobe Prozesse weisen hohe Energieeinträge für die intensive Begasung des Mediums auf. Die damit verbundenen Kosten können in anaeroben Prozessen deutlich reduziert werden, da hier auf eine Begasung des Mediums verzichtet werden kann. Allerdings kommt es in anaeroben Prozessen oft zur Bildung unerwünschter oder sogar toxischer Nebenprodukte (Ulber und Sell, 2007).

Die Erhaltung der Ladung bei Stoffumsetzungen bedingt, dass der Redoxmetabolismus des Mikroorganismus stöchiometrisch bilanziert wird. Die bei der mikrobiellen Oxidation von Kohlenstoffquellen aufgenommenen Elektronen müssen zur Regeneration der zellulären Redoxäquivalente (zum Beispiel NADH, NADPH) aus dem Mikroorganismus entfernt werden. Während dies unter aeroben Bedingungen durch Reduktion von Sauerstoff zu Wasser geschehen kann, werden unter anaeroben Bedingungen reduzierte Nebenprodukte wie beispielsweise Acetat oder Ethanol gebildet (Singh *et al.*, 2011). Eine solche Nebenproduktbildung verringert jedoch den Ertrag des gewünschten Produkts. Kann stattdessen den Zellen eine andere Möglichkeit zur Abgabe überschüssiger Elektronen geboten werden, so könnten die Produkterträge anaerober Prozesse gesteigert werden.

Durch die Kontaktierung der Zellsuspension mit einer als Anode geschalteten Elektrode wird eine Elektronensenke in den Prozess integriert, die aufgrund ihrer unbegrenzten Elektronenaufnahmekapazität über beliebige Zeiträume als terminaler Elektronenakzeptor für den Produktionsstoffwechselweg dienen kann. Ein solcher Prozess wird als Elektrodenatmung (englisch: *electrorespiration*) bezeichnet (Rabaey und Rozendal, 2010). Steigerungen von Produkterträgen durch Prozesse mit Anodenatmung wurden bereits für verschiedene mikrobielle Stoffumwandlungen gezeigt (*Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol (Shin *et al.*, 2002), *Clostridium acetobutylicum*, n-Butanol (Kim und Kim, 1988), *Actinobacillus succinogenes*, Succinat (Park und Zeikus, 1999)).

Damit die innerhalb der Zelle befindlichen Redoxäquivalente mittels Elektronenabgabe an die Elektrode regeneriert werden können, muss ein Elektronentransfer über die äußere Zellmembran möglich sein. Exoelektrogene Mikroorganismen weisen als zentrales Charakteristikum die Fähigkeit

zum externen Elektronentransfer auf. Dabei werden zwei Mechanismen unterschieden, der direkte und der indirekte externe Elektronentransfer (Patil *et al.*, 2012). Beim direkten externen Elektronentransfer wird die Ladungsübertragung durch unmittelbaren Kontakt der Mikroorganismen mit der Elektrodenoberfläche über redoxaktive Proteine in der äußeren Zellmembran gewährleistet. Beim indirekten externen Elektronentransfer transportieren im Medium gelöste Mediatoren Elektronen zwischen Mikroorganismus und Elektrode. Mediatoren können von einigen Mikroorganismen selbst gebildet werden, es können aber auch künstlich hergestellte redoxaktive Verbindungen eingesetzt werden.

Das wirtschaftlich interessante Produkt *para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA) kann über den Shikimat-Stoffwechselweg (Biosynthese aromatischer Aminosäuren) mikrobiell hergestellt werden (Krömer *et al.*, 2013). *p*HBA wirkt antimikrobiell und wird vor allem in Form des Ethyl- und Butylesters als Konservierungsstoff in Kosmetika und pharmazeutischen Formulierungen verwendet. Dementsprechend sollte ein geeigneter Stamm eine hohe Toleranz gegenüber aromatischen Verbindungen besitzen und die Möglichkeit der *p*HBA-Produktion über den Shikimat-Weg aufweisen. Um Anodenatmung untersuchen zu können, sollte dieser Modellorganismus auch exoelektrogen sein. Mikroorganismen des Genus *Pseudomonas* können diese Anforderungen erfüllen (Collado *et al.*, 2015; Ramos-Gonzalez *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die als Sicherheitsstamm klassifizierte Spezies *Pseudomonas putida* KT2440 für die Produktion von *p*HBA über den Shikimat-Weg verwendet werden. Die dazu notwendigen gentechnischen Modifikationen des Shikimat-Stoffwechselweges wurden von Projektpartnern der Universität Queensland, Dr. Jens Krömer und Shiqin Yu, durchgeführt. Der vom Projektpartner bereitgestellte Stamm *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC* wies eine chromosomale Deletion des Gens *pobA* auf, um den Abbau von *p*HBA über den Ortho-Weg zu vermeiden und ermöglichte eine Überexpression des Gens *ubiC*, das auf einem Vektor vorlag, um den Fluss von Chorismat zu *p*HBA zu erhöhen.

*Pseudomonas putida* ist dafür bekannt eine große Anzahl an Kohlenstoffquellen umsetzen zu können (Dos Santos *et al.*, 2004). Daher soll im Rahmen dieser Arbeit mittels eines genomweiten Modells abgeschätzt werden welche Substrate sich für die *p*HBA-Bildung bei Sauerstoff- und Anodenatmung am Besten eignen. Dazu soll das genomweite Modell anhand ausgewählter Substrate zunächst experimentell validiert werden. Basierend auf den mittels des genomweiten, validierten Modells abgeschätzten *p*HBA-Erträgen sollen für die folgenden experimentellen Untersuchungen Substrate für die *p*HBA-Bildung bei Anodenatmung ausgewählt werden.

Es ist zu erwarten, dass die Anodenatmung einen deutlichen Einfluss auf die Produkt- und Nebenproduktbildung sowie das Wachstum zeigt (Kim und Kim, 1988; Pandit und Mahadevan, 2011; Park und Zeikus, 1999; Shin *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob die Anodenatmung gegenüber der klassischen Sauerstoffatmung Vorteile wie beispielsweise höhere Produkterträge bietet soll im Rahmen dieser Arbeit in aeroben Satzprozessen die Sauerstoffatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  reaktionstechnisch untersucht werden. Ein Vergleich zwischen *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  und *P. putida* KT2440 soll dazu dienen, Effekte der gentechnischen Modifikationen einordnen zu können.

Bioreaktoren zur Durchführung von Prozessen mit Anodenatmung werden als bio-elektrochemische Systeme bezeichnet. Durch ihre Aufteilung in zwei durch eine ionenselektive Membran getrennte und jeweils mit einer Elektrode kontaktierte Kammern entsprechen sie im Grundaufbau elektrochemischen Zellen. Der Einsatz mikrobieller Katalysatoren in Kathoden- oder Anodenkammer erlaubt die Umsetzung organischer Kohlenstoffquellen zu Chemikalien und elektrischem Strom (Rabaey und Rozendal, 2010). Bislang publizierte bio-elektrochemische Systeme weisen fundamental unterschiedliche Geometrien auf, werden oft nur unzureichend durchmischt und ermöglichen nur selten die Regelung wichtiger biotechnologischer Prozessgrößen wie beispielsweise des pH (Krieg *et al.*, 2014). Für aerobe und anaerobe Bioprozesse wird üblicherweise ein Rührkesselreaktor genutzt. Dieser Bioreaktortyp ist sehr gut charakterisiert und gewährleistet eine stabile und homogene Einstellung der Reaktionsbedingungen. Dies ermöglicht eine verlässliche reaktionstechnische Charakterisierung von Bioprozessen. Es wäre vorteilhaft, wenn ein entsprechendes bio-elektrochemisches System existieren würde, mit dem eine Charakterisierbarkeit von Prozessen mit Anodenatmung ermöglicht wird. Ein Ziel dieser Forschungsarbeit ist es deshalb, mittels Modifikationen eines Rührkesselreaktors ein bio-elektrochemisches System zu entwickeln, das die Vorteile des Rührkessels für die Anodenatmung nutzbar macht.

Obwohl bio-elektrochemische Reaktionen bereits 1911 entdeckt wurden (Potter, 1911) und in einer Reihe von Anwendungsgebieten wie beispielsweise zur Abwasserbehandlung (Ghafari *et al.*, 2008), zur Energieerzeugung (Liu und Logan, 2004) oder zur Herstellung von Chemikalien (Steinbusch *et al.*, 2010) eingesetzt werden, laufen bio-elektrochemische Reaktionen in der Regel langsam ab, was sich in langen Prozesszeiten sowie geringen Stromstärken und Umsatzraten äußert (Xie *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb Limitierungen bio-elektrochemischer Reaktionen anhand des Modellprozesses der Herstellung von *pHBA* mit *P. putida* KT2440 untersucht werden. Eine Voraussetzung zur Identifikation von Prozesslimitierungen ist die Untersuchung der bio-

elektrochemischen Reaktion unter stabilen Reaktionsbedingungen. Dazu soll der im Rahmen dieser Arbeit zum bio-elektrochemischen System umgebaute Rührkesselreaktor verwendet werden. Als zentrale Prozessvariablen sollen die Einflüsse der Arbeitselektrodenoberfläche, des Stofftransportes und des externen Elektronentransfers untersucht werden. Identifizierte Limitierungen sollen vermindert werden, um eine Verbesserung der *pHBA*-Bildung bei Anodenatmung zu erreichen.

Anhand der Zielsetzungen wurde für diese Arbeit die folgende Vorgehensweise formuliert:

- Computergestützte Abschätzung der *pHBA*-Bildung mit Sauerstoff- und Anodenatmung
  - Experimentelle Validierung des Modells
  - Identifikation geeigneter Kohlenstoffquellen
- Charakterisierung der *pHBA*-Herstellung mit dem vom Projektpartner (Dr. Jens Krömer, University of Queensland, Brisbane, Australien) bereitgestellten rekombinanten Stamm *Pseudomonas putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  im Satzverfahren bei Sauerstoff- und Anodenatmung
  - Einfluss unterschiedlicher Substrate
  - Identifikation von Nebenprodukten
- Vergleichende reaktionstechnische Charakterisierung von *Pseudomonas putida* KT2440 und *Pseudomonas putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  in aeroben Satzprozessen zur Untersuchung der Auswirkungen der gentechnischen Veränderungen
- Modifikation eines Rührkesselreaktors zur Nutzung als bio-elektrochemisches System für die Anodenatmung unter Beibehaltung der Betriebscharakteristik des Rührkessels
- Aufklärung des Mechanismus des extrazellulären Elektronentransfers von *Pseudomonas putida* KT2440
- Identifikation von Prozesslimitierungen der Anodenatmung von *Pseudomonas putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$
- Verbesserung der Anodenatmung von *Pseudomonas putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  zur *pHBA*-Bildung.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Elektrochemische Prozesse

Unter elektrochemischen Prozessen lassen sich alle Prozesse zusammenfassen, in denen elektrochemische Reaktionen ablaufen (Walsh, 1993). In diesem Kapitel werden Grundlagen und Besonderheiten elektrochemischer Reaktionen und Reaktoren dargestellt. Ein guter Überblick über elektrochemische Grundlagen ist bei Schmidt (2012) zu finden.

#### 3.1.1 Elektrochemische Zellen und Reaktoren

Die Untersuchung elektrochemischer Prozesse oder die gezielte chemische Stoffumwandlung unter Beteiligung von elektrischer Energie erfolgt in einer elektrochemischen Zelle beziehungsweise in einem elektrochemischen Reaktor. Eine Zelle oder ein Reaktor besteht mindestens aus den folgenden vier Komponenten (Abbildung 1) (Schmidt, 2012):

- Zwei Elektroden
- Elektrolyt
- Gehäuse
- Elektronik mit elektrischen Verbindungen

Eine Elektrode ist ein Material, in dem sich Elektronen frei bewegen können. Zu diesen Materialien zählen beispielsweise Metalle, Kohlenstoff oder leitfähige Polymere. Der Elektrolyt, in den die Elektroden eingetaucht werden, ist ein Material, in dem sich Ionen als Ladungsträger frei bewegen können, wohingegen es für Elektronen nicht leitfähig ist. Ionische Leiter umfassen Salzschnmelzen, dissoziierte Salze in Lösungen und ionische Feststoffe (Newman und Thomas-Alyea, 2004). Elektrolyt und Elektroden werden von einem Gehäuse, das nicht elektrisch leitfähig und chemisch inert ist, aufgenommen. Die Elektroden werden elektrisch leitfähig verbunden und über entsprechende Elektronik (Amperemeter, Voltmeter, Strom- und Spannungsquellen) können elektrische Ströme und Potentiale gemessen oder eingestellt werden. Diese Komponenten der elektrochemischen Zelle ermöglichen einen Elektronentransport über die zwei Elektroden und einen externen leitenden Stromkreis, der durch die Migration von Ionen im Elektrolyt geschlossen wird (Schmidt, 2012).

Dies führt dazu, dass an den beiden Elektroden unterschiedliche Reaktionen ablaufen, die Oxidation und Reduktion genannt werden. Die Oxidation beschreibt die Elektronenabgabe einer Verbindung und findet an der Anode statt. Die Reduktion beschreibt die Elektronenaufnahme einer Verbindung und findet an der Kathode statt. Die räumliche Trennung von Oxidation und Reduktion in einer



elektrochemischen Zelle führt zu dem Begriff der zwei Halbzellen (Newman und Thomas-Alyea, 2004). Dabei wird üblicherweise von anodischer und kathodischer (Halb-)Zelle gesprochen (Bargel *et al.*, 2008). Fließen Elektronen von der Anode zur Kathode, wird dies als anodischer Strom bezeichnet, der nach der Konvention der Internationalen Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) ein positives Vorzeichen hat. Fließt der Strom von der Kathode zur Anode, spricht man von einem kathodischen Strom, der ein negatives Vorzeichen hat (Koryta, 2013).

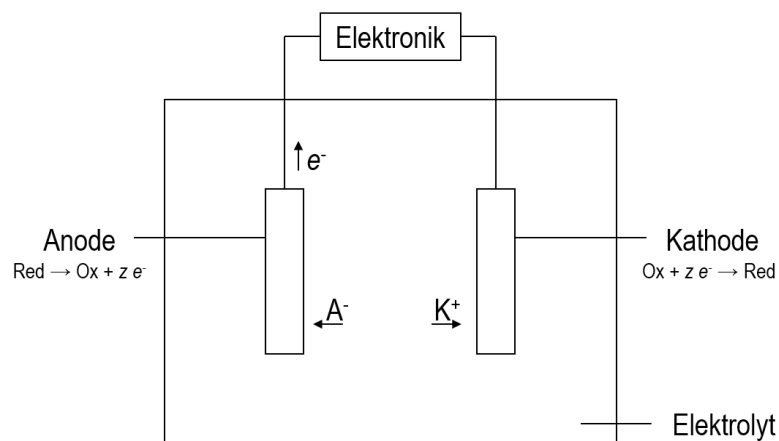


Abbildung 1 Prinzipieller Aufbau einer einfachen elektrochemischen Zelle. Dargestellt sind die essentiellen Komponenten: Elektroden, Elektrolyt, Gefäß und externer Leiterkreis. A<sup>-</sup>: Anion; K<sup>+</sup>: Kation; → und ←: Diffusionsrichtung der Ionen im elektrischen Feld; Ox: oxidierte Verbindung; Red: reduzierte Verbindung; z: Ladungszahl.

Neben dem Elektronenfluss im externen Leiterkreis kommt es im Elektrolyt zur Migration positiv und negativ geladener Ionen. Negativ geladene Ionen bewegen sich im elektrischen Feld, das sich zwischen Anode und Kathode bildet, zur Anode. Dementsprechend werden negativ geladene Ionen Anionen genannt. Die Anode ist, da die Elektronen zur Kathode fließen, positiv geladen. Positiv geladene Ionen, die Kationen genannt werden, bewegen sich zur negativ geladenen Kathode.

Zusätzlich zu den genannten essentiellen Komponenten elektrochemischer Zellen können je nach Anwendungsfall weitere Bauteile benötigt werden (Schmidt, 2012):

- Separator
- Einrichtungen zum Stofftransport (Rührer, Pumpen)
- Wärmetauscher
- Mess- und Regelungstechnik

Separatoren (zum Beispiel semipermeable Membranen, Stromschlüssel) trennen den mit Elektrolyt gefüllten Raum in eine Anoden- und eine Kathodenkammer und können notwendig werden, um unerwünschte Reaktionen zwischen anodischen und kathodischen Produkten zu verhindern. Die verbleibenden Komponenten umfassen periphere Baueinheiten, die auch in herkömmlichen chemischen Reaktoren verwendet werden und der Kontrolle der Reaktionsbedingungen dienen.

Für die Komponenten elektrochemischer Zellen oder Reaktoren ergeben sich nach Schmidt (2012) basierend auf ihren Funktionen spezielle Anforderungen an die eingesetzten Materialien, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1 Funktionen und Anforderungen der zentralen Komponenten elektrochemischer Zellen oder Reaktoren (nach Schmidt (2012)).

Komponente	Funktion	Anforderung
Anode	Oxidation von Substanzen	Geringe Materialkosten
Kathode	Reduktion von Substanzen	Stabilität
		Hohe Leitfähigkeiten
		Hohe elektrochemische Aktivität
Elektrolyt	Transport von ionischen Ladungsträgern (Anionen und Kationen) Ort vor- und nachgelagerter Reaktionen	Ionische Leitfähigkeit Chemisch inert (keine Zersetzung)
Separator	Trennung von Anoden- und Kathodenkammer	Elektrochemisch inert Durchlässigkeit für ionische Ladungs- träger
Gehäuse	Aufnahme von Elektroden und Elektrolyten Durchführung elektrochemischer Reaktionen	Geringes Volumen und Gewicht Kostengünstige Materialien Kompakter Aufbau
Peripherie / Anlage	Transport von Edukten und Produktion Temperieren des Reaktors Mess- und Regelungstechnik	Geringe Gesamtkosten Geringe Schadstoffemissionen Effizienter Einsatz von Betriebsmitteln Geringer Gesamtenergieaufwand

### 3.1.2 Besonderheiten elektrochemischer Reaktionen

Elektrochemische Reaktionen unterscheiden sich in drei Punkten wesentlich von chemischen Redoxreaktionen. Zunächst kommt es, begründet durch den Aufbau von elektrochemischen Zellen, zu einer räumlichen Trennung von Oxidation und Reduktion, während diese Reaktionen bei einer chemischen Redoxreaktion am selben Ort stattfinden. Dabei finden elektrochemische Reaktionen stets an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt statt. Es handelt sich dementsprechend um eine zweidimensionale heterogene Reaktion, während chemische Redoxreaktionen im gesamten Reaktionsvolumen stattfinden und somit dreidimensional sind. Ein Vorteil elektrochemischer Reaktionen gegenüber chemischen Redoxreaktionen ist die Einstellbarkeit der Reaktionsrate durch die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden (Newman und Thomas-Alyea, 2004).

### 3.1.3 Stoff- und Ladungsbilanzen

Bei der Aufstellung elektrochemischer Reaktionsgleichungen müssen die Elektronen als Reaktionspartner berücksichtigt werden. Wie bereits beschrieben kommt es an der Anode zur Aufnahme von Elektronen, die dann an der Kathode abgegeben werden und mit dem im Elektrolyt verfügbaren Oxidationsmittel abreagieren. Die anodischen und kathodischen Teilreaktionen werden unter Berücksichtigung der ausgetauschten Elektronen formuliert. Die Gesamtreaktionsgleichung muss hinsichtlich der Ladungsbilanz neutral sein. In der Elektrochemie gilt also neben der Massenerhaltung auch die Erhaltung der Ladung. Aufgrund der Erhaltung der Ladung sind Reaktionen an Anode und Kathode immer gekoppelt und es entstehen immer zwei Produkte (Schmidt, 2012).

Die Beziehung zwischen Massen- und Ladungsbilanzen in einer elektrochemischen Reaktion wird durch das Faraday-Gesetz beschrieben (Schmidt, 2012):

$$Q = n \cdot z \cdot F \quad 1$$

$Q$	Ladung, C
$n$	Stoffmenge, mol
$z$	Ladungszahl, -
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96\,485 \text{ C mol}^{-1}$ .

Die Faraday-Konstante ist definiert als die Ladungsmenge, die einem Mol Elektronen entspricht. Mit der Elementarladung  $e_0 = 1,6021 \cdot 10^{-19} \text{ C}$  und der Avogadro-Zahl  $N_A = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  gilt:

$$F = e_0 \cdot N_A \quad 2$$

Die elektrische Stromstärke  $I$  ist als zeitliche Änderung der Ladung  $Q$  definiert:

$$I = \frac{dQ}{dt} \quad 3$$

Setzt man Gleichung 1 in Gleichung 3 ein, ergibt sich der Zusammenhang zwischen Stromstärke und der Stoffmenge  $n$ , da  $z$  und  $F$  Konstanten sind.

$$I = \frac{dn}{dt} \cdot z \cdot F \quad 4$$

Die Produktionsrate  $dn/dt$  hängt also proportional vom Stromfluss ab (Gleichung 5). Je höher der Stromfluss, desto höher die Produktionsrate.

$$\frac{dn}{dt} = \frac{I}{z \cdot F} \quad 5$$

### 3.1.4 Reaktionstechnik

Wie bereits beschrieben wurde, sind elektrochemische Vorgänge heterogene Reaktionen und finden an der Phasengrenze zwischen Elektrode und Elektrolyt statt. Diese Phasengrenze wird auch als elektrolytische Doppelschicht bezeichnet und besteht aus der Helmholtz Schicht, in der die Elektronentransfer-Reaktion stattfindet und der Nernst'schen Diffusionsschicht. Die möglichen physikalisch-chemischen Vorgänge in der elektrolytischen Doppelschicht sind in Abbildung 2 am Beispiel einer Reduktion dargestellt. Zunächst kommt es zu einem diffusiven Stofftransport des oxidierten Eduktes durch die Nernst'sche Diffusionsschicht. In der Helmholtz Schicht streift das oxidierte Edukt die Solvathülle ab und adsorbiert an der Elektrodenoberfläche. Es kann entweder zur Desorption oder zum Elektronentransfer kommen. Erfolgt ein Elektronentransfer, entsteht das reduzierte Produkt. Diese kann im Folgenden von der Elektrodenoberfläche desorbieren (Hall und Hummel, 1995; Schmidt, 2012).

Während der Reaktion verringert sich die Konzentration des Edukts in der Helmholtz Schicht und Edukt muss aus dem Inneren des Elektrolyten durch die Nernst'sche Diffusionsschicht nachgeliefert werden. Gleichzeitig muss das Produkt vom Reaktionsort abtransportiert werden. Ist die elektrochemische Reaktion an der Elektrode schneller als der Stofftransport in der Nernst'schen Diffusionsschicht, kommt es zu einer Stofftransportlimitierung. Dies kann sich insbesondere bei porösen Elektroden negativ auf die Geschwindigkeit der Reaktion auswirken, da es hier zusätzlich zur Diffusion durch die Nernst'sche Diffusionsschicht zur Porendiffusion kommt (Abbildung 3).

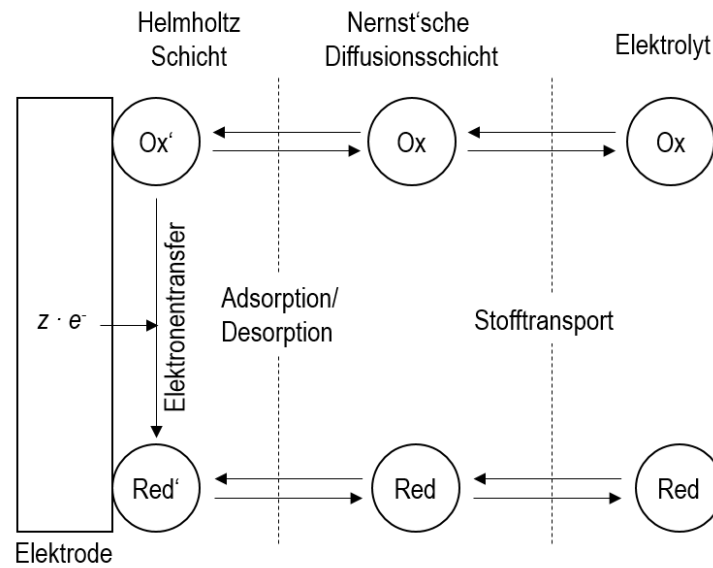


Abbildung 2 Physikalisch-chemische Prozesse an der Phasengrenze Elektrode/ Elektrolyt am Beispiel einer Reduktion (nach Schmidt (2012)).

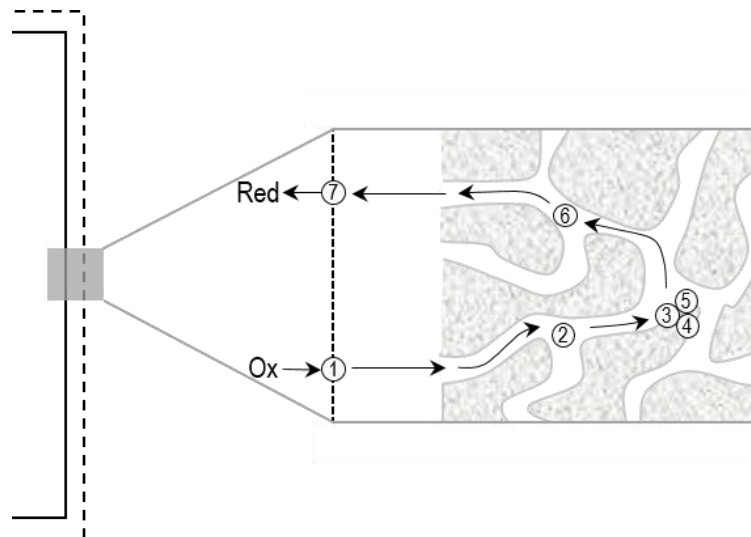


Abbildung 3 Ablauf einer heterogenen katalysierten Reaktion mit Diffusion und Adsorption an einem porösen Katalysator am Beispiel einer elektrochemischen Reduktion. (1) Diffusion des oxidierten Edukts durch die Nernst'sche Diffusionsschicht; (2) Porendiffusion des oxidierten Edukts; (3) Adsorption des oxidierten Edukts; (4) Oberflächenreaktion an einem aktiven Zentrum; (5) Desorption des reduzierten Produkts; (6) Porendiffusion des reduzierten Produkts; (7) Diffusion des reduzierten Produkts durch die Nernst'sche Diffusionsschicht (nach Behr *et al.* (2010)).

### 3.1.5 Zellspannung

Die Mess- und Regelgrößen in einer elektrochemischen Zelle sind die Spannung zwischen den Elektroden, die auch als Zellspannung  $E_Z$  bezeichnet wird, und der durch die Zelle fließende Strom  $I$ .

Im stromlosen Zustand ( $I = 0$ ) findet kein Stoff- und Ladungsumsatz an den Elektroden statt und das System befindet sich im Gleichgewicht. Die dann zwischen den Elektroden anliegende Spannung wird als thermodynamische Gleichgewichtsspannung  $E_{Z,0}$  bezeichnet.  $E_{Z,0}$  lässt sich über die freie Reaktionsenthalpie bestimmen (Schmidt, 2012):

$$-E_{Z,0} = \frac{\Delta_R G^0}{z \cdot F} \quad 6$$

mit

$$\Delta_R G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K_{\text{eq}}) \quad 7$$

$E_{Z,0}$	Zellspannung im stromlosen Zustand, V
$\Delta_R G^0$	Freie Reaktionsenthalpie im thermodynamischen Gleichgewicht, J
$z$	Ladungszahl, -
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96\,485 \text{ C mol}^{-1}$
$R$	Allgemeine Gaskonstante: $R = 8,31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
$T$	Temperatur, K
$K_{\text{eq}}$	Gleichgewichtskonstante der Reaktion

Abgeleitet aus der Druck- und Temperaturabhängigkeit von  $\Delta_R G$  ergibt sich, dass auch die Gleichgewichtsspannung  $E_{Z,0}$  eine Funktion von  $p$  und  $T$  ist. Für feste und flüssige Komponenten kann die Druckabhängigkeit im Allgemeinen vernachlässigt werden, weil sich das Volumen während der Reaktion meist nur geringfügig ändert.

$E_{Z,0}$  kann gleichfalls aus der Potentialdifferenz der beiden Elektroden bestimmt werden. Im elektrochemischen Gleichgewicht, also im stromlosen Zustand und unter Standardbedingungen gilt dann:

$$E_{Z,0} = E_{EL\ 1,0} - E_{EL\ 2,0} \quad 8$$

$E_{Z,0}$	Zellspannung im stromlosen Zustand, V
$E_{EL\ i,0}$	Potential der Elektroden 1 und 2 im stromlosen Zustand, V

Bei einem elektrochemischen Stoffumsatz fließt ein Strom durch die gesamte Zelle und deren äußeren Leiterkreis. Die Zellspannung wird zu einer Funktion der Stromstärke  $E_Z = f(I)$ .

Für den Fall  $E_Z > E_{Z,0}$  handelt es sich um ein Elektrolyseverfahren, bei dem eine Zuführung elektrischer Energie durch die Elektronik notwendig ist. Für den Fall  $E_Z < E_{Z,0}$  handelt es sich um ein galvanisches Element und die Elektronik arbeitet als elektrischer Verbraucher.

Diese beiden Betriebsweisen unterscheiden sich im thermodynamischen Sinn durch ihre Energiebilanz. Bei einer Elektrolyse ist die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta_R G$  der Gesamtreaktion  $> 0$  und der Reaktion muss von außen Energie zugeführt werden, damit sie abläuft (endergonische Reaktion). Ein galvanisches Element weist dagegen eine  $\Delta_R G < 0$  auf und bei der Reaktion, die freiwillig abläuft, wird Energie frei (exergonisch).

Die Spannung  $E_Z$  zwischen den Elektroden in einer elektrochemischen Zelle unter Stromfluss ergibt sich aus der Differenz der Einzelpotentiale  $E_{EL}$  der Elektroden 1 und 2.

$$E_Z = E_{EL\ 1} - E_{EL\ 2} \quad 9$$

$E_Z$	Zellspannung unter Stromfluss, V
$E_{EL\ i}$	Potential der Elektroden 1 und 2 unter Stromfluss, V

### 3.1.6 Elektrodenspannung

Die Einzelpotentiale der Elektroden sind experimentell nicht zugänglich, da immer zwei Elektroden nötig sind, zwischen denen mit einem hochohmigen Voltmeter die Spannung im stromlosen Zustand gemessen wird.

Für die Angabe von Einzelpotentialen wird folglich ein Bezugspunkt benötigt. Mit Hilfe einer Referenzelektrode (RE) kann das Potential einer beliebigen Elektrode bestimmt werden. Dabei wird die Spannungsdifferenz  $E_0$  zwischen der Arbeitselektrode (AE), an der sich das zu bestimmende elektrochemische Gleichgewicht einstellt und der RE gemessen:

$$E_0 = E_{AE,0} - E_{RE,0} \quad 10$$

$E_0$	Elektrodenspannung im Gleichgewicht, V
$E_{AE,0}$	Potential der Arbeitselektrode im Gleichgewicht, V
$E_{RE,0}$	Potential der Referenzelektrode im Gleichgewicht, V

Dementsprechend sollte die gemessene Elektrodenspannung immer mit Angabe der Referenzelektrode genannt werden.

### 3.1.7 Referenzelektroden

Man hat sich darauf geeinigt, als Referenz für die Bestimmung des Elektrodenpotentials das elektrochemische Gleichgewicht zwischen Wasserstoff und Hydronium-Ionen unter Standardbedingungen ( $p(\text{H}_2) = 0,1 \text{ MPa}$ ;  $T = 298 \text{ K}$ ;  $\text{pH} = 0$ ) zu verwenden. Man bezeichnet dieses Redoxsystem, das sich an einer inerten Platinelektrode einstellt, als Standard-Wasserstoffelektrode (engl. *standard hydrogen electrode*, SHE). Dieser Referenzelektrode wurde das Potential  $0 \text{ V}$  zugeordnet.

Experimentell lässt sich eine SHE im elektrochemischen Gleichgewicht realisieren, indem Wasserstoff bei einem Druck von  $0,1 \text{ MPa}$  und einer Temperatur von  $298 \text{ K}$  an einer Platinelektrode vorbeiströmt, die in eine Elektrolytlösung mit dem  $\text{pH} 0$  eingetaucht ist (Abbildung 4).

Neben der SHE gibt es eine Reihe weiterer Referenzelektroden, die sich durch einen einfacheren Aufbau auszeichnen. Darunter fallen Elektroden erster und zweiter Art. Der Unterschied zwischen Elektroden erster und zweiter Art ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.



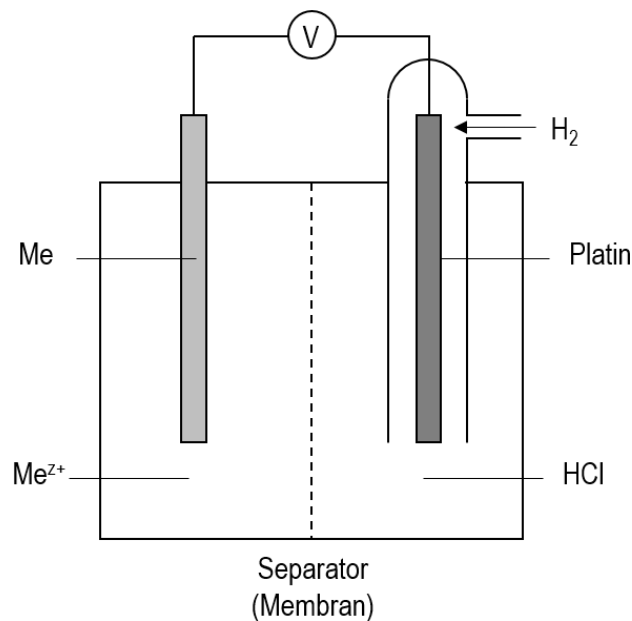


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Standard-Wasserstoffelektrode als Referenzelektrode. H<sub>2</sub>-Gas wird mit einem Druck von 0,1 MPa über die Platinelektrode geleitet, die in eine 1M HCl Elektrolytlösung getaucht ist. Me: Metallelektrode, Me<sup>z+</sup>: Wässrige Metallionenlösung mit der Konzentration 1 M (nach Kickelbick, 2008).

Bei Elektroden erster Art (Abbildung 5 A) handelt es sich um Elektroden, deren Potential direkt von der Konzentration der sie umgebenden Elektrolytlösung abhängig ist. Diese Elektroden bestehen aus einem Metalldraht, der in eine Lösung getaucht wird, die die Kationen des Metalls enthält (Scholz, 2010). Das Metall der Elektrode vermag positiv geladene Ionen in Lösung zu schicken und bleibt dabei negativ geladen zurück. Je unedler das Metall ist, desto mehr Ionen werden je Zeiteinheit aus der Metalloberfläche gelöst und umso negativer wird das Metall aufgeladen. Gleichzeitig treffen Kationen aus der Lösung auf die Elektrode, nehmen dort Elektronen auf und vermindern so die negative Aufladung der Elektrode. Der Gleichgewichtszustand beider Vorgänge bestimmt das Potential der Elektrode. Übersteigt die Zahl der auftreffenden Kationen auf der Elektrodenoberfläche die Zahl der von der Elektrode abgegebenen Kationen, stellt sich in der Elektrode gegenüber der Lösung ein positives Potential ein. Ist die Zahl der auftreffenden Kationen gleich der Zahl der abgegebenen Kationen, ist das Potential gleich Null. Übersteigt die Zahl der emittierten abgegebenen Kationen die Zahl der auftreffenden Kationen ist das Potential der Elektrode gegenüber der Lösung negativ (Hiltner, 1935).

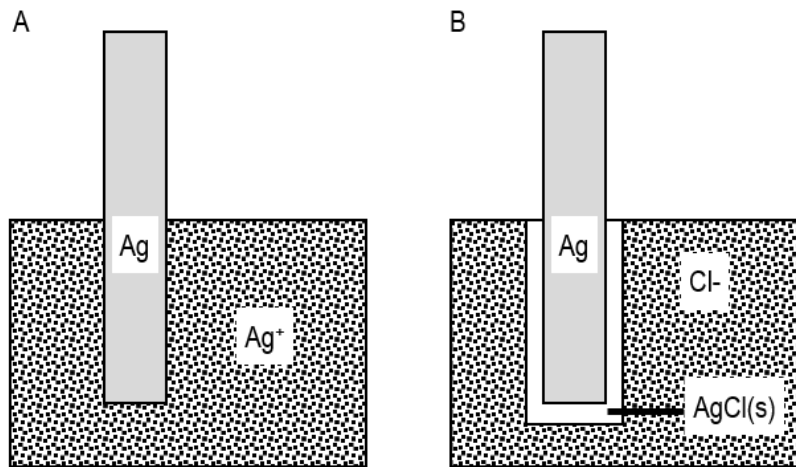


Abbildung 5 Elektroden erster und zweiter Art. (A) Schematische Darstellung einer Silberelektrode als Beispiel einer Elektrode erster Art. Die Silberelektrode wird in eine Silberionenlösung getaucht. (B) Schematische Darstellung einer Silber-Silberchlorid-Elektrode als Beispiel einer Elektrode zweiter Art. Die Silberelektrode wird in eine Silberchlorid-Lösung getaucht (nach Scholz (2010)).

Sollen elektrochemische Potentialunterschiede (zum Beispiel zwischen Elektroden) bestimmt werden, sind diese Elektroden erster Art als Referenzelektroden ungeeignet, da sich ihr Potential mit verändernden Metallionenkonzentrationen verschiebt. Die Veränderung der Metallionenkonzentration wird durch den bei der Messung stattfindenden Stromfluss ausgelöst (Kickelbick, 2008).

Deshalb benötigt man Elektroden, die von ihrer Elektrolytkonzentration weitgehend unabhängig sind. Diese nennt man Elektroden zweiter Art. Sie bestehen in der Regel aus einer Metallelektrode und einem korrespondierenden schwerlöslichen Salz. In diesem Fall wird das Gleichgewichtspotential vom Löslichkeitsprodukt des Salzes bestimmt. Dieser Wert ist für ein schwerlösliches Salz in der Regel klein, sodass sich das Potential auch bei großen Konzentrationsänderungen nur geringfügig verschiebt und das Potential als konstant betrachtet werden kann. Häufig verwendete Referenzelektroden zweiter Art sind die Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl)-Elektrode und die Kalomel-Elektrode (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Schmidt, 2012).

### 3.1.8 Elektrochemische Spannungsreihe und Redoxpotentiale

Durch die Verwendung von Referenzelektroden kann somit jeder elektrochemischen Teilreaktion ein Potential  $E$  zugeordnet werden. Wird als Bezugspunkt zur Potentialmessung die Standard-

Wasserstoffelektrode (engl. *standard hydrogen electrode*, SHE) verwendet, ergibt sich das Standardpotential  $E_0$ . Werden die Standardpotentiale nach der Größe geordnet, erhält man die elektrochemische Spannungsreihe.

$E_0$  kann für Reaktionen des Typs Metall/Metall-Ion (zum Beispiel Elektroden erster Art), Nicht-Metall-Ion/Element (zum Beispiel Standard-Wasserstoffelektrode) oder Verbindung/Verbindung in die Spannungsreihe aufgenommen werden. Nimmt die Elektrode an der Redoxreaktion teil, wie es für Reaktionen des Typs Metall/Metall-Ion der Fall ist, wird meist von „*Potential*“ gesprochen. Findet eine Redoxreaktion zwischen ionischen oder elektroneutralen Verbindungen unterschiedlicher Oxidationszahl (Reaktionen des Typs Nicht-Metall-Ion/Element und Verbindung/Verbindung) statt, an der die Elektrode nicht teilnimmt, spricht man von „*Redoxpotential*“ des Redoxpaares. Elektroden, die nicht an der Redoxreaktion teilnehmen, heißen inerte Elektroden. Das Potential inerte Elektroden ist mit dem der redoxaktiven Spezies im Elektrolyt identisch. Beispiele für inerte Elektroden sind Platin, Gold und Graphit (Blumenthal *et al.*, 2006; Kotz *et al.*, 2006).

In der elektrochemischen Spannungsreihe können (Redox-)Potentiale kleiner und größer sein als das der SHE (Abbildung 6). Edukte von Reaktionen, die ein positives Potential bezogen auf die SHE haben, werden als edel bezeichnet. Es handelt sich um Oxidationsmittel, die mit steigendem (Redox-)Potential Elektronen immer einfacher aufnehmen. Als unedel werden Edukte von Reaktionen mit einem negativen Elektrodenpotential bezüglich SHE bezeichnet. Es handelt sich um Reduktionsmittel. Je niedriger das (Redox-)Potential, desto leichter werden Elektronen dieser Stoffe abgegeben. Dementsprechend kann man festhalten, dass Elektronen immer von niedrigen zu hohen Potentialen wandern.

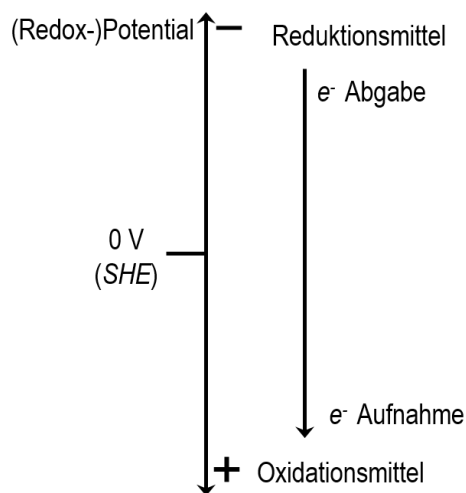


Abbildung 6 Schematische Darstellung der elektrochemischen Redox-Reihe.

### 3.1.9 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Redoxpotentials

Die Nernst-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit des Redoxpotentials  $E$  von der Temperatur und der Konzentration der Reaktionspartner, wenn keine Standardbedingungen ( $p \neq 0,1$  MPa,  $T \neq 298$  K;  $c \neq 1$  mol L<sup>-1</sup>) herrschen.

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{c_{ox}}{c_{red}}\right) \quad 11$$

$E_0$	Standardredoxpotential, V
$R$	Allgemeine Gaskonstante, $R = 8,31447$ J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
$T$	Temperatur, K
$z$	Ladungszahl, -
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96\,485,34$ C mol <sup>-1</sup>
$c_{ox}$	Konzentration des oxidierten Stoffes, mol L <sup>-1</sup>
$c_{red}$	Konzentration des reduzierten Stoffes, mol L <sup>-1</sup>

Die Nernst-Gleichung gilt für Redoxgleichgewichte, Elektroden, Halbzellen und galvanische Elemente. Das Symbol  $E$  bezeichnet somit Redoxpotentiale eines Redoxsystems, Elektrodenpotentiale einer Elektrode oder Halbzelle oder die reversible Zellspannung galvanischer Elemente (Kurzweil und Scheipers, 2012). Die in Gleichung 11 dargestellte Form der Nernst-Gleichung gilt für den über inerte Elektroden vermittelten Elektronentransfer.

### 3.1.10 Messungen mit drei Elektroden

Wie schon 1941 von Hickling beschrieben, bestimmt das Elektrodenpotential elektrochemische Prozesse. Es verändert sich in Abhängigkeit der Stromstärke, der Temperatur, dem Elektrodenmaterialien und der Elektrolytzusammensetzung. Hickling entwickelt deshalb ein Gerät, das es ermöglichte, das Potential einer Elektrode, der sogenannten Arbeitselektrode, konstant zu halten. Dieses im äußeren Stromkreis angeordnete Gerät nannte er Potentiostat. Die dabei verwendete elektrochemische Strom-Spannungs-Messung basiert auf einer Drei-Elektrodenanordnung (Abbildung 7).

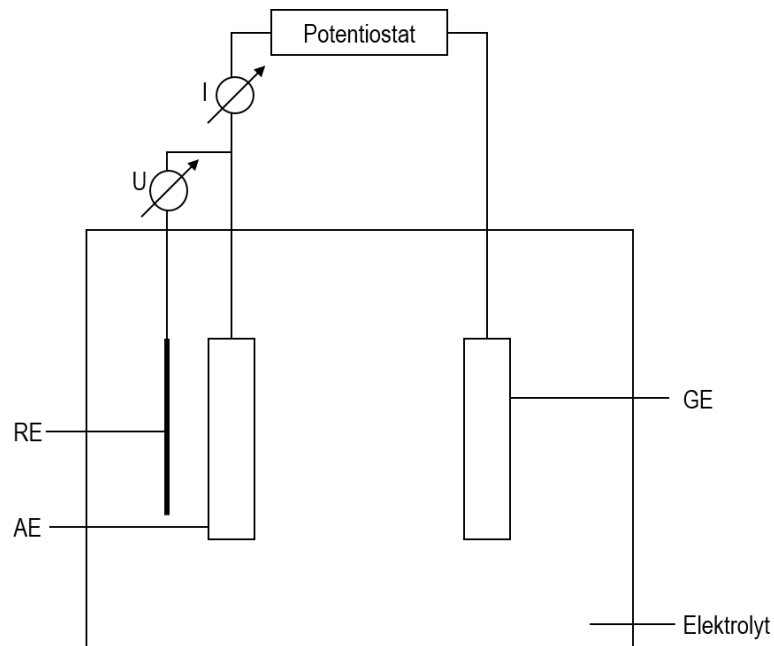


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Drei-Elektrodenanordnung. RE: Referenzelektrode; AE: Arbeitslektrode; GE: Gegenelektrode; I: Amperemeter; U: Voltmeter.

Der Strom fließt über den äußeren Leiterkreis zwischen AE und GE und wird mit einem in Serie geschalteten Amperemeter gemessen. Die Referenzelektrode wird nahe der Arbeitslektrode positioniert, sodass RE, AE und GE in einem Dreieck angeordnet sind. Das Potential dieser Referenzelektrode muss bekannt sein und darf sich bei Stromfluss durch die Zelle nicht verändern. Hier kommen in der Praxis die zuvor beschriebenen Elektroden zweiter Art zum Einsatz. Zwischen der Arbeitslektrode und der Referenzelektrode wird dann die Spannung mit einem hochohmigen Voltmeter nahezu stromlos gemessen und als Potential der Arbeitslektrode angegeben. Über einen Regelkreis kann das gemessene Potential mit dem Sollwert verglichen werden. Indem der Potentiostat als elektrischer Verbraucher oder als elektrische Energiequelle arbeitet, wird der Istwert an den Sollwert angepasst.

### 3.1.11 Zyklische Voltammetrie

Die Voltammetrie umfasst dynamische elektrochemische Methoden, bei denen, abhängig vom anliegenden Potential, an stromdurchflossenen Elektroden auf Grund von Elektrodenreaktionen zeitabhängige Ströme gemessen werden. Eine mögliche Betriebsweise stellt die zyklische Voltammetrie dar, bei der mittels der Dreieckspannungsmethode das elektrochemische Verhalten einer redoxaktiven chemischen Verbindung sowie vor- und nachgelagerte Reaktionen untersucht

werden können (Gracia-Angel, 2006). Unter Verwendung der Drei-Elektrodenanordnung wird dabei zwischen Referenz- und Arbeitselektrode das Potential der Arbeitselektrode zyklisch zwischen zwei definierten Potentialen mit konstanter Geschwindigkeit (Potentialvorschubgeschwindigkeit  $v = dE dt^{-1}$ ) variiert. Wie in Abbildung 8 A dargestellt, ergibt sich ein sägezahnartiger Verlauf des Elektrodenpotentials.

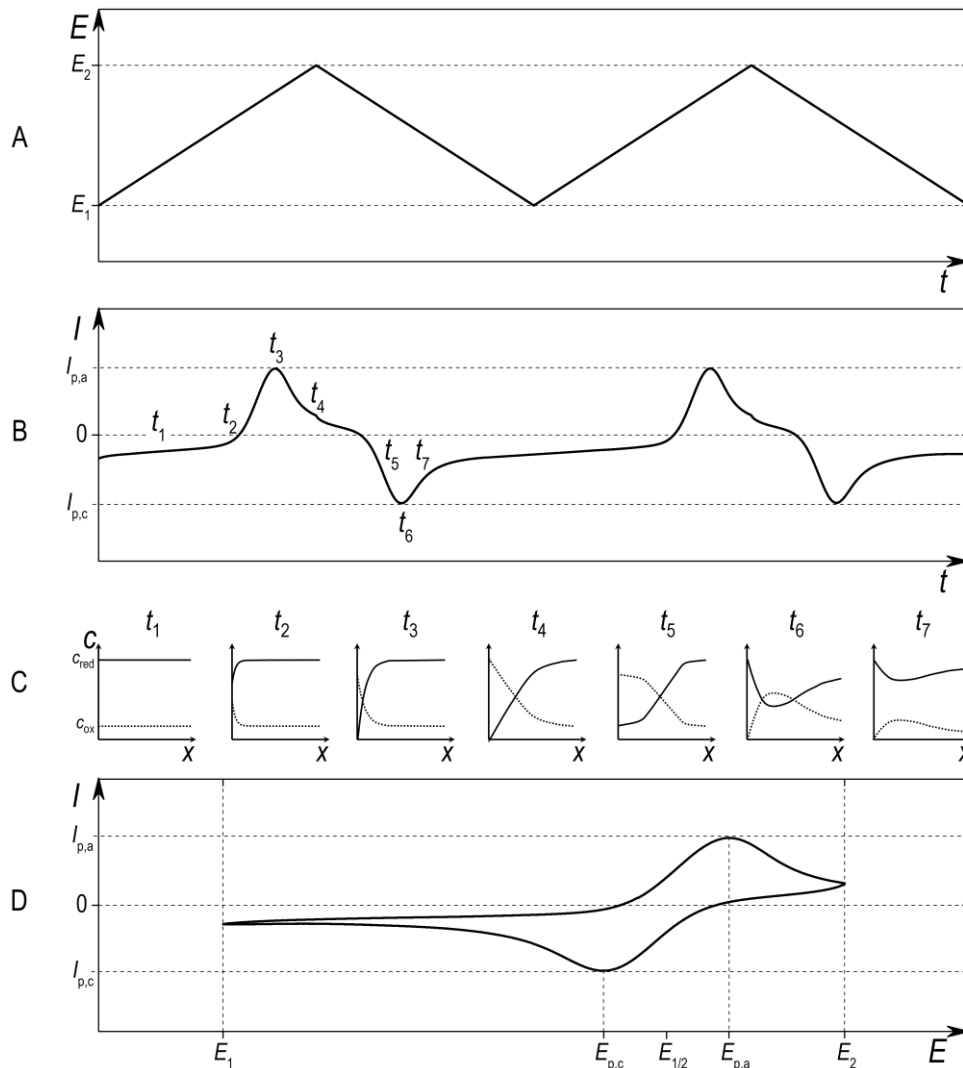


Abbildung 8 Prinzip der zyklischen Voltammetrie. (A) Potential der Arbeitselektrode aufgetragen über die Zeit. (B) Stromstärke aufgetragen über die Zeit. (C) Konzentrationsprofile zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Elektrodenoberfläche.  $c_{red}$ : Konzentration der reduzierten redoxaktiven Verbindung (durchgezogene Linie);  $c_{ox}$ : Konzentration der oxidierten redoxaktiven Verbindung (gestrichelte Linie). (D) Zyklisches Voltammogramm.  $I_{p,a}$ : Anodischer Spitzenstrom;  $E_{p,a}$ : Anodisches Spitzenstrompotential;  $I_{p,c}$ : Kathodischer Spitzenstrom;  $E_{p,c}$ : Kathodisches Spitzenstrompotential. (Abbildung wurde aus Originaldaten erstellt: CV von  $K_3Fe(CN)_6$ , 1 mM, Vorschubgeschwindigkeit  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ).

Die Umkehrpotentiale ( $E_1$  und  $E_2$ ) werden im Allgemeinen innerhalb des elektrochemischen Stabilitätsfensters des verwendeten Elektrolyten gewählt. Wird beispielsweise ein wässriger Elektrolyt verwendet, sollte das kathodische Umkehrpotential  $E_1$  größer als das der einsetzenden  $H_2$ -Bildung sein und das anodische Umkehrpotential  $E_2$  kleiner als das der einsetzenden  $O_2$ -Entwicklung (Schmidt, 2012).

Die durch das Anlegen der Dreiecksspannung generierten Strom-Spannungskurven beginnen bei einem Potential  $E_1$  (Abbildung 8 C,  $t_1$ ). Mit Erhöhung des Potentials beginnt die Oxidation der redoxaktiven Verbindung. Durch die Änderung des Elektrodenpotentials kommt es an der Elektrodenoberfläche zu einer Änderung des Konzentrationsgefälles (Abbildung 8 C,  $t_2$ ). Während dieser Zeit steigt der Strom an. Bei ausreichender Erhöhung der Spannung sinkt die Konzentration der reduzierten Spezies ( $c_{red}$ ) auf Null. Bei  $c_{red} = 0$  wird der Grenzstrom  $I_p$  erreicht (Abbildung 8 C,  $t_3$ ). Mit Verminderung von  $c_{red}$  kommt es an der Elektrodenoberfläche gleichzeitig zur Erhöhung der oxidierten redoxaktiven Spezies ( $c_{ox}$ ). Da der Elektrolyt während der Aufzeichnung eines zyklischen Voltammograms nicht durchmischt wird, wächst die Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht an und wirkt dem Konzentrationsgefälle entgegen. Der Diffusionsstrom  $I_d$  sinkt mit wachsender Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht (Abbildung 8 C,  $t_4$ ) und es kommt zur Ausbildung eines charakteristischen Strommaximums (anodischer Spitzenstrom). Mit Erreichen des Umkehrpotentials  $E_2$  wird die Spannungsvorschubrichtung  $v$  umgekehrt. Zu diesem Zeitpunkt liegt an der Elektrodenoberfläche eine hohe Konzentration der oxidierten Verbindung vor (Abbildung 8 C,  $t_4$ ). Mit der Verminderung des Elektrodenpotentials nimmt der Strom ab, bis nach dem Nulldurchgang ein negativer Reduktionsstrom (kathodischer Strom) gemessen werden kann. Ab diesem Zeitpunkt übersteigt die Rate der Reduktion die der Oxidation (Abbildung 8 C,  $t_5$ ). Bei weiterer Potentialabsenkung steigt der kathodische Strom weiter und es kommt zur Erhöhung von  $c_{red}$  an der Elektrodenoberfläche bis  $c_{ox} = 0$  erreicht ist (Abbildung 8 C,  $t_6$ ). Durch das Wachstum der Nernst'schen Diffusionsschicht wird mit Erreichen von  $c_{ox} = 0$  ein weiteres Ansteigen des Reduktionsstromes verhindert und es entsteht ein kathodisches Strommaximum (kathodischer Spitzenstrom). Bis das Umkehrpotential  $E_1$  erreicht wird, steigt  $c_{red}$  weiterhin an (Abbildung 8 C,  $t_7$ ). Mit Erreichen von  $E_1$  wird die Spannungsvorschubrichtung erneut geändert und der Zyklus beginnt erneut (Gracia-Angel, 2006).

Wird das eingestellte Potential gegen den gemessenen Strom aufgetragen, ergibt sich ein zyklisches Voltammogramm (engl. *cyclic voltammogramm*, CV), das die anodischen und kathodischen Spitzenströme und Spitzenstrompotentiale zeigt (Abbildung 8 D). Reversible elektrochemische

Reaktionen ( $M^- \rightleftharpoons M + e^-$ ) zeigen je einen anodischen und einen kathodischen Spitzenstrom. Finden Reaktionen über mehrere Oxidationsstufen statt, erhält man eine Folge von Spitzenströmen im zyklischen Voltammogramm. Irreversible elektrochemische Reaktionen zeigen einen einseitigen, unsymmetrischen Anstieg oder Abfall des Stromes (Kurzweil und Dietlmeier, 2015).

Das Halbstufenpotential

$$E_{1/2} = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad 12$$

liegt in der Mitte zwischen den beiden Spitzenstrompotentialen (Harris *et al.*, 2014). Aus dem Halbstufenpotential kann die chemische Identität der redoxaktiven Verbindung bestimmt werden (Holze, 1998).



## 3.2 Bio-elektrochemische Prozesse

Bio-elektrochemische Prozesse finden in elektrochemischen Systemen statt, in denen die biokatalytische Aktivität von Mikroorganismen oder Enzymen für elektrochemische Oxidationen und/oder Reduktionen genutzt wird (Harnisch *et al.*, 2011). Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Katalyse elektrochemischer Reaktionen durch Mikroorganismen beschäftigt, werden enzymatisch katalysierte elektrochemische Reaktionen nicht weiter betrachtet.

In diesem Kapitel werden zunächst die für bio-elektrochemische Reaktionen eingesetzten Systeme und deren Betriebszustände beschrieben. Im Weiteren wird detaillierter auf die zentralen Komponenten bio-elektrochemischer Reaktoren und deren Einflüsse auf den Prozess eingegangen.

### 3.2.1 Bio-elektrochemische Reaktoren

Der prinzipielle Aufbau bio-elektrochemischer Reaktoren ist identisch zu dem Aufbau elektrochemischer Zellen. Arbeits- und Gegenelektrode werden in den Elektrolyt getaucht und über einen äußeren Leiterkreis verbunden. Im Regelfall wird eine Referenzelektrode verwendet, um das Potential der Arbeitselektrode durch einen Potentiostaten einstellen zu können. Strom- und Spannungsmessungen erfolgen in der Drei-Elektrodenanordnung, die in Kapitel 3.1.10 beschrieben wurde.

Ein Separator teilt den bio-elektrochemischen Reaktor in zwei Kammern. Mikroorganismen können in einer, aber auch in beiden Kammern zur Durchführung von Oxidations- und/oder Reduktionsreaktionen eingesetzt werden. Die Terminologie für bio-elektrochemische Systeme entspricht der in der Elektrochemie verwendeten Terminologie. Dementsprechend wird von Anode und Kathode sowie von anodischen und kathodischen Reaktionen, Strömen und Kammern gesprochen.

Bio-elektrochemische Systeme werden in der Literatur entsprechend ihrer Betriebsweise in mikrobielle Brennstoffzellen, mikrobielle Elektrolysezellen oder mikrobielle Elektrosyntheszellen eingeordnet (Abbildung 9). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System entspricht in seiner Betriebsweise der mikrobiellen Brennstoffzelle.

Die mikrobielle Brennstoffzelle ist das mit Abstand am besten untersuchte bio-elektrochemischen System (Wang *et al.*, 2015). Mikrobielle Brennstoffzellen (Abbildung 9 A) werden häufig zum Zweck der Elektrizitätserzeugung verwendet. Elektrische Energie wird dabei erzeugt, indem ein Mikroorganismus organische Substrate oxidiert und die Elektronen an der Anode (terminaler

Elektronenakzeptor) abgibt (Davis und Yarbrough, 1962). Über einen externen Leiterkreis werden die Elektronen zur Kathode transportiert und reagieren hier mit den über den Separator diffundierten Ionen und/oder einem kathodischen Elektronenakzeptor (Han *et al.*, 2013).

Beim Betrieb einer mikrobiellen Brennstoffzelle sind zwei Faktoren zu beachten:

- 1) Die Anodenkammer sollte anaerob sein. Werden Anaerobier als mikrobielle Katalysatoren verwendet, ist Sauerstoff toxisch. Werden Aerobier als mikrobielle Katalysatoren verwendet, übertragen sie die Elektronen in Gegenwart von Sauerstoff nicht auf die Elektrode, sondern auf den Sauerstoff.
- 2) Der Elektronenakzeptor in der Kathodenkammer sollte nicht limitierend werden. Normalerweise wird Sauerstoff als kathodischer Elektronenakzeptor verwendet, da er frei verfügbar ist und das Produkt Wasser nicht toxisch ist. Wenn auf eine Begasung der Kathodenkammer verzichtet wird, können alternative kathodische Elektronenakzeptoren wie Kaliumhexacyanoferrat ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) oder Kaliumdichromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) eingesetzt werden (Guerrero *et al.*, 2010).

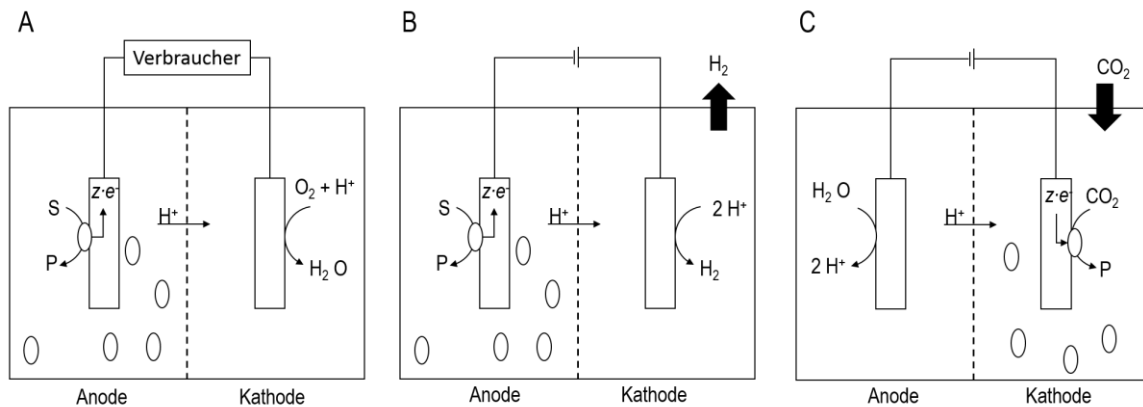


Abbildung 9 Schematische Darstellungen von bio-elektrochemischen Systemen in unterschiedlichen Konfigurationen: (A) Mikrobielle Brennstoffzelle. (B) Mikrobielle Elektrolysezelle. (C) Mikrobielle Elektrosynthesezelle. Die senkrechte gestrichelte Linie stellt den Separator dar.

Mikrobielle Elektrolysezellen (Abbildung 9 B) basieren auf demselben Prinzip wie die mikrobielle Brennstoffzelle. Allerdings wird hier extern zugeführte elektrische Energie verwendet, um thermodynamisch unvorteilhafte Reaktionen an der Kathode wie beispielsweise die Wasserstoffproduktion zu begünstigen (Logan *et al.*, 2008). In mikrobiellen Elektrosynthesezellen (Abbildung

9 C) werden Kathoden als Elektronendonoren für autotrophe mikrobielle Reaktionen wie beispielsweise zur CO<sub>2</sub>-Reduktion verwendet (Marshall *et al.*, 2012; Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum und Franks, 2014).

Je nach Betriebsweise, Anwendung, eingesetztem Mikroorganismus und Größenmaßstab wurde eine Vielzahl unterschiedlichster Reaktorgeometrien entwickelt (Janicek *et al.*, 2014; Logan, 2010). Diese reichen von Systemen im  $\mu\text{L}$ -Maßstab bis zu Pilotanlagen mit Volumina bis zu 1 m<sup>3</sup>.

Systeme im Labormaßstab lassen sich in drei Kategorien einteilen (Krieg *et al.*, 2014):

- 1) H-Reaktoren: Hier sind zwei Flaschen über eine Ionenaustauschermembran miteinander verbunden und so in Anoden- und Kathodenkammer geteilt (Liu *et al.*, 2008). Der Begriff „H-Reaktor“ basiert auf der Ähnlichkeit zwischen dem Buchstaben H und dem Reaktoraufbau in der Seitenansicht.
- 2) Würfelförmige und zylindrische Reaktoren, die ebenfalls über Membranen in 2 Kammern aufgeteilt werden (Rabaey *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2013) und
- 3) Einkammerreaktoren, in denen eine der beiden Elektroden Kontakt zu Luft oder anderen Gasen hat, die an der Reaktion teilnehmen (Krieg *et al.*, 2011; Liu und Logan, 2004).

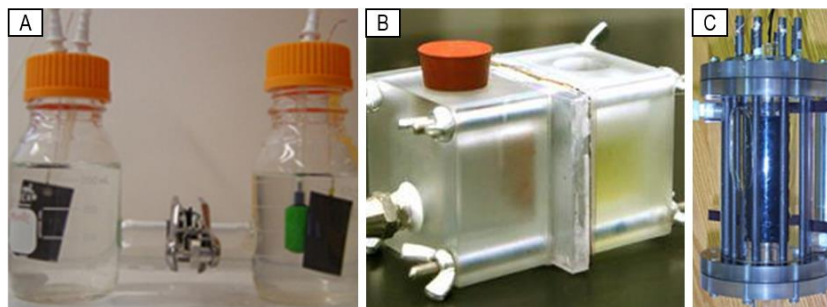


Abbildung 10 Reaktorgeometrien bio-elektrochemischer Systeme. (A) H-Reaktor (Logan, 2008). (B) Würfelförmiger Reaktor (Cao *et al.*, 2009). (C) Zylindrischer Ein-Kammerreaktor mit zentral angeordneter, rohrförmiger Luft-Kathode (Liu *et al.*, 2004).

Diese große Varianz der Reaktorgeometrien und Betriebsweisen sowie die unzureichende Messung wichtiger Prozessparameter (zum Beispiel pH) und die vernachlässigte Beschreibung von Materialeigenschaften (zum Beispiel spezifische Elektrodenoberflächen) führten dazu, dass experimentelle Ergebnisse aus unterschiedlichen Systemen nicht vergleichbar sind.

Im Gegensatz zu regulären Bioreaktoren ist in gängigen bio-elektrochemischen Reaktoren auf Grund ihrer Spezialgeometrien und -bedingungen weder eine definierte Durchmischung möglich noch die Regelbarkeit wichtiger Prozessparameter gegeben. Systeme, die eine Übertragung der Ergebnisse aus dem Labormaßstab in den industriellen Maßstab gewährleisten, sind bis heute nicht verfügbar (Krieg *et al.*, 2014).

### **3.2.2 Einflüsse zentraler Komponenten in bio-elektrochemischen Systemen**

Die zentralen Komponenten bio-elektrochemischer und elektrochemischer Systeme sind identisch und umfassen die Elektroden (Anode, Kathode) und Separatoren. Ihre Eigenschaften und Bedeutung für biologische Prozesse werden im Folgenden beschrieben.

#### **Elektroden**

Wie in elektrochemischen Zellen hat die Wahl des Elektrodenmaterials einen großen Einfluss auf den Elektronenübergang an der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt. In bio-elektrochemischen Systemen kommt es zusätzlich zu Wechselwirkungen zwischen der Elektrode und dem Mikroorganismus wie beispielsweise zu einer Veränderung der Elektrodenoberfläche durch Biofilmbildung (Biofouling) (Krieg *et al.*, 2014).

Am häufigsten werden in bio-elektrochemischen Systemen kohlenstoffbasierte Materialien verwendet (Stolten und Emonts, 2012). Oft genannte Vorteile von Kohlenstoffelektroden sind eine gute Biokompatibilität (Wei *et al.*, 2011), eine chemische Stabilität über einen weiten Potentialbereich und geringe Kosten. Weiterhin ermöglichen sie inerte elektrochemische Reaktionen und weisen elektrokatalytische Aktivitäten für eine Vielzahl von Redoxreaktionen auf. Bekannte Allotrope des Kohlenstoffes sind Graphit, Diamant und Fullerene. Am gebräuchlichsten sind graphitbasierte Elektroden (McCreery, 2008). In bio-elektrochemischen Systemen kommen diese in Form von Graphitstäben, Graphitbürsten, Graphitvliesen und Graphitgeweben zum Einsatz (Zhou *et al.*, 2011). Diese Elektrodenmaterialien variieren deutlich in ihren spezifischen Oberflächen (Kipf *et al.*, 2013). Um den Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen und Graphitelektroden zu verbessern, wurden diverse Möglichkeiten entwickelt, Elektrodenmaterialien zu modifizieren (Park und Zeikus, 2003). Elektroden wurden zu diesem Zweck beispielsweise mit Mediatoren wie Neutralrot (Park und Zeikus, 2002) beschichtet. Um Elektrodenoberflächen zu vergrößern, wurden Beschichtungen mit Wolframcarbid (Rosenbaum *et al.*, 2006), Polypyrrol (Yuan und Kim, 2008) sowie Polytetrafluorethylen (Zhang *et al.*, 2006) entwickelt. Durch alkalische Behandlung von Graphitelektroden kann die

Hydrophobizität von Graphit verringert werden und führt so zur Verbesserung des Elektronentransfers (Cheng und Logan, 2007). Meist erfolgt die Einschätzung einer Elektrode über die erreichte Stromdichte. Dazu wird die Stromstärke auf eine Fläche bezogen. Die in der Literatur am häufigsten angegebene Bezugsfläche ist die projizierte Elektrodenfläche (Sharma *et al.*, 2014). Diese Kenngröße beschreibt die von der Kontur der Elektrode umfasste Fläche aus dem Blickwinkel der gegenüberliegenden Elektrode (Sharma *et al.*, 2014). Publierte Stromdichten bezogen auf die projizierte Elektrodenflächen für modifizierte, hochporöse, dreidimensionale Elektroden liegen zwischen  $2,5 \text{ mA cm}^{-2}$  (Katuri *et al.*, 2011) und  $39 \text{ mA cm}^{-2}$  (Chen *et al.*, 2012). Die spezifischen Elektrodenoberflächen hochporöser Elektroden werden in der Regel mittels Brunauer-Emmett-Teller-Methode bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch Erhöhung der spezifischen Elektrodenoberflächen um das 10- bis 10 000-fache die Stromdichten (bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche) nur um Faktoren von 2 bis 3 gesteigert werden konnten (Gnana-Kumar *et al.*, 2013; Logan *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass bio-elektrochemische Reaktionen nicht nur durch die Größe der elektrochemisch aktiven Elektrodenoberfläche beeinflusst werden (Harrington *et al.*, 2015). Ein Grund dafür könnte die Biofilmbildung sein, welche den Stofftransport behindert und mit der Vergrößerung der Elektrodenoberfläche steigt (Harrington *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2011).

Auf der Seite der Kathode hängt der Elektronentransfer von der Konzentration des Oxidationsmittels (Elektronenakzeptor), der Verfügbarkeit der Protonen, der katalytischen Aktivität der Elektrode und der Elektrodenoberfläche ab. Als Oxidationsmittel wird in den meisten Fällen Sauerstoff aus der Luft verwendet. Dieser ist frei verfügbar und das Endprodukt Wasser ungiftig. Um die Verfügbarkeit von Sauerstoff zu verbessern, gibt es die bereits erwähnten Ein-Kammerreaktoren. Da Graphitmaterialien die Reduktion von Sauerstoff nur schlecht katalysieren, werden in der Regel teurere Katalysatoren wie Platin oder Titan verwendet (Kim *et al.*, 2007; Watanabe, 2008). Um diese teuren Materialien in Kathodenkammern zu vermeiden, gibt es Ansätze in Kathodenkammern ebenfalls Mikroorganismen als Katalysatoren einzusetzen (He und Angenent, 2006).

Da Anoden- und Kathodenreaktion immer gekoppelt sind, ist es von großer Bedeutung, beide Reaktionen zu betrachten. Limitierungen an der Gegenelektrode wirken sich direkt auf die Prozesse an der Arbeitselektrode aus. Dies kann beispielsweise im Fall des vollständigen Verbrauchs von Sauerstoff, der als Elektronenakzeptor in der Kathodenkammer genutzt wird, zur Unterbindung der Anodenreaktion führen (Jang *et al.*, 2004; Watanabe, 2008).

### Separatoren

In bio-elektrochemischen Systemen ist eine Trennung der anodischen und kathodischen Halb-Zellen durch Separatoren notwendig. Diese dienen dazu, Potentialgradienten aufrecht zu erhalten und Nebenreaktionen, wie beispielsweise die Veratmung von Sauerstoff aus der kathodische Reaktion durch Mikroorganismen, die die anodische Reaktion katalysieren sollen, zu vermeiden (Watanabe, 2008). Der Separator muss allerdings für Ionen permeabel sein, um den Stromkreis zu schließen. Es werden sowohl Anionen- als auch Kationenaustauscher verwendet (Krieg *et al.*, 2014).

Wie in Abbildung 11 dargestellt, sind Kationenaustauschermembranen für positiv geladene Ionen (Kationen) permeabel, während Anionenaustauschermembranen nur für negativ geladene Ionen (Anionen) durchlässig sind. Die Richtung der Diffusion wird über das elektrische Feld bestimmt. Kationen bewegen sich zur negativ geladenen Kathode, Anionen zur positiv geladenen Anode.

Da die Diffusion von Ionen über die Membran deutlich langsamer ist als die Migration der Elektronen über den externen Leiterkreis, kann dieser Schritt limitierend werden (Logan *et al.*, 2006). Neben Problemen wie geringer Protonenpermeabilität, Sauerstoffdiffusion, der Ausbildung von pH-Gradienten, Erhöhung des internen Widerstandes, Biofouling und Substratverluste (Dhar und Lee, 2013) stellen Membranen mit einem Anteil von etwa 38 % einen hohen Anteil an den Fertigungskosten bio-elektrochemischer Systeme dar (Rozendal *et al.*, 2008).

Werden in einem bio-elektrochemischen System Kationenaustauschermembranen verwendet, wandern Protonen und weitere positive Ionen von der Anoden- in die Kathodenkammer, um die Ladungsbilanz aufrecht zu erhalten. Die Anzahl an Kationen, die über die Membran diffundieren, muss äquivalent zu der Anzahl der vom Mikroorganismus abgegebenen Elektronen sein. Werden bei der Verwendung von Kationenaustauschermembranen beispielsweise auf Grund eines geringen pH-Gefälles nur wenige Protonen, dafür aber eine größere Menge anderer Kationen übertragen, kommt es zu einer Ansäuerung der Anodenkammer. Dies kann ohne pH-Regelung zu einer Beeinträchtigung des mikrobiellen Metabolismus führen (Franks *et al.*, 2009; Rozendal *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009).

Die Sauerstoffpermeabilität spielt vor allem in bio-elektrochemischen Systemen, in denen strikt anaerobe Mikroorganismen verwendet werden, eine wichtige Rolle, da Sauerstoff für diese Mikroorganismen, denen das Enzym Superoxid Dismutase fehlt, toxisch ist (Baron, 1996). Werden aerobe oder fakultativ aerobe Mikroorganismen verwendet, so werden bei zu hoher Sauerstoffdiffusion über die Membran Elektronen nicht länger an die Anode abgegeben, da Sauerstoff bevorzugt als terminaler Elektronenakzeptor verwendet wird. In mikrobiellen Brennstoffzellen kann

dies zu einer deutlichen Verminderung der auf die Elektrode übertragenen Elektronen führen (Dhar und Lee, 2013).

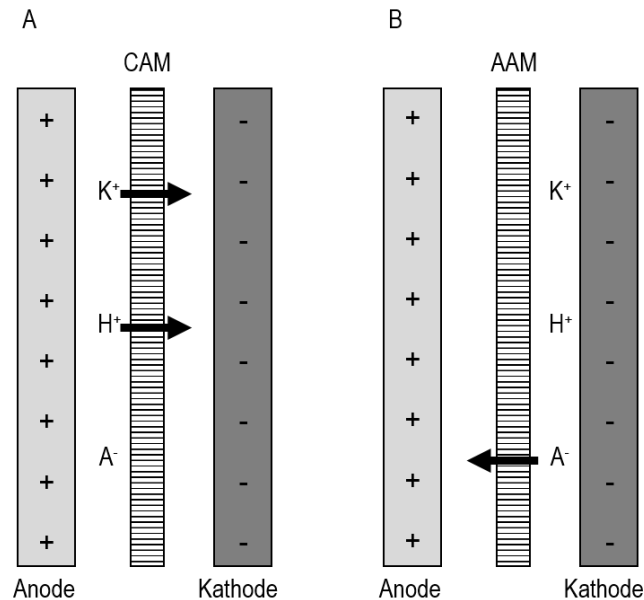


Abbildung 11 Schematische Darstellung von unterschiedlichen Membranen. (A) Kationenaustauschermembran. (B) Anionenaustauschermembran.  $K^+$ : Kation;  $H^+$ : Proton;  $A^-$ : Anion. Die Pfeile geben die Diffusionsrichtungen der Ionen über die Membran an.

Die Membran stellt in einem bio-elektrochemischen System, ebenso wie in einer elektrochemischen Zelle, einen internen Widerstand dar (Xu *et al.*, 2012). Der Membranwiderstand ist invers proportional zur Membranoberfläche (Fan *et al.*, 2008).

Durch Biofouling der Membran kann es zu einer Erhöhung des Ionentransferwiderstandes über die Membran kommen (Chae *et al.*, 2008). Biofouling hängt stark von der Struktur der Membran ab, die in der Regel durch raue Oberflächen anfälliger für Biofouling ist als glatte Flächen (Rahimnejad *et al.*, 2012). Durch Biofouling kommt es zu einer Verminderung des Ionenaustausches über die Membran (Xu *et al.*, 2012). Darunter fallen auch Protonen, die bei einer Anreicherung zu einer Ansäuerung der Anodenkammer führen können (Rozendal *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

### 3.2.3 Eigenschaften von Graphit

Das in bio-elektrochemischen Systemen am häufigsten verwendete Elektrodenmaterial ist Graphit. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Eigenschaften von Graphit dargestellt.

Graphit setzt sich aus übereinander gelagerten ebenen Kohlenstoffschichten (Graphenschichten) zusammen, die ihrerseits aus miteinander anellierten  $C_6$ -Ringen mit einer Kantenlänge von  $1,4215 \text{ \AA}$  bestehen. Dies führt zu einer wabenartigen Struktur. Die über beziehungsweise unter dieser Ebene gelegene nächste Sechseckebene ist so angeordnet, dass unter der Mitte eines jeden Sechsecks sowie über und unter jedem zweiten Kohlenstoffatom der Ausgangsschicht ein Kohlenstoffatom der oberen und unteren benachbarten Schicht zu liegen kommt (Abbildung 12).

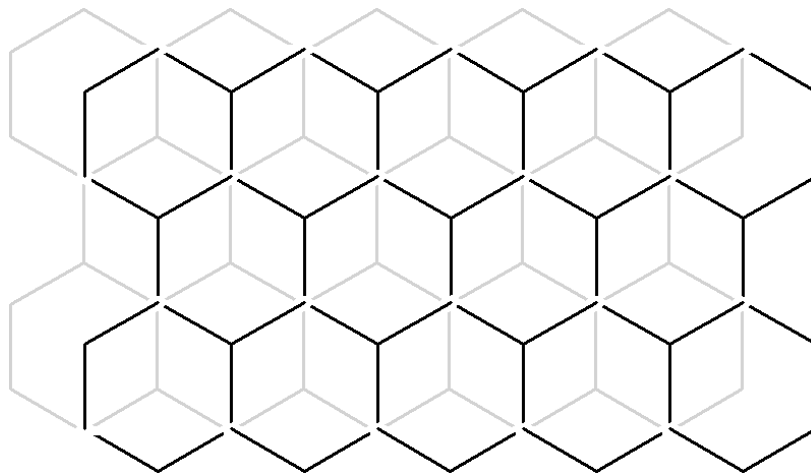


Abbildung 12 Schematische Darstellung von Graphit: Sechseckanordnung der Kohlenstoffatome innerhalb der Graphenschicht. Schwarze Linien: Ausgangsschicht.; Graue Linien: Darunter beziehungsweise darüber befindliche Schicht.

Der Schichtabstand der einzelnen Schichten dieser Schichtstruktur beträgt  $3,354 \text{ \AA}$ . Jedes Kohlenstoffatom ist  $sp^2$ -hybridisiert und bildet mit drei seiner vier Außenelektronen drei lokalisierte  $\sigma$ -Bindungen zu seinen drei Atomnachbarn aus. Die „vierten“ Valenzelektronen der Kohlenstoffatome sind in delokalisierten  $\pi$ -Molekülorbitalen untergebracht. Die Graphenschichten werden durch van-der-Waals-Kräfte und schwache  $\pi$ -Wechselwirkungen zusammengehalten, was den relativ großen Schichtabstand sowie eine leichte Spaltbarkeit und Verschiebbarkeit längs der Graphenschichten erklärt. Die delokalisierten  $\pi$ -Elektronen bedingen eine metallische Leitfähigkeit des Graphits parallel zu den Kohlenstoffschichten. Die spezifische elektrische Leitfähigkeit des Graphits beträgt  $2,6 \cdot 10^4 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wiberg und Wiberg, 2007).



### 3.3 Mikrobieller Elektronentransfer

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen des mikrobiellen Elektronentransfers zusammengefasst. Dieser kann in intra- und extrazelluläre Elektronentransferreaktionen gegliedert werden.

#### 3.3.1 Intrazelluläre Elektronentransferreaktionen

Die Summe aller biochemischen Reaktionen innerhalb des Metabolismus, die zur Umsetzung von Reduktionsäquivalenten führen, wird Redoxmetabolismus genannt. Reduktionsäquivalente umfassen Elektronen oder Elektronenäquivalente in Form eines Protons oder Hydrid-Ions (Nelson *et al.*, 2009). Die für mikrobielle Oxidationen und Reduktionen genutzten Reduktionsäquivalente können in drei Gruppen aufgeteilt werden: 1) Dihydropyridine ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ), 2) Flavine (FMN/FMNH<sub>2</sub>, FAD/FADH<sub>2</sub>) und 3) Chinone (Ubichinone UQ/UQH<sub>2</sub>, Menachinon MQ/MQH<sub>2</sub>, Pyrrolochinolinchinon PQQ/PQQH<sub>2</sub>) (Raber und Rodriguez, 1985). Die im Metabolismus am häufigsten vorkommenden Reduktionsäquivalente sind  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , wobei  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  hauptsächlich in katabolischen Reaktionen und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  in anabolischen Redoxreaktionen auftritt. Unter aeroben Bedingungen wird NADH über die Atmungskette regeneriert. Unter anaeroben Bedingungen findet die NADH-Regeneration über fermentative Stoffwechselwege unter der Bildung reduzierter Verbindungen wie Acetat oder Ethanol statt. NADPH kommt vor allem als Reduktionsäquivalent in Stoffwechselwegen für Ausgangsmetabolite der Biomassebildung vor. In manchen Mikroorganismen ist des Weiteren die Umwandlung von NADH zu  $\text{NADP}^+$  und vice versa durch die Transhydrogenase möglich (Blank *et al.*, 2010).

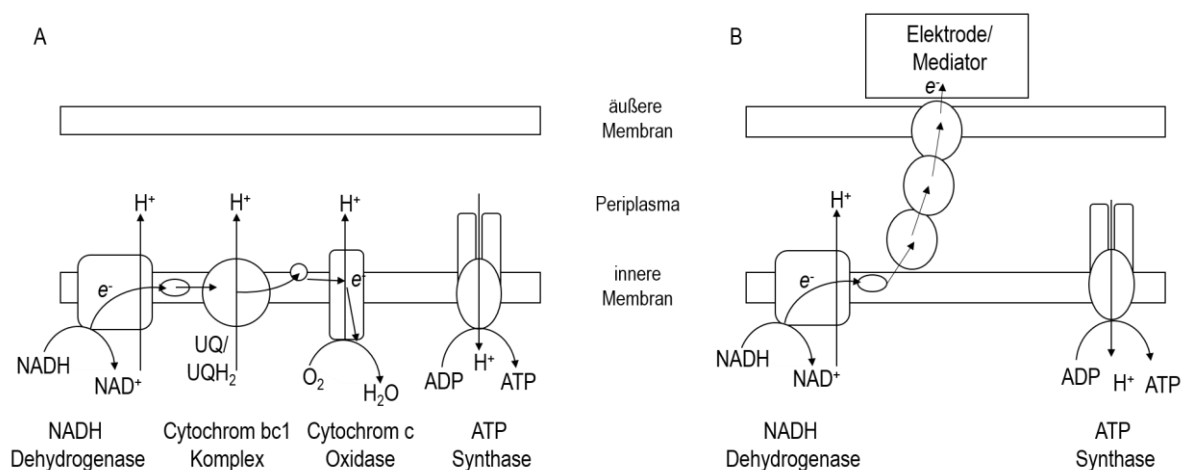


Abbildung 13 Schematische Darstellung des intra- und extrazellulären mikrobiellen Elektronentransfers. (A) Interner Elektronentransfer über die Atmungskette mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. (B) Externer Elektronentransfer über die äußere Membran.

Um reduzierte Reduktionsäquivalente zu regenerieren, ist die Übertragung von Elektronen auf Akzeptoren notwendig. Unter aeroben Bedingungen ist  $O_2$  in der Regel der terminale Elektronenakzeptor, auf den Elektronen über die membrangebundenen Enzyme in der mikrobiellen Atmungskette übertragen werden (Abbildung 13 A). Mangan, Eisen, Sulfat, Fumarat, Nitrat oder Nitrit sind alternative Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen (Anraku, 1988). In Analogie zur Sauerstoffatmung wird die Übertragung von Elektronen auf alternative terminale Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen unter dem Begriff „Anaerobe Atmung“ zusammengefasst.

Tabelle 2 Standard-Redoxpotentiale ( $E'_0$ ) der Halbreaktionen der Atmungskette bei 25 °C und pH 7 versus Ag/AgCl (Nelson *et al.*, 2009).  $\Delta E'_0$ : Potentialbereiche, die durch Änderung von physiologischen oder Umweltbedingungen abgedeckt werden nach Kracke *et al.* (2015).

Redoxreaktion	$E'_0$ , V	$\Delta E'_0$ , V
$NADP^+ + H^+ + 2 e^- \rightarrow NADPH$	-0,521	-0,557 – -0,521
$NAD^+ + H^+ + 2 e^- \rightarrow NADH$	-0,517	-0,517 – -0,477
$FAD^+ + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow FADH_2$	-0,416	Keine Angabe
$Fumarat^{2-} + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow Succinat^{2-}$	-0,166	Keine Angabe
$Ubichinon + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow Ubichinol + H_2$	-0,152	-0,161 – -0,087
$Cytochrom\ b_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ b_{red}$	-0,120	-0,003 – +0,030
$Cytochrom\ c1_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ c1_{red}$	0,023	Keine Angabe
$Cytochrom\ d_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ d_{red}$	0,043	Keine Angabe
$Cytochrom\ c_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ c_{red}$	0,057	-0,627 – +0,023
$Cytochrom\ a_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ a_{red}$	0,093	+0,018 – +0,193
$Cytochrom\ a3_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ a3_{red}$	0,153	Keine Angabe
$Cytochrom\ f_{ox} + e^- \rightarrow Cytochrom\ f_{red}$	0,168	Keine Angabe
$0,5 O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2O$	0,619	Keine Angabe

Wie bereits in den elektrochemischen Grundlagen erläutert wurde, ist der Elektronentransfer auf Sauerstoff, aber auch alternative terminale Elektronenakzeptoren nur von niedrigen zu hohen Potentialen möglich. Die Standard-Redoxpotentiale der in der Atmungskette vorkommenden Reduktionsäquivalente steigen an und ermöglichen die schrittweise Übertragung von Elektronen auf den terminalen Akzeptor. Die Reaktionen der Atmungskette und die korrespondierenden Standard-

Redoxpotentiale sind in Tabelle 2 dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Redoxpotentiale in Abhängigkeit vom intrazellulären pH und von Konzentrationen über einen Potentialbereich von 0,700 V ändern können (Kracke *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Extrazelluläre Elektronentransferreaktionen

Alternativ zur Verwendung von organischen Verbindungen als Elektronendonoren und Sauerstoff als terminale Elektronenakzeptoren haben Mikroorganismen eine Reihe von Möglichkeiten entwickelt, auch anorganische Elektronendonoren (zum Beispiel Ammoniak, Sulfide und H<sub>2</sub>) und Elektronenakzeptoren (zum Beispiel Nitrat, Sulfat und CO<sub>2</sub>) zu verwenden. Normalerweise werden diese Stoffe von Mikroorganismen aufgenommen und die Redoxreaktionen finden in der Zelle statt. Eine Reihe von Mikroorganismen ist jedoch in der Lage, Elektronen über die äußere Membran zu transportieren, sodass die Redoxreaktionen außerhalb der Zelle stattfinden. Dieser Elektronentransportprozess wird externer Elektronentransfer (EET) genannt. Mikroorganismen, die zu externem Elektronentransfer fähig sind, werden auch als exoelektrogene Mikroorganismen bezeichnet (Kato, 2015). Exoelektrogene Mikroorganismen können über direkte oder indirekte Elektronentransfermechanismen Elektronen über die äußere Membran austauschen (Abbildung 14). Austauschpartner ist ein Feststoff, beispielsweise Eisenpartikel oder eine Elektrode.

Damit ein direkter EET stattfinden kann, müssen die Mikroorganismen in direktem Kontakt zur Oberfläche des Feststoffes stehen (Abbildung 14 A, B). Molekulare Mechanismen für EET wurden mit *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* (Eisen-reduzierende Mikroorganismen) und *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Eisen-oxidierender Mikroorganismus) untersucht (Castelle *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Elektronen von der inneren Zellmembran über eine Reihe redoxaktiver Proteine im Periplasma zu c-typ Cytochromen in der äußeren Membran transportiert werden können (Abbildung 13 B). Für *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis* wurde außerdem die Bildung filamentöser leitfähiger Membranausstülpungen beobachtet, die einen externen Elektronentransfer über eine größere Distanz ermöglichen (Abbildung 14 B). Diese werden in der Literatur als leitfähige Pili oder Nanowires bezeichnet (Gorby *et al.*, 2006; Pirbadian *et al.*, 2014; Reguera *et al.*, 2005).

Werden die Elektronen nicht direkt vom Mikroorganismus auf den Elektronenakzeptor, sondern zunächst auf niedermolekulare redoxaktive Verbindungen übertragen, wird von indirektem EET gesprochen. Verbindungen, die dies ermöglichen, werden als Mediatoren bezeichnet. Mediatoren

können Zellmembranen passieren und dienen als Oxidations- oder Reduktionsmittel innerhalb der Zelle (Kato, 2015). Manche Mikroorganismen sind in der Lage, Mediatoren wie Phenazin (*Pseudomonaden*) oder Flavinderivate (*Shewanella*) zu bilden und zu sekretieren (Marsili *et al.*, 2008; Rabaey *et al.*, 2004). EET kann aber auch durch die Bereitstellung künstlicher Mediatoren wie beispielsweise Neutralrot, Anthrachinon-2,6-disulfonat, Thionin, Methylviologen oder Methyleneblau ermöglicht werden (Wang und Ren, 2013).

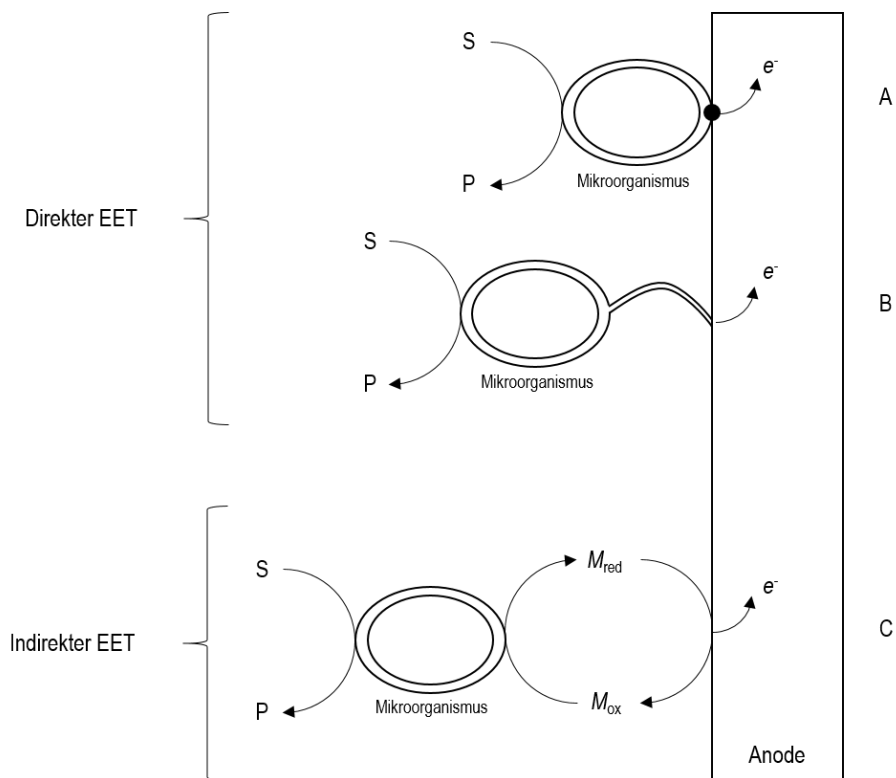


Abbildung 14 Schematische Darstellung der externen Elektronentransfermechanismen (EET). (A) Direkter EET über redoxaktive Proteine in der äußeren Membran. (B) Direkter EET über Membranausstülpungen (Pili, Nanowires). (C) Indirekter EET über redoxaktive Mediatoren. Diese können vom Mikroorganismus gebildet werden oder im Medium vorliegen. S: Substrat; P: Produkt;  $M_{red}$ : Reduzierter Mediator;  $M_{ox}$ : Oxidierter Mediator.

Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mediatoren Riboflavin, Eisen(III)chlorid ( $FeCl_3$ ) und Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3Fe(CN)_6$ ) kurz vorgestellt werden.

### Riboflavin

Bei Riboflavin handelt es sich um eine Vorstufe von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) (Sahm *et al.*, 2013). Riboflavin hat ein Redoxpotential von -0,382 V (versus Ag/AgCl) (Alagarsamy, 2013) und kann mikrobiell mit *Ashbya gossypii* (BASF) und *Bacillus subtilis* (Roche) im industriellen Maßstab hergestellt werden (Stahmann *et al.*, 2000).

### FeCl<sub>3</sub>

Es wird angenommen, dass die Reduktion von Fe(III) die älteste Form von Atmung ist (Vargas *et al.*, 1998). Dabei ist zu beachten, dass das Redoxpotential von Fe(III)/Fe(II) in Abhängigkeit von pH oder Komplexierung über einen weiten Bereich variiert. Für das Ionenpaar Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> als anorganisches Akzeptor/Donor-Paar liegt das Standard-Redoxpotential bei niedrigem pH und guter Löslichkeit bei +0,573 V (versus Ag/AgCl) (Straub *et al.*, 2001).

### Kaliumhexacyanoferrat

Bei Kaliumhexacyanoferrat (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) handelt es sich um einen hydrophilen Mediator mit einem Standard-Redoxpotential von +0,239 V (versus Ag/AgCl) (Pandurangachar *et al.*, 2010). Als hydrophiler Mediator ist K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> nicht in der Lage, über die innere Membran zu diffundieren. Somit kann K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> nur mit redoxaktiven Proteinen der äußeren und inneren Membran reagieren, aber nicht an Redoxreaktionen innerhalb der Zelle teilnehmen (Rawson *et al.*, 2014).

Tabelle 3 Standard-Redoxpotentiale ( $E^{0'}$ ) der verwendeten Mediatoren (versus Ag/AgCl) bei pH 7.

Mediator	$E^{0'}$ , V (pH 7)	Quelle
Riboflavin	- 0,382	Alagarsamy, 2013
	- 0,399	Canstein <i>et al.</i> , 2008
FeCl <sub>3</sub>	+ 0,003	Yan, 2015
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	+ 0,239	Sharpe, 1976; Kwong, 2001; Pandurangachar <i>et al.</i> , 2010

### 3.4 *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* KT2440 (*P. putida*) ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, strikt aerobes Bodenbakterium und gehört zur Familie der *Pseudomonaden*. Aufgrund der polaren Begeißelung ist es motil (Harwood *et al.*, 1989). *P. putida* ist mesophil mit einem breiten Temperaturspektrum, das Wachstum zwischen 4 °C und 40 °C zulässt. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 25 °C und 30 °C. Ebenso ist Wachstum innerhalb eines pH-Bereichs von pH 4 bis pH 8 möglich. Optimales Wachstum wird bei pH 7 erreicht (Dworkin, 2006; Palleroni und Moore, 2004). Ein charakteristisches Merkmal von *P. putida* ist der mannigfaltige chemoorganotrophe Stoffwechsel und damit die Fähigkeit, ein großes Spektrum an organischen Kohlenstoff- und Energiequellen verwerten zu können (Dworkin, 2006).

*P. putida* KT2440 ist ein plasmidfreies Derivat des toluenabbauenden Bakteriums *P. arvilla* mt-2, das 1960 von Keiichi Hosokawa in Minō, Osaka isoliert und von Motoki Yamanaka identifiziert wurde (Nakazawa, 2002). 1974 wurde *P. arvilla* mt-2 reklassifiziert und wird seitdem *P. putida* mt-2 genannt (Regenhardt *et al.*, 2002; Williams, 1974). *P. putida* KT2440 war das erste gram-negative Bodenbakterium, das vom Recombinant DNA Advisory Committee als Sicherheitsstamm ausgewiesen wurde.

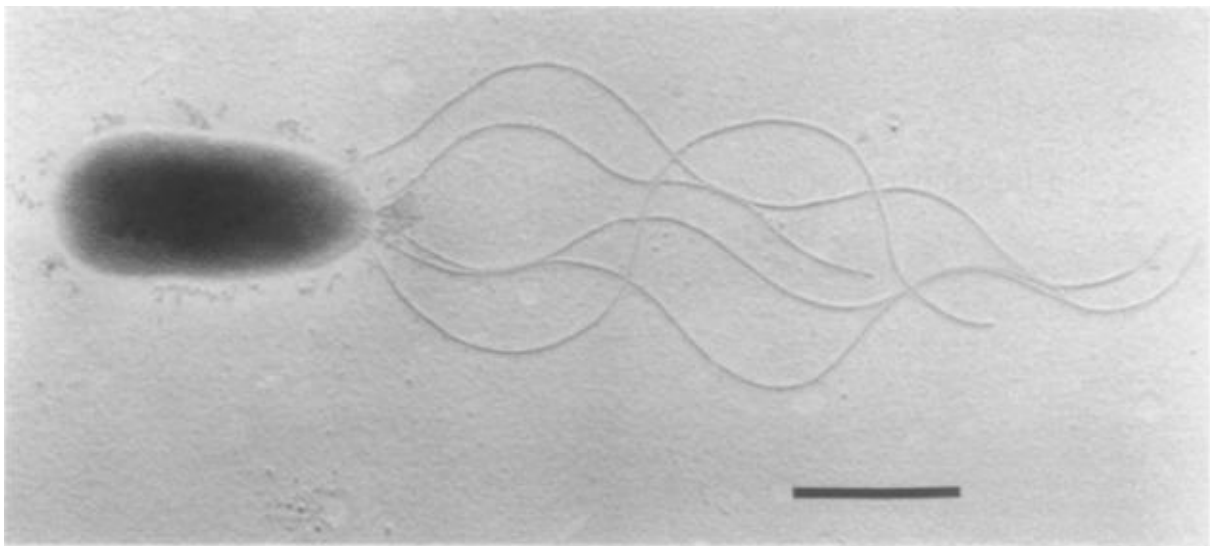


Abbildung 15 Elektronenmikroskopaufnahme von *Pseudomonas putida*. Maßstabsbalken: 1 µm. (Harwood *et al.*, 1989).

### 3.4.1 Zentraler Kohlenstoffmetabolismus

Der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *P. putida* KT2440 ist vereinfacht in Abbildung 16 dargestellt und wird im Folgenden beschrieben.

#### Gluconat- und 2-Ketogluconat-Weg

Die Aufnahme von Glucose (GLU) erfolgt zunächst in den periplasmatischen Raum und kann anschließend über drei gleichzeitig ablaufende Wege zu 6-Phosphogluconat (6PG) umgesetzt werden. Der erste Weg ist die unter ATP-Verbrauch im Cytoplasma durch die Glucokinase (gkn) katalysierte Phosphorylierung von GLU zu Glucose-6-phosphat (G6P) und die weitere Umsetzung zu Fructose-6-phosphat (F6P) oder 6-Phosphogluconat (6PG). Der zweite Weg ist die periplasmatische Umsetzung von Glucose zu Gluconat (GLC). GLC kann dann ebenfalls unter ATP-Verbrauch zu 6PG umgesetzt werden. Der dritte Weg ist eine weitere periplasmatische Umsetzung von Gluconat zu 2-Ketogluconat (2KG). 2KG wird dann phosphoryliert und im Folgenden über 6-Phospho-2-Ketogluconat (6P2KG) zu 6PG umgesetzt (del Castillo *et al.*, 2007).

#### Entner-Doudoroff-Weg

6PG kann im Weiteren über den Entner-Doudoroff-Weg (Entner und Doudoroff, 1952) katabolisiert werden. Dabei wird zunächst über das Enzym 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (edd) 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) gebildet. KDPG wird dann durch die Phospho-2-Keto-3-Deoxygluconat-Aldorase (eda) zu Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat (PYR) gespalten. Der Abbau von Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) ist nicht möglich, da *P. putida* KT2440 nicht über das Enzym 6-Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.11) verfügt. Über das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) ist jedoch die Synthese von Glucose-6-phosphat möglich (Dos Santos *et al.*, 2004).

#### Pentosephosphat-Weg

6PG kann außerdem über den Pentosephosphat-Weg abgebaut werden. Zunächst findet die oxidative Decarboxylierung von 6PG zu Ribulose-5-phosphat (Ru5P) statt, die durch das NADP-abhängige Enzym Phosphogluconat-Dehydrogenase (6pgdh) katalysiert wird. Ru5P kann nun entweder durch die Ribose-phosphat-3-Epimerase (rpe) in Xylulose-5-phosphat (X5P) oder durch die Ribose-5-phosphat-Isomerase (rpi) in Ribose-5-phosphat (R5P) überführt werden. Sowohl X5P als auch R5P werden für die Reaktion zu GAP und Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) benötigt. Die Transketolase (tkt) mit dem Co-Faktor Thiaminpyrophosphat (TPP) katalysiert die Übertragung einer C<sub>2</sub>-Einheit von X5P auf R5P, sodass GAP und S7P entstehen. Die Transaldolase (tal) katalysiert die Übertragung von

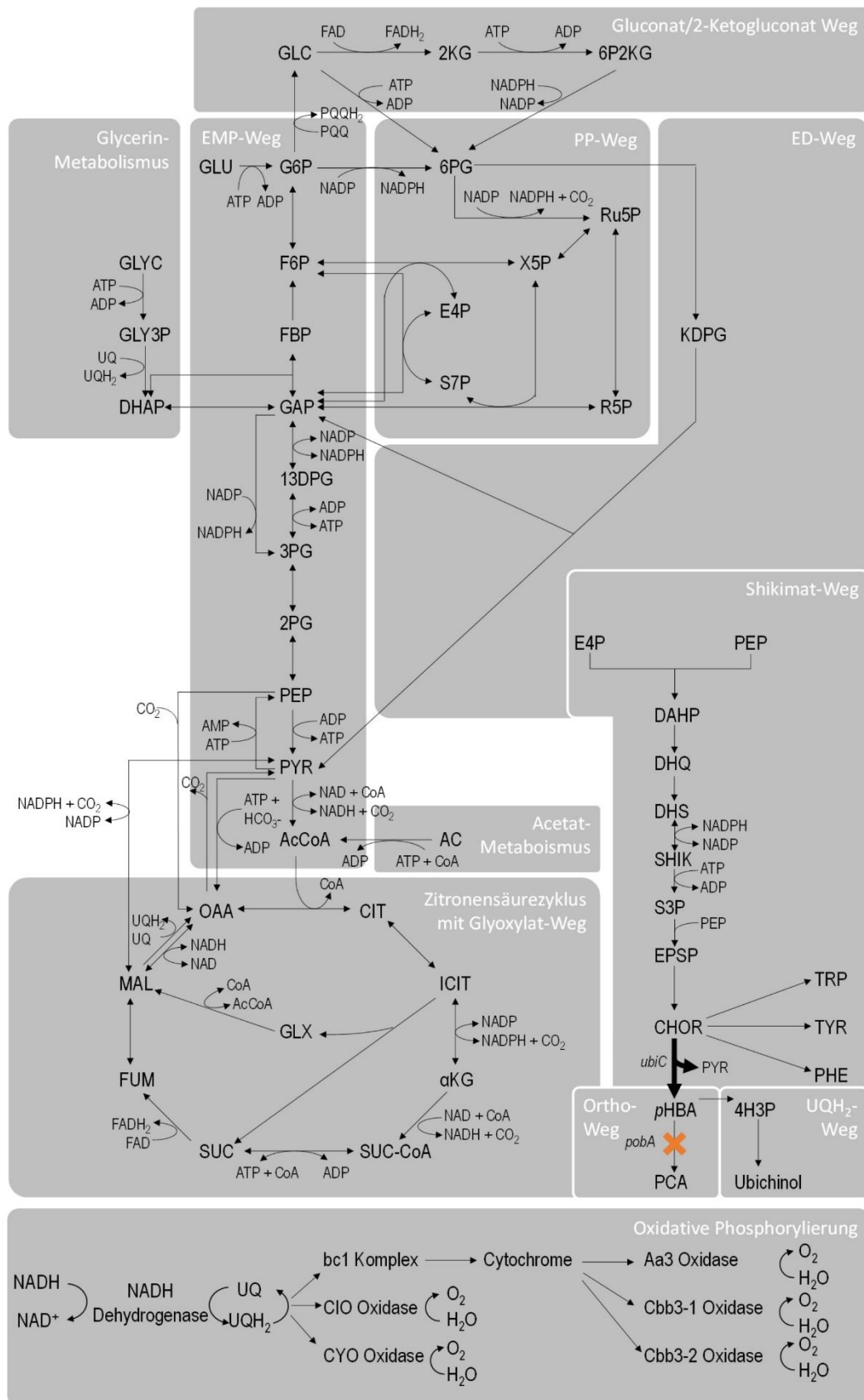




Abbildung 16 Vereinfachte Darstellung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. putida* KT2440. Dargestellt sind Gluconat/2-Ketogluconat-Weg, Glycerin-Metabolismus, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg, Pentosephosphat (PP)-Weg, Entner-Doudoroff (ED)-Weg, Acetat Metabolismus, Zitronensäurezyklus, Shikimat-Weg, Ortho-Weg, Ubichinol (UQH<sub>2</sub>)-Weg und oxidative Phosphorylierung. Breiter Reaktionspfeil: Überexpression; Rotes Kreuz: Deletion. Gene: *ubiC*; *pobA*. Abkürzungen: Acetyl-CoA (AcCoA), Acetat (AC),  $\alpha$ -Ketoglutarat (AKG), Chorismat (CHOR), Citrat (CIT), 1,3-Diphosphoglycerat (13DPG), 3-Dehydroquinat (DHQ), 3-Dehydroshikimat (DHS), 3-Deoxy-D-Arabin-Heptulosonat-7-phosphat (DAHP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP), Erythrose-4-phosphat (E4P), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Fructose-6-phosphat (F6P), Fumarat (FUM), Gluconat (GLC), Glucose (GLU), Glucose-6-phosphat (G6P), Glyceraldehyde-3-phosphat (GAP), Glycerin (GLYC), Glycerin-3-phosphat (GLY3P), Glyoxylat (GLX), Isocitrat (ICIT), 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG), 2-Ketogluconat (2KG), Malat (MAL), Oxalacetat (OAA), *para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA), 4-Hydroxybenzoat-3-Polyprenylphosphat (4H3P), Phenylalanin (PHE), 6-Phospho-2-Ketogluconat (6P2KG), Protocatechuat (PCA), Phosphoenolpyruvat (PEP), 6-Phosphogluconat (6PG), 2-Phosphoglycerat (2PG), 3-Phosphoglycerat (3PG), Pyruvat (PYR), Ribose-5-phosphat (R5P), Ribulose-5-phosphat (Ru5P), Sedoheptulose-7-phosphat (S7P), Shikimat (SHIK), Shikimat-3-phosphat (S3P), Succinat (SUC), Succinyl-CoA (SUC-CoA), Tryptophan (TRP), Tyrosin (TYR), Xylulose-5-phosphat (X5P).

C<sub>3</sub>-Einheiten von S7P auf GAP. Dabei werden Erythrose-4-phosphat (E4P) und F6P gebildet. Durch eine zweite Transketolase wird eine weitere C<sub>2</sub>-Einheit von einem zweiten Molekül X5P auf E4P übertragen. Dabei entstehen GAP und ein weiteres Molekül F6P.

### Zitronensäurezyklus

Das über den ED-Weg gebildete PYR wird unter der Bildung von NADH zu Acetyl-Coenzym A (AcCoA) decarboxyliert (Pyruvat-Dehydrogenase, *pdh*). In der Eingangsreaktion wird AcCoA mit Oxalacetat (OAA) durch die Citrat-Synthase (*cs*) zu Citrat (CIT) kondensiert, wobei freies CoA entsteht. Das Enzym Aconitase (*acn*) katalysiert die reversible Isomerisierung von CIT zu Isocitrat (ICIT) über das Intermediat Aconitat. ICIT wird dann unter der Bildung von NADPH durch die Isocitrat-Dehydrogenase (*icdh*) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG) decarboxyliert. Im nächsten Schritt wird  $\alpha$ KG durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase zu Succinyl-CoA (SUC-CoA) umgesetzt, wobei CO<sub>2</sub> und NADH gebildet werden. Die nachfolgende Spaltung von SUC-CoA zu Succinat (SUC) durch die Succinyl-CoA-Synthase (*scs*) koppelt die Freisetzung von CoA mit der Bildung eines Moleküls ATP. Die Succinat-Dehydrogenase (*sdh*) katalysiert daraufhin die stereospezifische Dehydrierung von SUC zu Fumarat (FUM). Diese Reaktion führt zur Bildung von FADH<sub>2</sub>, das über die Atmungskette regeneriert wird. FUM wird im Folgenden durch die von der Fumarat-Hydratase (*fum*) katalysierte Hydratation der Doppelbindung zu Malat (MAL). Die letzte Reaktion des Zitronensäurezyklus ist die

NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von MAL zu OAA, die durch die Malat-Dehydrogenase (mdh) katalysiert wird und zur Bildung von NADH führt. *P. putida* besitzt außerdem das Ubichinon-abhängige Enzym Malatichinon-Oxidoreduktase (mqo), das ebenfalls die Umsetzung von MAL zu OAA katalysiert.

### **Anaplerotische Reaktionen**

Durch anaplerotische Reaktionen können Intermediatverluste ausgeglichen werden, die durch die Abzweigung von Metaboliten für Biosynthesen entstehen. Darunter fällt der Glyoxylat-Weg, der eine verkürzte Form des Zitronensäurezyklus darstellt. Glyoxylat (GLX) und SUC werden ausgehend von ICIT durch die Isocitrat-Lyase (icl) gebildet. GLX wird dann unter Umsetzung von AcCoA durch die Malat-Synthase (mals) zu MAL umgesetzt. Des Weiteren sind hier die Reaktionen der durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (ppc) katalysierten Umsetzung von PEP zu OAA, die Umsetzung von PYR zu MAL durch das NADPH-abhängige Malatenzym (mae), die durch die Pyruvat-Carboxylase (acc) katalysierte Reaktion von PYR zu OAA sowie die Reaktion von OAA zu PYR durch die Oxalacetat-Decarboxylase (oad) zu nennen.

### **Oxidative Phosphorylierung**

Die Übertragung der Elektronen von reduzierten Reduktionsäquivalenten auf den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff findet über membranständige Redoxproteine statt. *P. putida* KT2440 besitzt eine verzweigte Atmungskette mit zwei NADH-Dehydrogenasen (NADH5 und NADH6) (Puchalka *et al.*, 2008) und fünf unterschiedlichen terminalen Cytochrom-Oxidasen, die sich in ihren Redoxpotentialen unterscheiden (Cyanid-insensitive-Oxidase (CIO, bd-Typ Oxidase), Cytochrom-o-Ubichinon-Oxidase (Cyo, bo3-Typ Oxidase), Cytochrom-aa3-Oxidase, Cytochrom-cbb3-1-Oxidase und Cytochrom-cbb3-2-Oxidase (Follonier *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2006; Nickel *et al.*, 2014; Ugidos *et al.*, 2008; Winsor *et al.*, 2011)). Die Redoxpotentiale der Cytochrome sind in Kapitel 3.3.1 zu finden.

Über die NADH-Dehydrogenasen NADH5 und NADH6 wird NADH reduziert und die Elektronen auf Ubichinon (UQ) übertragen. Eine Translokation von Protonen ins Periplasma findet jedoch nur mit NADH6 statt.

Die Oxidation von Ubichinol (UQH<sub>2</sub>) findet am Cytochrom-bc1-Komplex statt, wo die Elektronen auf Cytochrome übertragen werden. Zwei der fünf Cytochrom-c-Oxidasen sind in der Lage, UQH<sub>2</sub> zur Reduktion von O<sub>2</sub> zu nutzen. Die verbleibenden drei Cytochrom-c-Oxidasen nutzen nur Cytochrom c als Elektronendonator und übertragen die Elektronen an Sauerstoff.

### 3.4.2 *para*-Hydroxybenzoesäure Produktionsstoffwechselweg

Die Produktion von *para*-Hydroxybenzoesäure *pHBA* ist über den Shikimat-Weg möglich. Die Ausgangsstoffe E4P und PEP werden über den EMD- und Pentosephosphat-Weg gebildet und in der Eingangsreaktion zu 3-Deoxy-D-Arabion-Heptulosonat-7-phosphat (DAHP) umgesetzt. Nachfolgend kommt es durch die 3-Dehydroquinat Synthase zur Ringbildung und 3-Dehydroquinat (DHQ) entsteht. DHQ wird mittels DHQ-Dehydratase zu 3-Dehydroshikimat (DHS) umgesetzt. Die Umsetzung von DHS und NADPH durch die DHS-Dehydrogenase führt zur Bildung von Shikimat (SHIK). Durch die folgende Phosphorylierung, die durch die SHIK-Kinase katalysiert wird, entsteht Shikimat-3-phosphat (S3P). Aus S3P und PEP kann anschließend 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) gebildet werden. Diese Reaktion wird durch die EPSP-Synthase katalysiert. Chorismat (CHOR) entsteht durch die Umsetzung von EPSP mit der Chorismat-Synthase. Aus Chorismat kann dann in einem letzten Schritt durch die Chorismat-Pyruvat-Lyase unter Bildung von PYR *para*-Hydroxybenzoesäure (*pHBA*) gebildet werden. Das Gen *ubiC*, das für die Chorismat-Pyruvat-Lyase kodiert, kann in dem in dieser Arbeit verwendeten *pHBA*-bildenden Stamm überexprimiert werden. Chorismat ist außerdem der Ausgangsstoff für die Synthese der Aminosäuren Tryptophan (TRP), Tyrosin (TYR) und Phenylalanin (PHE). Außerdem findet ausgehend von Chorismat die Bildung von Menachinon und Phyllochinon statt. Die Synthese von Ubichinol erfolgt über den Ubichinol (UQH<sub>2</sub>)-Weg und benötigt *pHBA* das im ersten Schritt mittels des Enzyms 4-Hydroxybenzoat-Polyprenyl-Transferase zu 4-Hydroxy-3-Polyprenylbenzoat (3PHB) umgesetzt wird. Über den Ortho-Weg erfolgt der Abbau von *pHBA* über 4-Hydroxybenzoat-3-Monooxygenase zu Protocatechuat. Das Gen *pobA*, das für die 4-Hydroxybenzoat-3-Monooxygenase kodiert, ist in dem in dieser Arbeit verwendeten *pHBA*-bildenden Stamm deletiert.

### 3.5 *para*-Hydroxybenzoesäure

*para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA) ist eine aromatische Verbindung, die Hydroxy- und Carboxylgruppen in *para*-Stellung aufweist. Der Schmelzpunkt liegt bei 213 °C, ab 220 °C zersetzt sie sich in CO<sub>2</sub> und Phenol. *p*HBA hat in Wasser eine Löslichkeit von 4,9 g L<sup>-1</sup> (20 °C). Die pKs-Werte dieser schwachen Säure liegen bei pK<sub>1</sub> = 4,51 und pK<sub>2</sub> = 9,33 (Acker *et al.*, 1967; Ritzer und Sundermann, 2000).

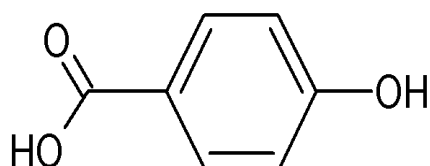


Abbildung 17 Strukturformel der *para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA).

#### 3.5.1 Verwendung

*p*HBA ist ein Intermediat für die Herstellung von Farbstoffen, Pharmazeutika, Pestiziden (Cavill und Vincent, 1947) und Kunststoff. Es wird weiterhin als Emulgator und Korrosionsschutzmittel verwendet (Hirozawa *et al.*, 1980). Ester der *p*HBA sowie ihr Natriumsalz wirken antimikrobiell (Cramer *et al.*, 1976) und werden vor allem als Propyl- und Butylester zur Konservierung von Kosmetika und Pharmazeutika eingesetzt. *p*HBA wird außerdem zur Produktion von *p*-Hydroxybenzonnitril verwendet, das zur Herstellung der Herbizide Bomoxynil und Ioxynil eingesetzt werden kann (Franck und Stadelhofer, 2012). *p*HBA kann auch für die Herstellung von Flüssigkristallpolymeren (engl. *liquid crystal polymers*, LCP) verwendet werden. Das Marktvolumen von LCPs liegt bei ~50 000 Tonnen pro Jahr bei einem Preis von ~3 000 USD pro Tonne (Krömer *et al.*, 2013).

#### 3.5.2 Industrielle Produktion von *p*HBA

Die chemische Herstellung von *p*HBA basiert auf der von Herman Kolbe und Rudolf Schmitt entwickelten Synthese von Salicylsäure (Kolbe, 1860; Schmitt, 1886), welche heute Kolbe-Schmitt-Reaktion genannt wird. Zur Herstellung von *p*HBA wird – im Gegensatz zur Herstellung von Salicylsäure – Kaliumphenolat statt des entsprechenden Natriumsalzes (Natriumphenolat) verwendet. Die Reaktion von Kaliumphenolat und CO<sub>2</sub> findet bei 220 °C und 5 bar Überdruck statt. Dieser Prozess erlaubt die Umsetzung von 60 % des eingesetzten Kaliumphenolates zu *p*HBA (Ritzer und Sundermann, 2000).

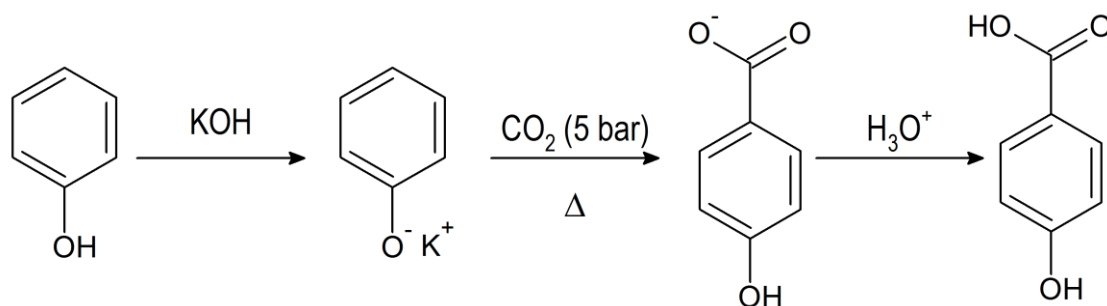


Abbildung 18 Kolbe-Schmitt-Reaktion zur Herstellung von *para*-Hydroxybenzoesäure.

### 3.5.3 Mikrobielle Produktion von *p*HBA

Die mikrobielle Produktion von *p*HBA wurde ausgehend von Glucose in rekombinanten *Escherichia coli* (Barker und Frost, 2001), *Klebsiella pneumoniae* (Müller *et al.*, 1995), *P. putida* (Meijnen *et al.*, 2011; Verhoef *et al.*, 2010) und *Saccharomyces cerevisiae* (Krömer *et al.*, 2013) realisiert. Die erreichten *p*HBA-Konzentrationen und Erträge sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Des Weiteren wurde die Produktion von *p*HBA auch in Zuckerrohr (McQualter *et al.*, 2005), Tabak (Siebert *et al.*, 1996) und Kartoffeln (Köhler *et al.*, 2013) untersucht.

Eine Herausforderung der mikrobiellen *p*HBA-Produktion ist die mikrobielle Toxizität der *p*HBA. Die höchsten *p*HBA-Konzentrationen (22,9 g L<sup>-1</sup>) konnten bisher mit *E. coli* in Komplexmedium und einer *in situ*-Extraktion des toxischen *p*HBA mittels Anionenaustauscher erreicht werden (Johnson *et al.*, 2000). In ihrem antimikrobiellen Wirkmechanismus entsprechen *p*HBA und die Ester der *p*HBA dem des Phenols (Lück, 1986). Die Toxizität zyklischer Kohlenwasserstoffe beruht auf der Akkumulation hydrophober Moleküle in der cytoplasmatischen Membran, deren Fluidität sich daraufhin erhöht. Dies führt zu einem erhöhten Einstrom von Protonen in das Cytoplasma und somit zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten über die Membran (Palmqvist *et al.*, 1999; Sikkema *et al.*, 1995). Als nicht-dissoziierende Verbindungen sind die Ester der *p*HBA in ihrer antimikrobiellen Wirkung nicht vom pH des zu konservierenden Mediums abhängig und werden daher bevorzugt als Konservierungsmittel eingesetzt (Lück, 1986).

Tabelle 4 Mikrobielle *p*HBA-Produktion in der wissenschaftlichen Literatur. Die Tabelle fasst die zur *p*HBA-Produktion verwendeten Mikroorganismen, verwendete Substrate, maximale *p*HBA-Konzentrationen ( $c_{p\text{HBA,max}}$ ), Erträge ( $Y_{p\text{HBA,S}}$ ) und *p*HBA-Bildungsraten ( $q_{p\text{HBA}}$ ) zusammen. Zusätzlich ist die Art der Prozessführung angegeben.

Mikroorganismus	Substrat	$c_{p\text{HBA,max}}$ $\text{mg L}^{-1}$	$Y_{p\text{HBA,S}}$ , $\text{mmolC}_{p\text{HBA}}$ $\text{molC}_S^{-1}$	$q_{p\text{HBA}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	Prozess	Quelle
<i>P. putida</i> S12 pal_xylB7	Glucose	-	49	0,008	Chemostat	(Meijnen <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. putida</i> S12 pal B1	Glucose	71	60	0,096	Chemostat	(Verhoef <i>et al.</i> , 2010)
	Glycerin	73	61	-		
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	90	9,13	0,007	Satzprozess, Rührkessel	(Krömer <i>et al.</i> , 2013)
<i>K. pneumonia</i>	Glucose	120	8,7	-	Satzprozess, Schüttel- kolben	(Müller <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i>	Glucose	12000	150	-	Zulauf- prozess	(Barker und Frost, 2001)

## 3.6 Bioprozesstechnische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des mikrobiellen Wachstums, der Substrataufnahme und der Produktbildung im idealen Rührkesselreaktor beschrieben.

### 3.6.1 Mikrobielles Wachstum

Für aerobes Wachstum heterotropher Mikroorganismen werden Sauerstoff, organische Kohlenstoffquellen, Stickstoffverbindungen, Mineralsalze und Spurenelemente benötigt. Alle Komponenten können dem Mikroorganismus über ein wässriges Medium zur Verfügung gestellt werden.

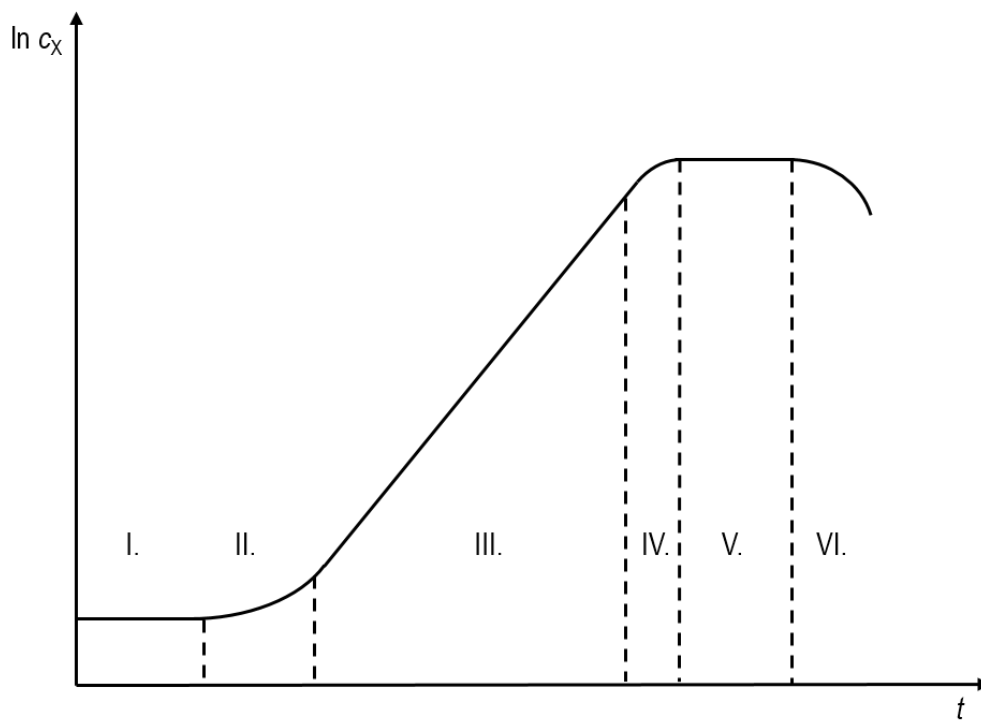


Abbildung 19 Wachstumsphasen im substratlimitierten Satzprozess. I: Adaptionphase; II: Erste Übergangsphase; III: Exponentielle Wachstumsphase; IV: Zweite Verzögerungsphase; V: Stationäre Phase und VI: Absterbephase.

Das mikrobielle Wachstum lässt sich unter substratlimitierten Bedingungen im Satzverfahren durch sechs charakteristische Wachstumsphasen beschreiben (Abbildung 19) (Monod, 1949). Der Adaption- oder Lag-Phase (I), in welcher kein oder sogar negatives Wachstum zu verzeichnen ist, folgt eine erste Übergangsphase (II), in der die Wachstumsrate zunimmt. In der sich anschließenden

exponentiellen Wachstumsphase (III) nimmt die Zellzahl exponentiell zu und die Zellen erreichen die maximale Wachstumsrate  $\mu_{max}$ . In einem geschlossenen System können sich die Zellen jedoch nicht beliebig vermehren und es folgt nach einer zweiten Übergangsphase (IV), die durch die Limitierung mindestens einer essentiellen Medienkomponente gekennzeichnet ist, die stationäre Phase (V). In dieser Phase hat die Zellkultur ihre maximale Biomassekonzentration erreicht, Wachstums- und Absterberate stehen im Gleichgewicht. An die stationäre Phase schließt sich die Absterbephase (VI) an, in der die Biomassekonzentration wieder abnimmt und die Absterberate die Wachstumsrate übersteigt.

Für die Prozesscharakterisierung sind vor allem die exponentielle Phase, die zweite Übergangsphase und die stationäre Phase von Interesse. Die Adaptionsphase kann oft durch geeignete Wahl des Inokulums, des Substrats und der Prozessbedingungen vermieden werden, während die Absterbephase vor allem für industrielle Produktionsprozesse irrelevant ist, da der Prozess in der Regel zuvor beendet wird. Zur reaktionstechnischen Charakterisierung des mikrobiellen Wachstums ist es folglich nur notwendig, die exponentielle Wachstumsphase, die zweite Übergangsphase und die stationäre Phase mathematisch beschreiben zu können.

Wird von einem unstrukturierten und unsegregierten Zustand der Zellen ausgegangen, kann das mikrobielle Wachstum als autokatalytische Reaktion über die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 13$$

$r_X$	Wachstumsrate, $\text{g (L h)}^{-1}$
$c_X$	Biomassekonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$t$	Zeit, h
$\mu$	spezifische Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$

Auf Basis dieses Zusammenhangs ist die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  wie folgt definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad 14$$



Die mathematische Beschreibung des mikrobiellen Wachstums unter unlimitierten, idealen Bedingungen kann aus Gleichung 13 durch Integration bestimmt werden:

$$c_X = c_{X0} \cdot e^{\mu(t-t_0)} \quad 15$$

Durch Einführung einer mathematischen Formulierung der Wachstumskinetik kann zusätzlich zum exponentiellen Wachstum auch die zweite Übergangsphase sowie die stationäre Wachstumsphase formalkinetisch beschrieben werden. Dazu wird üblicherweise die von Monod beschriebene Sättigungskinetik verwendet (Monod, 1949). Diese gilt solange nur ein Substrat wachstumslimitierend ist und die Prozessvariablen wie Temperatur, Druck und pH als konstant betrachtet werden. Mittels der Monod-Kinetik kann der formale Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  und der Konzentration des limitierenden Substrates  $c_S$  (Gleichung 16) hergestellt werden:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad 16$$

$\mu_{\max}$	maximale spezifische Wachstumsrate, h <sup>-1</sup>
$c_S$	Substratkonzentration, g L <sup>-1</sup>
$K_S$	Halbsättigungskonstante des Substrats, g L <sup>-1</sup>

Die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  wird angenähert, wenn  $c_S$  sehr viel größer ist als  $K_S$  und gleichzeitig kein anderer essentieller Nährstoff limitiert.  $K_S$  entspricht derjenigen Konzentration des limitierenden Substrates, bei welcher die spezifische Wachstumsrate die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Da die Zahlenwerte für  $K_S$  üblicherweise sehr klein sind und die Biomassekonzentration zum Zeitpunkt des vollständigen Substratverbrauchs in der Regel recht hoch ist, wird der Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase in Satzprozessen in sehr kurzer Zeit durchschritten.  $K_S$  ist deshalb in Satzprozessen nicht genau bestimmbar (Chmiel, 2011).

Ohne Bestimmung der Parameter der Monod-Kinetik ist eine vergleichende reaktionstechnische Charakterisierung von Satzprozessen möglich, wenn die Verläufe der interessierenden Zustandsgrößen und Raten durch sigmoidale Funktionen empirisch beschrieben werden.

Analog zur spezifischen Wachstumsrate können spezifische Bildungs- oder Aufnahme­raten  $q$  einer Komponente  $i$ , die im Reaktor mit der Konzentration  $c_i$  vorliegt, wie folgt beschrieben werden:

$$q_i \equiv \frac{1}{c_i} \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad 17$$

Die Konzentrationen  $c_i$  und  $c_j$  der Komponenten  $i$  und  $j$  können durch den Ertragskoeffizienten  $Y_{i/j}$  (englisch: *yield*) über ihre Raten verknüpft werden:

$$Y_{i/j} = \left| \frac{q_i}{q_j} \right| \quad 18$$

$Y_{i/j}$	Ertragskoeffizient der Komponente $i$ bezüglich Komponente $j$ , $g_i \cdot g_j^{-1}$
$q_i$	Umsatzrate der Komponente $i$ , $g \text{ (L h)}^{-1}$
$q_j$	Umsatzrate der Komponente $j$ , $g \text{ (L h)}^{-1}$

## 4 Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Die Geräte- und Chemikalienlisten können dem Anhang entnommen werden.

### 4.1 Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Stämme *Pseudomonas putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* verwendet. Der Wildtyp-Stamm *P. putida* KT2440 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Deutschland) bezogen. Die Mutante *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* wurde von Frau Shiqin Yu, M.Sc. und Herrn Dr. Jens Krömer (University of Queensland, Australien) zur Verfügung gestellt. Die Deletion des für die 4-Hydroxybenzoat-3-Hydroxymonooxygenase (EC: 1.14.13.2) codierenden Gens *pobA* verhindert die Umsetzung von *para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA) zu 3,4-Dihydroxybenzoesäure im Shikimat-Stoffwechselweg und somit den Abbau des Produktes *p*HBA über den Ortho-Weg (engl. *ortho-cleavage pathway*). Der Stamm enthält des Weiteren den Vektor pSEVA2345, der einen Kanamycin-Resistenzmarker trägt und die Überexprimierung des Gens *ubiC* ermöglicht, das die Chorismat-Pyruvat-Lyase kodiert. Die Chorismat-Pyruvat-Lyase katalysiert die Umsetzung von Chorismat zu *p*HBA. Die Expression von *ubiC* kann mit IPTG induziert werden.

### 4.2 Medien

#### Komplexmedium

Als Komplexmedium wurde das Lysogeny Broth-Medium (LB-Medium) nach Miller (1972) verwendet. Dieses wurde aus 10 g L<sup>-1</sup> Pepton, 5 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt und 10 g L<sup>-1</sup> NaCl hergestellt und enthielt in den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* zusätzlich 50 mg L<sup>-1</sup> sterilfiltriertes Kanamycin. Der pH des Mediums wurde mit NaOH und Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt. Die Sterilisation des Mediums erfolgte bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min im Autoklaven.

### Definiertes Medium

Das definierte Medium M9 wurde für die Vorkulturherstellung in Schüttelkolben und in allen Satzprozessen in Rührkesselreaktoren verwendet. Die Zusammensetzung des M9-Mediums ist in Tabelle 5 und Tabelle 6 beschrieben. Die Medienbestandteile  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Spurenelement-Stammlösung und Kohlenstoffquelle wurden in VE- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und der pH mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Die Sterilisation des Mediums erfolgte im Autoklaven (121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min).

Tabelle 5 Zusammensetzung des definierten Mediums M9 für Satzprozesse in Schüttelkolben und Rührkesselreaktoren. WT: Zusammensetzung des Mediums für *P. putida* KT2440; MUT: Zusammensetzung des Mediums für *P. putida* KT2440  $\Delta\text{pobA/pSEVA-ubiC}$ ; AEROB: Aerobe Satzprozesse; AA: Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung.

Substanz	Konzentration	WT	MUT	AEROB	AA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6 g L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
Spurenelement-Stammlösung	1 ml L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
Kohlenstoffquelle	variabel	x	x	x	x
Sterilisation des Mediums bei 121 °C für 20 min		x	x	x	x
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,015 g L <sup>-1</sup>	x	x	x	x
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	1 mM		x		
Kanamycin	50 mg L <sup>-1</sup>		x		
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	variabel				x

Die Medienkomponenten  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Kanamycin, Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) und Mediator wurden entsprechend Tabelle 5 bei Bedarf nach der Sterilisation zugegeben. Die für die Anodenatmung notwendige Anaerobisierung des Mediums wurde durch Abkühlung des 80 °C heißen Mediums unter Stickstoffbegasung über einen Zeitraum von mindestens 12 h erreicht.

Tabelle 6 Zusammensetzung der Spurenelement-Stammlösung für das definierte Medium M9. Der pH der Spurenelement-Stammlösung wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Substanz	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,15
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,03
KI	0,18
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,12
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,06
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,12
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,15
EDTA	10
NiCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,023

### Elektrolytlösung

Die Bestandteile der für Kathodenkammer und Salzbrücke verwendeten Elektrolytlösung sind in Tabelle 7 angegeben. Die Elektrolytlösung entspricht in ihrer Zusammensetzung dem definierten Medium ohne Kohlenstoffquelle, Mediator, Kanamycin und IPTG. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven (121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min).

Tabelle 7 Zusammensetzung der für Kathodenkammer und Salzbrücke verwendeten Elektrolytlösung.

Substanz	Konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	1 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1 g L <sup>-1</sup>
Spurenelement-Stammlösung	1 ml L <sup>-1</sup>

### **Phosphatgepufferte Salzlösung**

Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) wurde aus 8,0 g L<sup>-1</sup> Natriumchlorid, 0,2 g L<sup>-1</sup> Kaliumchlorid, 1,24 g L<sup>-1</sup> Dinatriumhydrogenphosphat und 0,27 g L<sup>-1</sup> Kaliumdihydrogenphosphat hergestellt (Sambrook, 2001). Falls benötigt, wurde die Lösung bei 121 °C für 20 min bei 1 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert. Die phosphatgepufferte Salzlösung wurde zur Herstellung des Inokulums und zur Herstellung von Verdünnungen der Zellsuspension zur Bestimmung der optischen Dichte verwendet.

### **4.3 Stammhaltung**

Die Stämme wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde in einen 1 L-Schüttelkolben mit 200 mL LB-Medium überführt und bei 30 °C im Schüttelinkubator (Multitron, Infors HT, Schweiz) bei 150 rpm kultiviert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> = 1 in sterile Kryo-Gefäße (Nalgene Cryoware, Thermo Fisher Scientific, USA) aliquotiert, in denen steriles Glycerin vorgelegt war. Die Glycerin-Endkonzentration betrug 30 % (v/v). Die Stammhaltung erfolgte bei -80 °C in Gefrierkulturen. LB-Agar-Platten als auch LB-Medium wurden für die Stammhaltung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* mit 50 µg L<sup>-1</sup> Kanamycin supplementiert.

### **4.4 Vorkulturherstellung**

Für jeden Satzprozess wurde eine neue Gefrierkultur verwendet. 1 mL der aufgetauten Gefrierkultur wurde in Vorkulturröhrchen mit 5 mL LB-Medium inkubiert, bis die exponentielle Phase (OD<sub>600</sub> = 1) erreicht wurde. Drei 1 L-Schüttelkolben mit 200 mL definiertem Medium wurden mit 200 µL der LB-Kultur angeimpft. Als Kohlenstoffquelle wurde das in der Hauptkultur verwendete Substrat eingesetzt. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 2) geerntet und in 50 mL-Reaktionsgefäßen für 15 min bei 4500 rpm zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich, Deutschland). Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 3 mL PBS aufgenommen und als Inokulum verwendet.

## 4.5 Aerobe Satzprozesse in Laborrührkesselreaktoren

Aerobe Satzprozesse wurden in 1,8 L- und 7,5 L-Rührkesselreaktoren (Labfors 2, Infors, Schweiz) mit Arbeitsvolumina von 1 L und 3 L durchgeführt. Beide Reaktoren waren mit Temperaturfühlern, pH-Sonden (Mettler Toledo, Deutschland), Gelöstsauerstoff-Sonden, Strömungsbrechern und Sechsbblatt-Scheibenrührern (Rushton-Turbinen) ausgestattet. Im 1,8 L-Reaktor wurden zwei Rushton-Turbinen im Abstand von 5 cm montiert, im 7,5 L Reaktor wurden drei Rushton-Turbinen mit demselben Abstand verwendet.

Für Satzprozesse im 1,8 L-Reaktor wurde eine optische Gelöstsauerstoff-Sonde (Mettler-Toledo, Deutschland) verwendet. Für die Satzprozesse im 7,5 L-Reaktor wurde eine Clark-Elektrode (Mettler-Toledo, Deutschland) zur Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration eingesetzt. Über eine Steuereinheit konnten die Parameter Temperatur, pH, Gelöstsauerstoffkonzentration, Rührerdrehzahl und Begasungsrate überwacht und bei Bedarf geregelt werden. Die Aufzeichnung der Parameter erfolgte mittels der Software IRIS (Infors, Schweiz). Die Temperaturregelung des Mediums erfolgte über den Doppelmantel der Reaktoren auf 30 °C, die Regelung des pH durch den PID-Regler der Steuereinheit. Die PID-Parameter waren P: 1, I: 0,05, D: 0,03. Durch die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28 % (v/v)) und/oder  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (12,5 % (v/v)) wurde der pH auf pH 7,0 geregelt. Zur Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf mindestens 30 % wurde eine stufenweise Erhöhung der Rührerdrehzahl verwendet, die über eine in die IRIS-Software integrierte Sequenz gesteuert wurde. Die Begasung des Reaktors mit Druckluft erfolgte über den Massendurchflussregler der Steuereinheit.

Die Rührergeschwindigkeit betrug zu Prozessbeginn bei beiden Reaktoren 400 rpm, was volumenspezifischen Leistungseinträgen von  $0,61 \text{ W L}^{-1}$  (1,8 L-Reaktor) und  $0,34 \text{ W L}^{-1}$  (7,5 L-Reaktor) entspricht. Die Reaktoren wurden mit konstanten Volumenströmen von  $1 \text{ L min}^{-1}$  (1 vvm, 1,8 L-Reaktor) und  $5 \text{ L min}^{-1}$  (1,67 vvm, 7,5 L-Reaktor) steriler Druckluft begast. Die Konzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  im Abgas wurden über Infrarot und elektrochemische Detektoren (ABB, Deutschland) bestimmt. Antischaum wurde nach Bedarf manuell zugegeben.

## 4.6 Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung im 0,1 L-Parallelsystem

Das Parallelsystem wurde an der University of Queensland entwickelt und verfügt über vier Glasreaktoren (Bio-Logic, Frankreich) mit maximalen Arbeitsvolumen von je 0,1 L. Die Reaktordeckel wurden von Frau Frauke Kracke und Herrn Dr. Jens Krömer entwickelt (University of Queensland, Australien) und bestehen aus Polyetheretherketon (PEEK). Mittels sieben Deckeldurchführungen konnten Referenzelektrode mit passender Salzbrücke (Ag/AgCl, IJ Cambria

Scientific, Großbritannien; Salzbrücke: Bio-Logic, Frankreich), Gegenelektrodenkammer (Eigenanfertigung F. Kracke und J. Krömer, University of Queensland), Arbeitselektrode, Probenahme- und Begasungsvorrichtung, Abgaskühler und Septum verbaut werden (Abbildung 20).

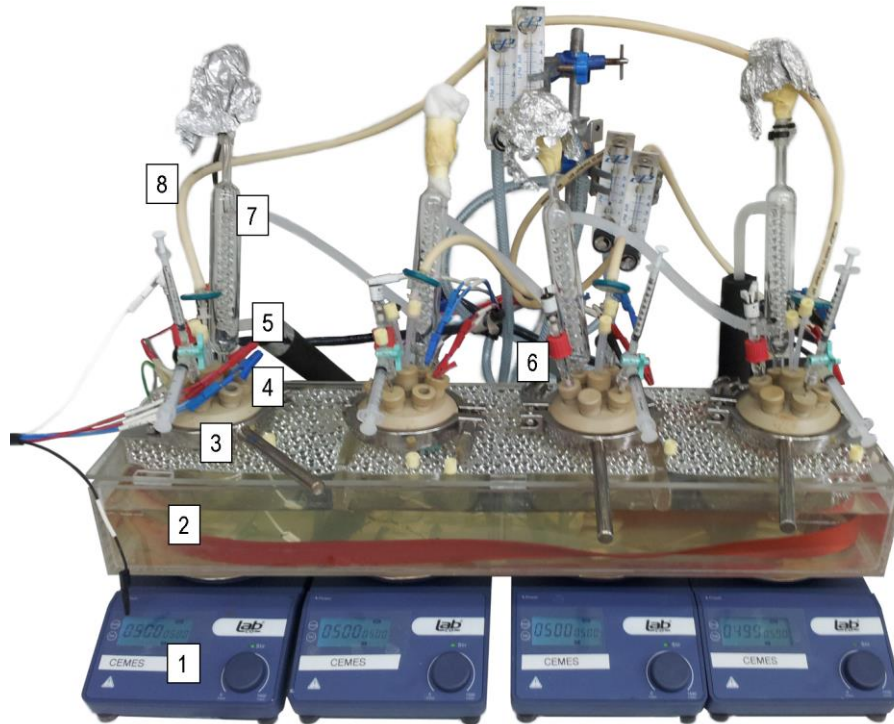


Abbildung 20 0,1 L-Parallelsystem für Satzprozesse mit Anodenatmung. [1] Magnetrührer; [2] Wasserbad; [3] Reaktor; [4] Anode; [5] Kathode, [6] Referenzelektrode; [7] Schlangenkühler; [8] Stickstoffzufuhr.

Durch die Verwendung einer Salzbrücke konnte der Abstand zwischen der Referenz- und der Arbeitselektrode verringert werden und der Austritt von toxischen Silberionen über die Glasfritte der Referenzelektrode in das Medium reduziert werden. Die Verwendung einer Salzbrücke für die Referenzelektrode war außerdem notwendig, da eine Sterilisation der Referenzelektrode nicht möglich war. Nach der Sterilisation des Reaktors wurde die Referenzelektrode mit der Salzbrücke, die blasenfrei mit Elektrolyt befüllt werden muss, verschraubt. Eine Silikon-Dichtung mit aufvulkanisierter Polytetrafluorethylen (PTFE)-Stulpe und zentrischer Bohrung (Duran Group, Deutschland) wurde verwendet, um Salzbrücke und Referenzelektrode luftdicht zu verschrauben, da es sonst zum Auslaufen der Elektrolytlösung über die Fritte der Glasbrücke in den Reaktor kommt. Die aus Graphitgewebe (FuelCellStore, USA) bestehenden Arbeitselektroden wurden an einem Titandraht befestigt, der über ein Septum nach außen geführt wurde. Kathoden- und Anodenkammer



wurden über eine Kationenaustauschermembran (CMI-7000 S, Membranes International, USA) getrennt, die mit einer Lochkappe (GL 14) und zwei O-Ringdichtungen mit der Kathodenkammer verschraubt wurde. Die Membranoberfläche betrug  $0,57 \text{ cm}^2$ . In der Kathodenkammer wurde an der aus einem aufgerolltem Titandrahtgeflecht (80 Mesh, Titan Grade 2, Alpha Aesar, Großbritannien) bestehende Kathode ein Titandraht befestigt. Die drei Elektroden wurden mit den entsprechenden Ausgängen des Potentiostaten (VSP, Bio-Logic, Frankreich) verbunden, der so die Regelung des Arbeitselektrodenpotentials ermöglichte. In Abhängigkeit des verwendeten Mediums beziehungsweise Mediators wurden die in Kapitel 7.2 genannten Arbeitselektrodenpotentiale eingestellt. Die Probenahme erfolgte über eine Edelstahlkanüle, die mittels eines Dreiwegeventils zwischen den Probenahmen verschlossen werden konnte. Um während der Prozesse anaerobe Reaktionsbedingungen sicherzustellen, wurden die Reaktoren mit Stickstoff begast. Die Anaerobisierung des Mediums erfolgte zunächst durch eine submerse Begasung mit Stickstoff für mindestens 12 h. Während des Satzprozesses wurde nur der Kopfraum mit Stickstoff begast, um Verdunstungseffekte zu reduzieren. Der Gasvolumenstrom konnte über Rotameter eingestellt werden. Um eine weitere Verminderung der Verdunstung des Mediums zu erreichen, wurde der Abgasstrom über Schlangenkühler geleitet, die mit  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Wasser gekühlt wurden. Das Kondensat wurde in den Reaktor zurückgeführt. Das Medium in den einwandigen Reaktoren wurde in einem Wasserbad auf  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Das Medium in den Reaktoren sowie das Wasser im Wasserbad wurden mittels Magnetrührer mit 500 rpm durchmischt.

#### **4.7 Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung im 1 L-System**

Das 1 L-System (Abbildung 21) wurde vom Lehrstuhl für Prozess und Anlagentechnik (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Der gesamte Reaktor, der aus einem doppelwandigen Gefäß mit Flachboden, Deckel mit 6 Durchführungen und Rührachse bestand, war aus Glas gefertigt. Das Gefäß verfügte über einen Doppelmantel und eine Durchführung am Reaktorboden. Die Durchführungen des Reaktordeckels waren um eine zentrale Öffnung ringförmig angeordnet. Zwei der fünf Durchführungen waren lotrecht, die übrigen drei Durchführungen wichen um einen Winkel von  $20^\circ$  vom Lot ab. Deckel und Gefäß konnten über eine Flanschklemme und O-Ringdichtung luftdicht verschlossen werden.

Die Temperierung des Mediums auf  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde mittels eines Wasserbads (Susanne, GFL, Deutschland) und einer Schlauchpumpe (BVP, Ismatec, USA) über den Doppelmantel des Reaktors realisiert. An der zentralen Deckeldurchführung konnte über einen Rührverschluss (22SVL,

SciLabware, Großbritannien) die Rührachse (588-33SVL, SciLabware, Großbritannien) mit Blattrührer befestigt werden. Der Rührer wurde von einem Rührwerk (RW 20 DZM, IKA, Deutschland) mit 400 rpm angetrieben. Arbeitselektrode und Kathodenkammer wurden über die zwei lotrechten, sich gegenüberliegenden Durchführungen im Deckel eingebracht. Die Arbeitselektrode (Graphitgewebe, FuelCellStore, USA) wurde an einem Glasstab befestigt. Ein Titandraht (Grade 2, Durchmesser 0,6 mm, Ankuro, Deutschland), der mit der Arbeitselektrode verbunden war, wurde über ein Septum nach außen geführt. Anoden- und Kathodenkammer (Eigenanfertigung, Abbildung 22 A, B) wurden über eine Kationenaustauschermembran (CMI-7000, Membranes International, USA, Sauerstoffdiffusionskoeffizient =  $3,72 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  (Kim *et al.*, 2007)) getrennt. Die Membran wurde mit einer Lochkappe (GL 32; Öffnungsdurchmesser: 2 cm) zwischen 2 Dichtungen fixiert. Die Größe der Membranfläche betrug  $3,14 \text{ cm}^2$ .

Kationenaustauschermembranen sind permeabel für Protonen, die in der Anodenkammer entstehen (Leong *et al.*, 2013). Um eine Ansäuerung des Katholyten durch diese Protonen zu vermeiden, wurde die Kathodenkammer mit Luft begast, damit Sauerstoff für die Kathodenreaktion ( $2 \text{ O}_2 + 8 \text{ H}^+ + 8 \text{ e}^- \rightarrow 4 \text{ H}_2\text{O}$ , Rahimnejad *et al.*, 2015) bereitgestellt wurde.

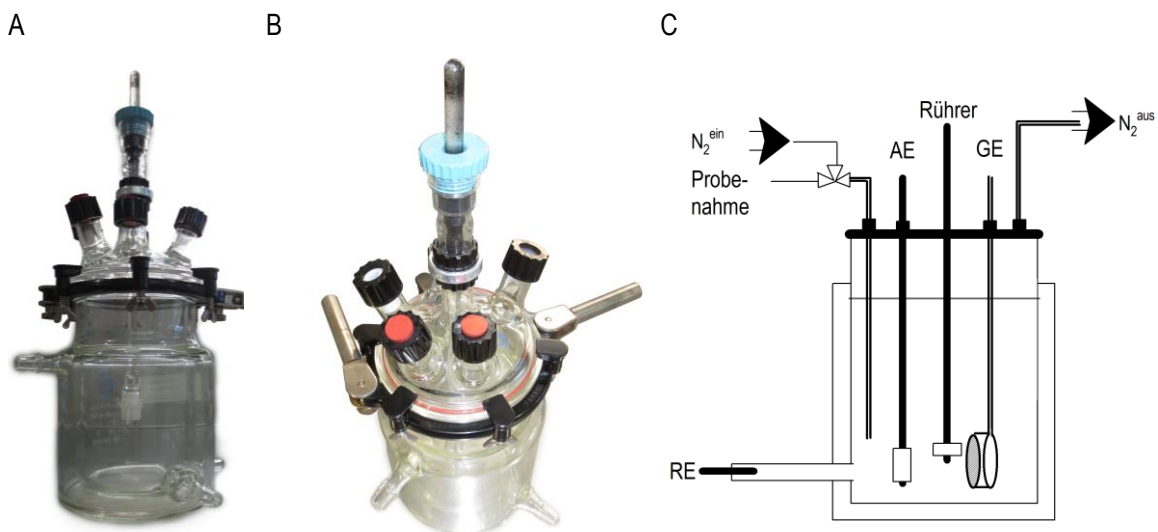


Abbildung 21 1 L-System für anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung. (A) Seitenansicht. (B) Schräge Aufsicht. (C) Schematische Darstellung des 1 L-Systems. AE: Arbeitselektrode; GE: Gegenelektrode; RE: Referenzelektrode.

Ein Sauerstoffdiffusionsstrom von  $0,012 \text{ mmol O}_2 \text{ d}^{-1}$  von der Kathoden- in die Anodenkammer wurde bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  berechnet. Eine Beeinflussung der Anodenatmung durch diese geringe Menge  $\text{O}_2$  kann vernachlässigt werden. Die Begasungsrate wurde mittels eines Rotameters (Kobold, Deutschland) auf

1 ml min<sup>-1</sup> eingestellt. Als Gegenelektrode wurde ein Titandrahtgeflecht (18 Mesh Drahtgeflecht aus Titanfaden mit 0,28 mm Durchmesser, Alfa Aesar, Deutschland) verwendet, das mit einem Titandraht (Grade 2, Durchmesser 0,6 mm, Ankuro, Deutschland) verbunden war. Die Referenzelektrode (Ag/AgCl, IJ Cambria Scientific, Großbritannien) konnte über eine Durchführung am Reaktorboden mittels einer Salzbrücke (Eigenanfertigung, Abbildung 22 C, D) direkt neben der Arbeitselektrode positioniert werden. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, wurde die Referenzelektrode erst nach der Sterilisation des Reaktors verbaut. Die drei Elektroden wurden mit den Ausgängen eines Potentiostaten (Bank Elektronik, Deutschland) verbunden, der die Regelung des Arbeitselektrodenpotentials auf +0,500 V ermöglichte.

Probenahmen und die über ein Rotameter (Kobold, Deutschland) auf 1 mL min<sup>-1</sup> eingestellte Stickstoffbegasung erfolgten durch dieselbe Edelstahlkanüle und wurden mittels eines Dreiwegeventils realisiert. Da das Mediumvolumen in der Kanüle durch den Stickstoffstrom nach der Probenahme in den Reaktor zurückgeführt wurde, konnte das zu verwerfende Probenvolumen auf 0,5 mL reduziert werden. Beide Volumenströme wurden über Schottflaschen geleitet, die mit sterilem Wasser befüllt waren, und dadurch befeuchtet, um die Verdunstung der Medien zu reduzieren. K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> wurde für alle im 1 L-System durchgeführten Satzprozesse als Mediator verwendet. Antischaum (Schill & Seilacher, Deutschland) wurde manuell nach Bedarf zugegeben.

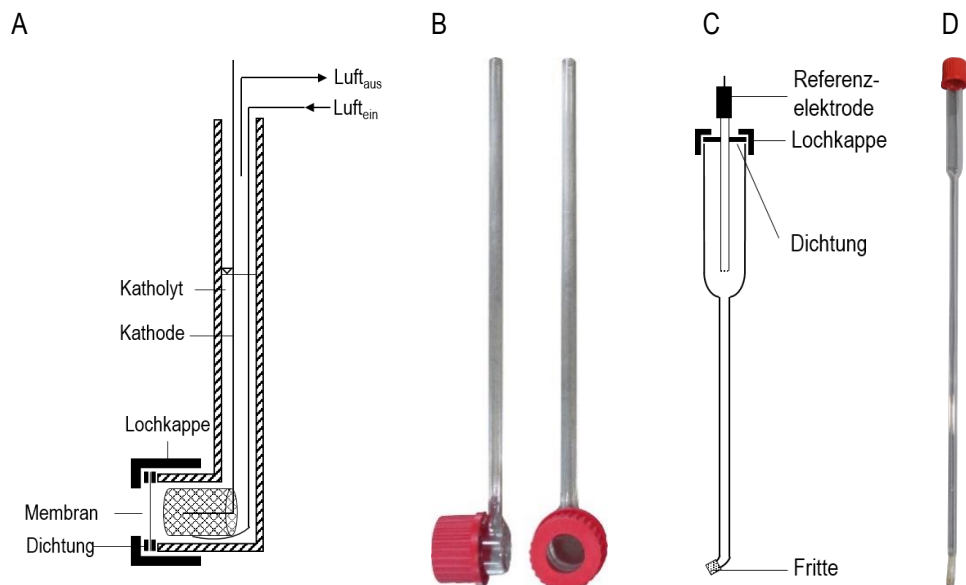


Abbildung 22 Kathodenkammer und Referenzelektrode für die Verwendung im 1 L-System sowie im 1,8 L- und 3,6 L-Rührkesselreaktor. (A) Schematische Darstellung der selbstentworfenen Kathodenkammer. (B) Foto der Kathodenkammer. (C) Schematische Darstellung der Salzbrücke und der Referenzelektrode. (D) Foto der Salzbrücke.

#### 4.8 Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung in Laborrührkesselreaktoren

Anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung wurden in einem 1,8 L-Rührkesselreaktor (Infors, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 1 L bei 30 °C durchgeführt (Abbildung 23 A-E). Der Reaktor war mit Temperaturfühler, pH-Sonde (Mettler Toledo, Deutschland), Strömungsbrecher und Sechsbblatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen) ausgestattet. Zwei Rushton-Turbinen waren in einem Abstand von 5 cm ober- und unterhalb der Kathodenkammer (Abbildung 22 A, B) montiert.

Über die Steuereinheit konnten die Parameter Temperatur, pH, Rührerdrehzahl und Begasungsrate überwacht und bei Bedarf geregelt werden. Die Aufzeichnung dieser Parameter erfolgte durch die Software IRIS (Infors, Schweiz). Die Temperaturregelung des Mediums erfolgte über den Doppelmantel des Reaktors auf 30 °C. Die Regelung des pH erfolgte durch den PID-Regler der Steuereinheit. Die PID-Parameter waren P: 1, I: 0,05, D: 0,03. Durch die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28 % (v/v)) und/oder  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (12,5 % (v/v)) wurde der pH auf pH 7,0 geregelt. Die Begasung des Reaktors mit Stickstoff erfolgte über den Massendurchflussregler der Steuereinheit. Wenn nicht anderweitig beschrieben, wurde der Rührer mit einer Geschwindigkeit von 400 rpm (volumenspezifischer Leistungseintrag  $0,61 \text{ W L}^{-1}$ ) betrieben.

Der Reaktor wurde während des Satzprozesses mit einem konstanten Volumenstrom von  $0,1 \text{ L min}^{-1}$  Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen sicherzustellen. Die Kathodenkammer wurde mit  $20 \text{ mL min}^{-1}$  steriler Druckluft begast. Die Druckluftbegasungsrate wurde mit einem Rotameter eingestellt (Kobold, Deutschland). Beide Volumenströme wurden über Schottflaschen geleitet, die mit sterilem Wasser befüllt waren, und dadurch befeuchtet, um die Verdunstung der Medien zu reduzieren. Der Katholyt musste dennoch in regelmäßigen Abständen manuell aufgefüllt werden. Antischaum (Schill & Seilacher, Deutschland) wurde manuell nach Bedarf zugegeben. Das Potential der Arbeitselektrode wurde mittels eines Potentiostaten (SP-150/Z, Bio-Logic, Frankreich) auf +0,500 V (versus Ag/AgCl) eingestellt. Die Aufzeichnung des Stromflusses erfolgte mit der Software EC-Lab (Bio-Logic, Frankreich). Für alle anaeroben Satzprozesse mit Anodenatmung im Laborrührkesselreaktor wurde Kaliumhexacyanoferrat ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) als Mediator verwendet.

Außerdem wurden anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung in einem 3,6 L-Rührkesselreaktor (Abbildung 24) durchgeführt (Labfors, Infors, Schweiz). Da dieser Reaktor über zusätzliche Deckeldurchführungen verfügt, konnte das Redoxpotential des Mediums mittels einer Redox-Sonde (Redox-Gold OPS32-0NBO2GSA, Eurotronic Umwelttechnik, Deutschland) gemessen und durch die automatische Zugabe einer 1 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  Stammlösung kontrolliert werden. Dazu wurde die Zulaufpumpe der Steuereinheit (Infors, Schweiz) eingesetzt. Die Regelung konnte mittels einer in die

IRIS-Software (Version 5.2; Infors, Schweiz) implementierten Sequenz realisiert werden (siehe Kapitel 14.3). Das Messsignal wurde über einen Messumformer (GRMU 200 MP, GHM Messtechnik, Deutschland), der mit einem separaten Netzteil (GNG 24 V, 150 mA, GHM Messtechnik, Deutschland) über eine vom Potentiostaten und der Labfors-Steuereinheit galvanisch getrennte Spannungsquelle verfügte, an den Analog-Digital-Wandler der Steuereinheit des Rührkesselreaktors angeschlossen und über diese ausgelesen.

#### **4.8.1 Laborrührkesselreaktor**

Der autoklavierbare 1,8 L-Rührkesselreaktor (Infors, Schweiz) aus Glas wurde modifiziert, so dass der Reaktor als elektrochemische Zelle betrieben werden konnte (Abbildung 23 A-E). Die Modifikationen werden im Folgenden beschrieben.

Der Edelstahldeckel mit allen Durchführungen, Rührwelle, Probenahmerohr und Zuläufen wurde von dem Metallgestell durch einen Silikonring elektrisch isoliert. Alle elektrisch leitfähigen Komponenten, die den Reaktordeckel und das Medium verbanden, wurden durch nicht leitfähige Materialien ersetzt. Die Rührwelle aus Edelstahl wurde durch eine Rührwelle aus PEEK (Durchmesser 12 mm) ersetzt und mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern bestückt. Das aus Edelstahl bestehende Tauchrohr für die Temperatur-Sonde wurde durch ein Tauchrohr aus PEEK (Eigenanfertigung) ersetzt. Die originalen Strömungsbrecher (Edelstahl) hatten keine Berührungspunkte mit dem Deckel und wurden nicht modifiziert. Die Begasung und Beprobung wurde über ein Glasrohr mit einem äußeren Durchmesser von 6 mm (innerer Durchmesser 3 mm) über ein Dreiwegeventil realisiert. Das Dreiwegeventil am oberen Ende des Probennahme- und Begasungsrohrs ermöglichte eine Reduzierung des zu verwendenden Probenvolumens auf 0,5 mL, was aufgrund der langen Prozesszeiten von Bedeutung war.

Die Arbeitselektrode wurde an einem PEEK-Stab fixiert, der eine Öffnung von 1 mm für die Durchführung des Titandrahts (Grade 2, Durchmesser 0,6 mm, Ankuro, Deutschland) besaß, mit welchem die Arbeitselektrode elektrisch leitend verbunden wurde. Graphitstab-, Graphitvlies- und Graphitbürsten-Elektroden (MBM, Deutschland; GCG Klein, Deutschland; The Mill-Rose Company, USA) wurden als Arbeitselektroden eingesetzt. Die Salzbrücke aus Glas (Abbildung 22 C, D) für die Referenzelektrode (Ag/AgCl, IJ Cambria Scientific, Großbritannien) wurde direkt neben der Arbeitselektrode positioniert. Wie in Kapitel 4.6 beschrieben, wurde die Referenzelektrode erst nach dem Autoklavieren mit der Salzbrücke verschraubt. Die Kathodenkammer befand sich gegenüber der Arbeitselektrode, was zu einer Dreieckelektrodenanordnung führt. Die Kathodenkammer (Abbildung

22 A, B) wurde aus Glas gefertigt. Katholyt und Anolyt wurden mittels einer Kationenaustauschermembran (CMI-7000, Membranes International, USA, Sauerstoffdiffusionskoeffizient =  $3,72 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  (Kim *et al.*, 2007)) getrennt. Die Membran wurde mit einer Lochkappe (GL 32; Öffnung 2 cm Durchmesser, Schott, Deutschland) zwischen 2 Dichtungen fixiert. Die Membranfläche betrug  $3,14 \text{ cm}^2$ . Kationenaustauschermembranen sind, wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, für in der Anodenkammer entstehende Protonen permeabel (Leong *et al.*, 2013). Um eine Ansäuerung des Katholyten durch diese Protonen zu vermeiden, wurde die Kathodenkammer mit Luft begast, damit Sauerstoff für die Kathodenreaktion ( $2 \text{ O}_2 + 8 \text{ H}^+ + 8 \text{ e}^- \rightarrow 4 \text{ H}_2\text{O}$ , Rahimnejad *et al.*, 2015) bereitgestellt wurde. Ein vernachlässigbarer Sauerstoffdiffusionsstrom von  $0,012 \text{ mmol O}_2 \text{ d}^{-1}$  von der Kathoden- in die Anodenkammer wurde für  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  berechnet.

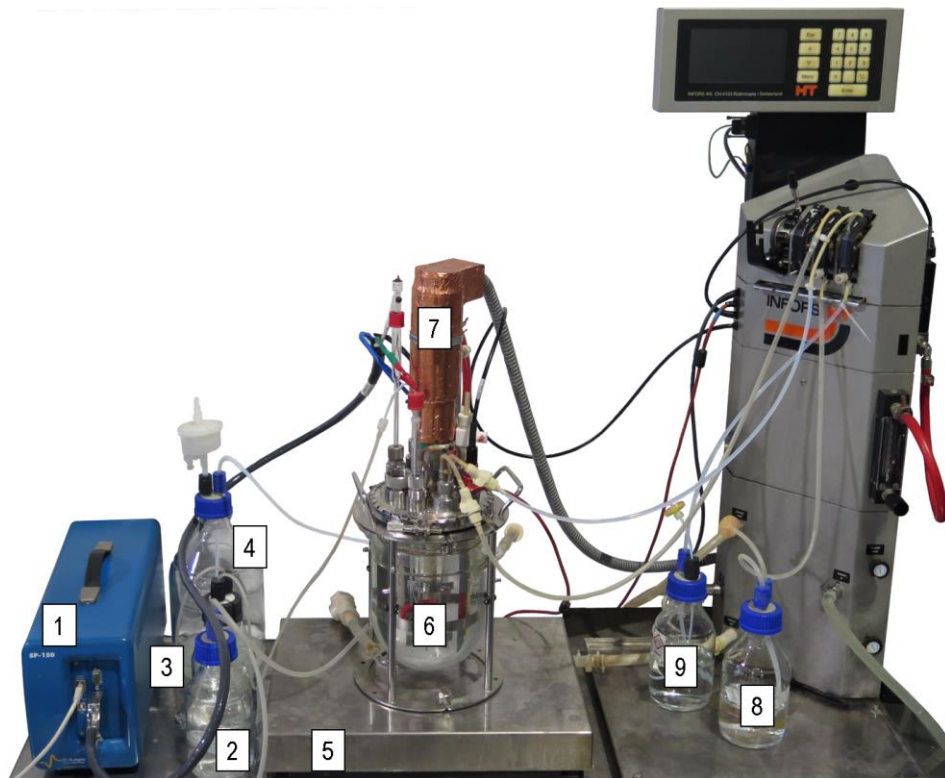
Als Kathodenmaterial wurde Titandrahtgeflecht (18 Mesh Drahtgeflecht aus Titanfaden mit  $0,28 \text{ mm}$  Durchmesser, Alfa Aesar, Deutschland) verwendet. Alle Einbauten, Glas, PEEK oder Metall, wurden mit Verbindungen von Infors (Bottmingen, Schweiz) befestigt.

Um elektromagnetische Störungen des Rührerantriebs auf die potentiostatischen Messungen zu verringern, wurde der Antrieb gegen den Deckel mit einem nach dem Autoklavieren angebrachten Isolierband (Coroplast, Fritz Müller, Deutschland) elektrisch isoliert und mit einer selbstklebenden Kupferfolie (Conrad, Deutschland) abgeschirmt und geerdet.

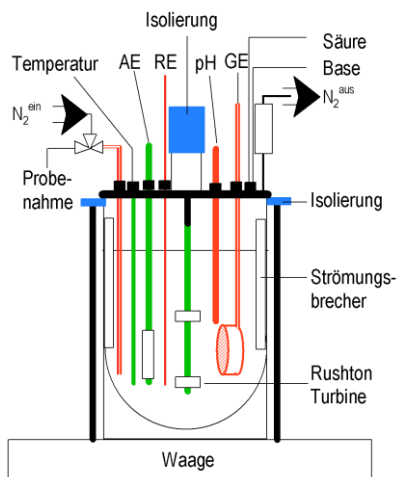
Die online-Messung des Redoxpotentials im Medium der Anodenkammer wurde mit einer Redox-Sonde durchgeführt. Prozesse mit Redox-Sonde wurden in einem  $3,6 \text{ L}$ -Rührkesselreaktor (Labfors, Infors, Schweiz) (Abbildung 24) durchgeführt, der mit den gleichen Teilen wie der  $1,8 \text{ L}$ -Reaktor modifiziert wurde. Die Verwendung dieses größeren Reaktors war auf Grund einer zusätzlich benötigten Deckeldurchführung für die Redox-Sonde notwendig.

Schematische Darstellungen und Fotos der umgebauten  $1,8 \text{ L}$ - und  $3,6 \text{ L}$ -Rührkesselreaktoren sowie der Versuchsaufbauten sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt.

A



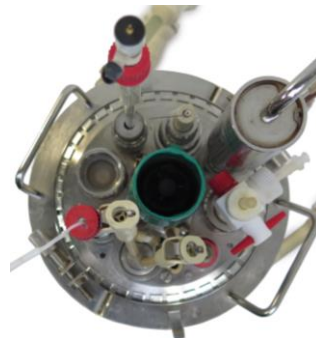
B



C



D

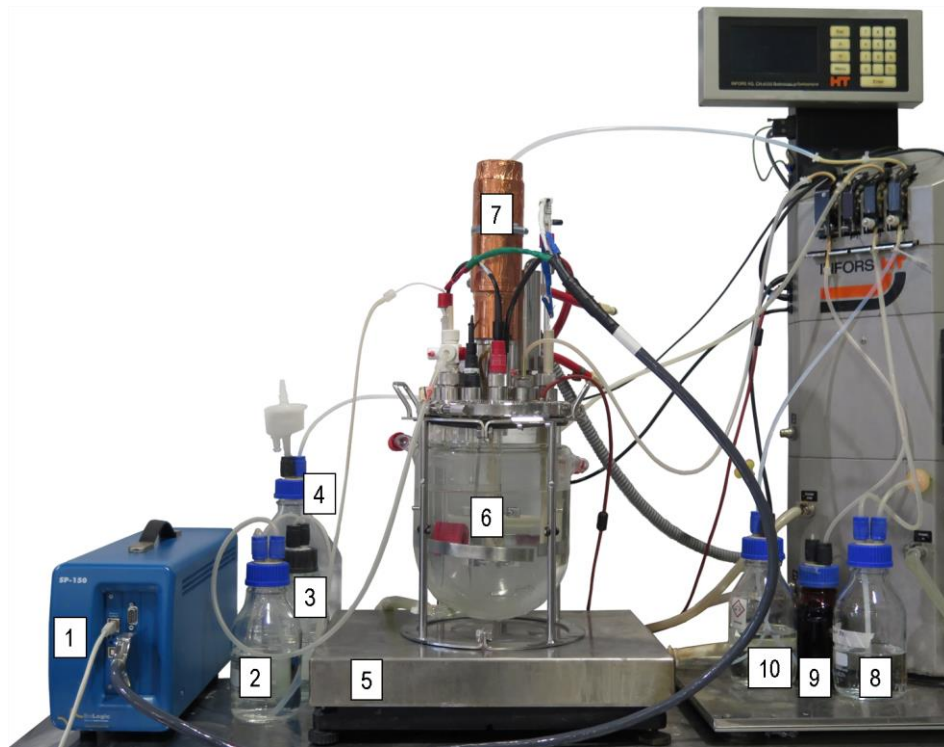


E

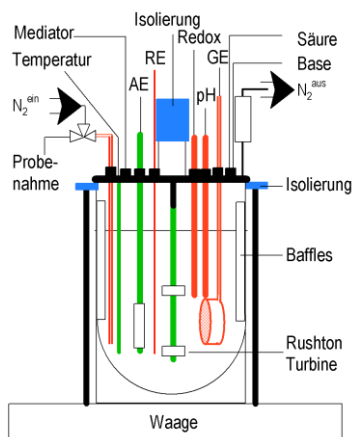


Abbildung 23 Modifizierter 1,8 L-Rührkesselreaktoren für die Verwendung als bio-elektrochemischer Reaktor. (A) Versuchsaufbau. [1] Potentiostat; [2] Luftbefeuchtung Kathodenkammer; [3] Luftbefeuchtung Reaktor; [4] Antischaumfalle; [5] Waage; [6] Reaktor, [7] Rührer; [8] Säure; [9] Base. (B) Schematische Darstellung. AE: Arbeitselektrode; RE: Referenzelektrode; GE: Gegenelektrode; pH: pH-Sonde. Zur Modifikation verwendete Materialien sind über folgende farbliche Kodierungen gekennzeichnet: Rot: Glas; Grün: PEEK; Blau: PVC und Silikon. (C) Foto des zusammengebauten 1,8 L-Reaktors. (D) Foto des Deckels des 1,8-L Reaktors mit Modifikationen - Aufsicht. (E) Foto des Deckels des 1,8 L-Reaktors mit Modifikationen - Seitenansicht.

A



B



C



D



E



Abbildung 24 Modifizierter 3,6 L-Rührkesselreaktoren für die Verwendung als bio-elektrochemischer Reaktor. (A) Versuchsaufbau. [1] Potentiostat; [2] Luftbefeuchtung Kathodenkammer; [3] Luftbefeuchtung Reaktor; [4] Antischaumfalle; [5] Waage; [6] Reaktor; [7] Rührer; [8] Säure; [9] Mediator; [10] Base. (B) Schematische Darstellung. Die Farbcodierung und Beschriftungen entsprechen den für den 1,8 L Reaktor (Abbildung 23) beschriebenen. Redox: Redox-Sonde; Mediator: Mediatorzulauf zur Regelung des Redoxpotentials des Mediums. (C) Foto des zusammengebauten 3,6 L-Reaktors. (D) Foto des Deckels des 3,6 L-Reaktors mit Modifikationen - Aufsicht. (e) Foto des Deckels des 3,6 L-Reaktors mit Modifikationen - Seitenansicht.



## 4.9 Genomweite Stoffflussabschätzung

Die im Rahmen dieser Arbeit geschätzten intrazellulären Stoffflussverteilungen wurden mittels Flussbilanz-Analysen (FBA) durchgeführt. Die Berechnungen wurden mit der für MATLAB R2013a (MATLAB R2013a, Mathworks, USA) verfügbaren Erweiterung COBRA (Version 2.02.5) (Schellenberger *et al.*, 2011) durchgeführt. Gurobi5 wurde als Solver für lineare Optimierungsprobleme verwendet.

Zur Abschätzung intrazellulärer Stoffflussverteilungen wurde das genomweite Modell iJP815 (Puchařka *et al.*, 2008) verwendet. iJP815 enthält 815 Gene, 877 Reaktionen und 886 Metabolite. Das Modell ist unter: <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article/asset?id=10.1371/journal.pcbi.1000210.XML> (Link zuletzt am 19.03.2016 geprüft) verfügbar.

iJP815 verwendet die wachstums- und nicht-wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie von *Escherichia coli* (*growth associated maintenance*,  $GAM = 13 \text{ mmol}_{\text{ATP}} \text{ g}_X^{-1}$ ; *non-growth associated maintenance*,  $NGAM = 12 \text{ mmol}_{\text{ATP}} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$ ). Diese wurden im ebenfalls verwendeten Modell iJP815<sub>mod</sub> an die von (van Duuren *et al.*, 2013) bestimmten Parameter für *Pseudomonas putida* KT2440 ( $GAM = 85 \text{ mmol}_{\text{ATP}} \text{ g}_X^{-1}$ ;  $NGAM = 3,96 \text{ mmol}_{\text{ATP}} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$ ) angepasst.

Das Modell iJP815<sub>mod, pHBA</sub> enthält weitere Modifikationen, die die Anodenatmung und die pHBA-Produktion der Mutante *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  umfassen. Für diese Berechnungen wurde für Reaktion IR03632 ( $p\text{HBA} + \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 3,4\text{-Dihydroxybenzoat} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$ ) ein Nullfluss vorgegeben, was die Deletion des für die 4-Hydroxybenzoate-3-Monooxygenase (EC:1.14.13.2) codierenden Gens *pobA* darstellt. Anodenatmung wurde im Modell realisiert, indem die Regeneration der Redoxäquivalente NADH, Ubichinol und Cytochrom c durch eine Modell-erweiterung (Kapitel 14.5) ermöglicht wurde. Gleichzeitig wurde die Sauerstoffaufnahme auf  $0 \text{ mmol} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$  beschränkt, um anaerobe Bedingungen darzustellen.

Um die *in silico* Biomasseerträge mittels FBA zu schätzen, diente die Maximierung der Biomassebildung als Zielfunktion. Dabei ist zu beachten, dass die substratspezifische Biomasseerträge ( $Y_{\text{XS}}$ ) eine Funktion der Wachstumsrate  $\mu$  und der Substrataufnahmerate  $q_S$  ist (Gleichung 18). Um sicherzustellen, dass die berechneten Wachstumsraten ihren maximalen Wert erreichen können, wurden die Substrataufnahmeraten auf einen Wert von  $20 \text{ mmol} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$  beschränkt. Dieser ist um den Faktor 2 größer als experimentell bestimmte Substrataufnahmeraten (Blank *et al.*, 2008) und sollte so

das Abschätzen der theoretisch maximalen Wachstumsrate erlauben. Um *in silico* pHBA-Erträge für Sauerstoff- und Anodenatmung abzuschätzen, wurde als zu maximierende Zielfunktion die Reaktion der Chorismat-Pyruvat-Lyase gewählt. Dies erlaubt die Ermittlung der theoretisch maximal möglichen pHBA-Erträge ohne gleichzeitiges Biomassewachstum. Die Substrataufnahmerate wurde ebenfalls auf  $20 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  beschränkt. Dies wurde analog zu Wittgens *et al.* (2011) durchgeführt, die mit dieser Vorgehensweise Abschätzungen bezüglich der Rhamnolipid-Produktion mit *P. putida* KT2440 vornahmen.

## 4.10 Reaktionstechnische Analyse

Substrat-, Biomasse- und Metabolit-Konzentrationen wurden offline bestimmt. Sigmoidale Funktionen wurden eingesetzt, um Biomasse- und Substratkonzentrationen im Satzprozess als Funktion der Prozesszeit zu interpolieren. Die spezifischen Wachstumsraten ( $\mu = c_X^{-1} dc_X dt^{-1}$ ), Substrataufnahmeraten ( $q_S = -c_X dc_S dt^{-1}$ ) und Biomasseerträge ( $Y_{XS} = \mu q_S^{-1}$ ) wurden basierend auf den interpolierten Konzentrationen bestimmt.

### 4.10.1 Abschätzung von Konzentrations-Zeit-Verläufen bei Satzverfahren

Die sigmoidale Richards-Funktion kann zur Abschätzung von Biomasse- und Produktkonzentrationen in mikrobiellen Wachstumsprozessen im Satzverfahren verwendet werden und wird durch Gleichung 19 definiert (Seber und Wild, 1989).

$$c_i(t) = a \cdot \left(1 + (d - 1) \cdot e^{-k \cdot (t-b)}\right)^{\frac{1}{1-d}} \quad 19$$

Die Verwendbarkeit der Funktion in der reaktionstechnischen Charakterisierung von mikrobiellen Prozessen ist gegeben, wenn die Parameter in einem sinnvollen Definitionsbereich ( $a > 0$ ,  $b > 0$ ,  $d > 1$ ,  $k > 0$ ) gewählt werden. Der Parameter  $a$  definiert die obere horizontale Asymptote der Funktion und entspricht somit der Biomassekonzentration in der stationären Phase. Der Parameter  $b$  bestimmt die Abszisse des Wendepunktes. Über den Asymmetrieparameter  $d$  kann die Rotationssymmetrie der sigmoidalen Richards-Funktion bezüglich des Wendepunktes beeinflusst werden. Je größer der Abstand von  $d$  von der unteren Grenze des Definitionsbereiches, desto stärker die Abweichung der Kurvenform von einer Rotationssymmetrie. Mit großen Werten von  $d$  kann somit eine mikrobielle Wachstumskurve im Sinne einer ausgedehnten exponentiellen Wachstumsphase und einer vergleichsweise kurzen Übergangsphase zur stationären Phase abgebildet werden (Abbildung 25).

Über den Parameter  $k$  kann die Richards-Funktion für kleine Werte von  $k$  gedehnt und für große Werte von  $k$  gestaucht werden.

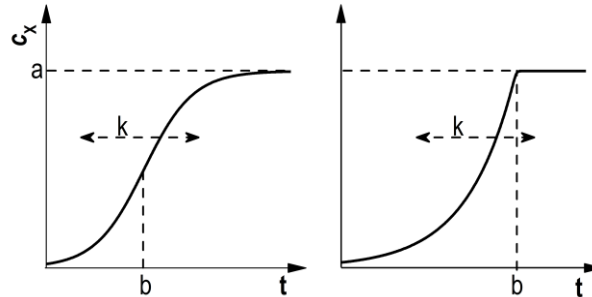


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Richards-Funktion zur Beschreibung von Biomasse- und Produktkonzentrationen bei Wahl des Asymmetrieparameters  $d$  bei einem Wert nahe 1 (links) und bei einem größeren Wert (rechts). Aufgetragen ist Biomassekonzentration  $c_x$  über die Prozesszeit  $t$ .  $a$  ist die obere horizontale Asymptote der Funktion.  $b$  ist die Abszisse des Wendepunkts der Funktion.  $k$  ist der Dehnungsfaktor in horizontaler Richtung.

Da für die reaktionstechnische Charakterisierung neben den Verläufen von Biomasse- und Produktkonzentrationen auch der Verlauf der Substratkonzentration interessant ist, wurde die Richards-Funktion durch Multiplikation mit  $(-1)$  an der Abszisse gespiegelt und um einen Summanden erweitert.

$$c_s(t) = a \cdot \left(1 - \left(1 + (d - 1) \cdot e^{-k \cdot (t-b)}\right)^{\frac{1}{1-d}}\right) \quad 20$$

Der neu eingefügte Summand entspricht dem Wert  $a$  der horizontalen oberen Asymptote, da die Substratkonzentration bei Prozessende den Wert Null erreichen muss. Die übrigen Parameter haben die bereits für die originale Richards-Funktion beschriebenen Eigenschaften. Die spezifischen Wachstumsraten, Produktbildungsraten und Substrataufnahmeraten können dann basierend auf Gleichung 17 berechnet werden

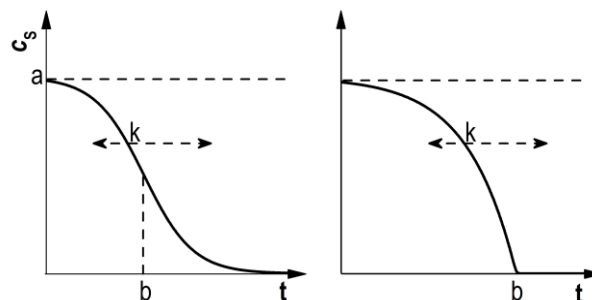


Abbildung 26 Schematische Darstellung der Richards-Funktion für Substratkonzentrationen bei Wahl des Asymmetrieparameters  $d$  bei einem Wert nahe 1 (links) und bei einem größeren Wert (rechts). Aufgetragen ist die Substratkonzentration  $c_s$  über die Prozesszeit  $t$ .  $a$  ist die obere horizontale Asymptote der Funktion.  $b$  ist die Abszisse des Wendepunkts der Funktion.  $k$  ist der Dehnungsfaktor in horizontaler Richtung.

#### 4.10.2 Interpolation von Biomasse-, Produkt- und Substratkonzentrationen

Biomasse und Produktkonzentrationen ( $c_i$ ;  $i = X$  (Biomasse) oder  $i = P$  (Produkt)) wurden mittels der Richards-Funktion (Gleichung 19) interpoliert. Substratkonzentrationen ( $c_s$ ) wurden mittels Gleichung 20 interpoliert. Der Levenberg-Marquardt Algorithmus (Matlab statistics toolbox, MATLAB R2013a, Mathworks, USA) wurde für die Abschätzung der Parameter von Gleichung 19 und 20 verwendet, indem die Quadratsummen der Residuen von Biomasse-, Produkt- und Substratkonzentrationen als Funktion der Prozesszeit minimiert wurden.

#### 4.10.3 Abgasanalyse

Die spezifische Sauerstoffaufnahme ( $q_{O_2}$ , Gleichung 21) und Kohlenstoffdioxidbildungsrate ( $q_{CO_2}$ , Gleichung 22) wurden aus den Daten der Abgasmessung bestimmt.

$$q_{O_2} = \frac{V_{gas}^{in}}{V_R \cdot V_{mol} \cdot \bar{c}_{CDW}} \left( x_{O_2}^{in} - \frac{1 - x_{CO_2}^{in} - x_{O_2}^{in}}{1 - x_{CO_2}^{out} - x_{O_2}^{out}} \cdot x_{O_2}^{out} \right) \quad 21$$

$$q_{CO_2} = \frac{V_{gas}^{in}}{V_R \cdot V_{mol} \cdot \bar{c}_{CDW}} \left( \frac{1 - x_{CO_2}^{in} - x_{O_2}^{in}}{1 - x_{CO_2}^{out} - x_{O_2}^{out}} \cdot x_{CO_2}^{out} - x_{CO_2}^{in} \right) \quad 22$$

$V_{gas}^{in}$	Zuluftstrom, L h <sup>-1</sup>
$x_i^{in}$	Molanteil des Stoffes $i$ in der Zuluft, -
$x_i^{out}$	Molanteil des Stoffes $i$ in der Abluft, -
$V_{mol}$	Molares Volumen eines idealen Gases, $V_{mol} = 22,414 \text{ L mol}^{-1}$
$V_R$	Reaktorvolumen, m <sup>3</sup>
$\bar{c}_{CDW}$	Mittlere Biomassekonzentration, g L <sup>-1</sup>

#### 4.10.4 Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen

Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen wurden mittels der Gleichungen 23 bis 26 bestimmt.

$$\text{Kohlenstoffbilanz} = \frac{n_t(C_{total})}{n_0(C_{total})} \quad 23$$

$$n_t(C_{total}) = n_t(C_{Reaktor}) + \sum_0^t n_t(C_{CO_2}) + \sum_0^t n_t(C_{Probe}) \quad 24$$

$n_t(C_{\text{total}})$	Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ , mol
$n_t(C_{\text{Reaktor}})$	Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ im Reaktor, mol
$\sum_0^t n_t(C_{\text{CO}_2})$	Aufsummierte Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ aus CO <sub>2</sub> , mol
$\sum_0^t n_t(C_{\text{Probe}})$	Aufsummierte Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ aus Proben, mol

$$\text{Elektronenbilanz} = \frac{n_{t,e^-}}{n_{0,e^-}} \quad 25$$

$$n_{t,e^-} = \kappa_X \cdot n_t(C_X) + \sum_{i=1}^M \kappa_{P,i} \cdot n_t(C_{P,i}) + \sum_{i=1}^N \kappa_{S,i} \cdot n_t(C_{S,i}) + \frac{Q_t}{F} + n_t(C_{\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6}) \cdot z \quad 26$$

$\kappa_X$	Reduktionsgrad der Biomasse (4,31 mol <sub>e</sub> ·molC <sup>-1</sup> <sub>X</sub> ; berechnet basierend auf der Biomassezusammensetzung von van Duuren <i>et al.</i> (2013), Schmitz <i>et al.</i> (2015) und den Elementwertigkeiten von Duboc <i>et al.</i> (1995)
$\kappa_{P,i}$	Reduktionsgrad des Produktes $i$ ;
$\kappa_{S,i}$	Reduktionsgrad der Substrate $i$
$\Delta n_t(C_i)$	$\Delta n_{t=0}(C_i) - \Delta n_t(C_i)$ , mol C <sub>i</sub> .
$Q$	Ladung, C
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96485,3 \text{ C mol}^{-1}$
$z$	Anzahl der Elektronen, die auf ein Mol K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> übertragen werden können; $z = 1$

Die letzten beiden Summanden in Gleichung 8 sind nur für Anodenatmung relevant. Sie beschreiben die auf die Elektrode übertragene Menge an Elektronen ( $Q_t/F$ ) und die Elektronen, die in Form des reduzierten Mediators vorliegen.

Das Reaktorgewicht wurde während des Prozesses gravimetrisch bestimmt, um Volumenänderungen durch Verdunstung, Probenahmen sowie pH-Regelung zu berücksichtigen. Die Masse des Mediums wurde durch die Subtraktion des Reaktorleergewichts von der gemessenen Reaktormasse bestimmt. Die Dichte von Wasser bei 30 °C (995 kg m<sup>-3</sup>) wurde verwendet, um das Reaktorvolumen zu berechnen.

Das Reaktorvolumen zum Zeitpunkt  $t$  ( $V_{Reaktor,t}$ ) entspricht dem Reaktorvolumen zum Zeitpunkt  $t = 0$  ( $V_{Reaktor,t_0}$ ) zuzüglich der Volumenerhöhung durch Zugabe von Säure und/oder Base ( $V_{pH,t}$ ) abzüglich der Volumenreduktion durch Verdunstung ( $V_{Verdunstung,t}$ ) und Probenahmen ( $\sum_0^t V_{Probe,t}$ ):

$$V_{Reaktor,t} = V_{Reaktor,t_0} + (V_{pH,t}) - V_{Verdunstung,t} - \sum_0^t V_{Probe,t} \quad 27$$

## 4.11 Analytische Methoden

### 4.11.1 Bestimmung der optischen Dichte und der Biomassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) mittels eines Einstrahlphotometers (Genesys 10 S, Thermo Waltham, USA). Die Zellsuspension wurde bei Bedarf mit PBS verdünnt, sodass der Messwert im linearen Bereich zwischen OD<sub>600</sub> = 0,1 und OD<sub>600</sub> = 0,4 lag.

Die Biomassekonzentrationen ( $c_x$ , g L<sup>-1</sup>) wurden über einen Korrelationsfaktor anhand der optischen Dichte bestimmt (siehe Anhang, Abbildung 14.6). Zunächst wurden 2 mL-Reaktionsgefäße für 7 Tage bei 80 °C getrocknet und das jeweilige Leergewicht bestimmt. Während der Satzprozesse wurde bei jeder Probenahme jeweils 1 mL der Zellsuspension im Dreifachansatz abzentrifugiert (13 000 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet. Die Bestimmung der Biomassekonzentration erfolgte anhand der folgenden Gleichung:

$$c_x = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad 28$$

$c_x$	Biomassekonzentration, g <sub>x</sub> L <sup>-1</sup>
$m_{\text{voll}}$	Masse des 2 mL-Reaktionsgefäßes mit Zellpellet nach der Trocknung, g

$m_{\text{leer}}$	Masse des leeren 2 mL-Reaktionsgefäßes nach der ersten Trocknung, g
$V$	Volumen der Zellsuspension vor der Zentrifugation, L

Nach Auftragung der Biomassekonzentration über die optische Dichte konnte ein Korrelationsfaktor  $a_X$  von  $0,577 \text{ g L}^{-1}$  mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,98 ermittelt werden. Alle angegebenen Biomassekonzentrationen dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieses Faktors nach Gleichung 29 bestimmt.

$$c_X = a_X \cdot OD_{600} \quad 29$$

$c_X$	Biomassekonzentration, $\text{g}_X \text{ L}^{-1}$
$a_X$	Korrelationsfaktor, $\text{g}_X \text{ L}^{-1}$
$OD_{600}$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm, -

#### 4.11.2 HPLC zur Quantifizierung von Glucose und organischen Säuren

Substrat-, Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen wurden über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; Agilent 1100 Series, Agilent, Kanada) bestimmt. Dazu wurde 1 mL der Probe sterilfiltriert (0,2  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter, Carl Roth, Deutschland), luftdicht in Rollrandfläschchen verschlossen und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die verwendete HPLC (Agilent, Kanada) verfügte über einen Brechungsindexdetektor (RI-Detektor, Agilent 1200 Series, Agilent, Kanada) und einen UV/VIS Detektor (S3300, Sykam, Deutschland). Es wurde eine Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, Deutschland) als stationäre Phase und 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  als mobile Phase verwendet. 20  $\mu\text{L}$  Probenvolumen wurde bei einer Säulenofentemperatur von 60 °C und einer konstanten Flussrate der mobilen Phase von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  aufgetrennt. Über externe Standards in den erwarteten Konzentrationsbereichen wurden Substrat- und Produktkonzentrationen bestimmt. Die Retentionszeiten aller untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 27 (Anhang, Kapitel 14.7) zu finden.

#### 4.11.3 Photometrische Messung von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Sterilfiltrierte Proben wurden verwendet, um die Extinktion der oxidierten Form des Mediators ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) bei 420 nm zu messen. Die Gesamtkonzentration des Mediators wurde nach der kompletten Oxidation von 160  $\mu\text{L}$  Probe mit 20  $\mu\text{L}$  HCl (37 % (w/w)) und 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 % (w/w)) in 610  $\mu\text{L}$  PBS bei 420 nm ermittelt. Aus der Differenz beider Messungen wurde die Konzentration des reduzierten Mediators ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) bestimmt. Proben wurden bei Bedarf mit PBS verdünnt,

sodass der Messwert im linearen Bereich zwischen  $OD_{420}$  0,1 und  $OD_{420}$  0,3 lag. Die  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration wurde über den molaren Extinktionskoeffizient  $\varepsilon = 1040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Appleby und Morton, 1959) mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt.

$$c = \frac{E_{420}}{\varepsilon_{420} \cdot d} \quad 30$$

$c$	Konzentration, $\text{mol L}^{-1}$
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient, $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$d$	Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, cm
$E_{420}$	Extinktion bei 420 nm, -

#### 4.11.4 Zyklische Voltogramme

Zyklische Voltogramme (engl. *cyclic voltammograms*, CV) wurden in der Drei-Elektrodenanordnung aufgenommen. Während der Aufnahme der CV wurde der Elektrolyt nicht durchmischt. Wenn nicht anderes angegeben, wurde das Potential der Arbeitselektrode zwischen -0,500 V und +0,500 V variiert. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug  $1 \text{ mV s}^{-1}$ . Die Halbstufenpotentiale wurden entsprechend der folgenden Gleichung berechnet.

$$E_{1/2} = \frac{E_{p,k} + E_{p,a}}{2} \quad 31$$

$E_{1/2}$	Halbstufenpotential, V
$E_{p,k}$	Kathodisches Spitzenstrompotential, V
$E_{p,a}$	Anodisches Spitzenstrompotential, V

#### 4.11.5 Messung der spezifischen Elektrodenoberflächen

Elektrodenmaterialien wurden bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  für 24 h unter Vakuum getrocknet. Brunauer-Emmet-Teller (BET) Messungen wurden mit Stickstoff in einem BET-Oberflächenmessgerät (Gemini VII, Micromeritics, Germany) durchgeführt. Diese Messungen wurden unter Anleitung von Herrn Markus Brammen (Fachgebiet für Selektive Trenntechnik, TU München) durchgeführt.

#### 4.11.6 Rasterelektronenmikroskopie der Anoden

Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (JEOL, JSM-5900 LV, Japan) wurden von Frau Dr. Marianne Hanzlik (Fachgebiet für Elektronenmikroskopie, TU München) durchgeführt. Das



---

Elektrodenmaterial wurde für mindestens 7 Tage bei 80 °C getrocknet und dann auf dem Objektträger fixiert. Die staubfreie Probe wurde mit Gold bedampft (SCP 005 Sputter Coaster, BALTEC, Deutschland). Die Aufnahmen wurden unter Hochvakuum angefertigt.

#### **4.11.7 Gaschromatographie-Massenspektroskopie Messungen**

Die Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)-Messungen wurden durchgeführt, um Nebenprodukte im Medium (M9) zu identifizieren. Dazu wurden die Proben mittels HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Kanada) fraktioniert, indem 200  $\mu$ L Probe auf die Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, Deutschland) aufgetragen wurden. Zur Trennung wurde die in Kapitel 4.11.2 beschriebene Methode verwendet. Dies wurde wiederholt, bis etwa 6 mL der Fraktion gesammelt waren. Diese wurden im Folgenden lyophilisiert. Die GC-MS Messungen wurden von Herrn Prof. Dr. Eisenreich und Frau Dr. Huber (Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München) nach der Methode von Häuslein *et al.* (2016) durchgeführt.

## 5 Modellgestützte Analyse von Sauerstoff- und Anodenatmung zur *p*HBA-Produktion

*Pseudomonas putida* KT2440 ist dafür bekannt, eine große Anzahl organischer Kohlenwasserstoffe umsetzen zu können (Dos Santos *et al.*, 2004). Um für die *p*HBA-Produktion in aeroben Satzprozessen und anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung geeignete Substrate zu identifizieren, wurde eine computergestützte Abschätzung der Substratverwertbarkeit durchgeführt. Zur Untersuchung der Abschätzungsgenauigkeit der genomweiten Modelle iJP815 und iJP815<sub>mod</sub> wurde über Flussbilanz-Analyse (engl. *flux balance analysis*, FBA) zunächst die theoretisch maximale *in silico* Biomasseerträge für 57 Substrate bestimmt und für ausgewählte Substrate experimentell überprüft. Im Modell iJP815<sub>mod</sub> wurden die wachstumsabhängige und wachstumsunabhängige Stoffwechsell-erhaltungsenergie (engl. *growth-associated maintenance*, GAM, und *non-growth-associated maintenance*, NGAM) von *E. coli* durch die von van Duuren *et al.* (2013) für *P. putida* KT2440 ermittelten Werte ersetzt (Kapitel 4.9 und 14.5). Die Abschätzung der Eignung von Substraten für die *p*HBA-Produktion mit dem rekombinanten Stamm *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC* wurde im Anschluss basierend auf dem genaueren Modell iJP815<sub>mod</sub> durchgeführt. Geeignete Substrate wurden schließlich anhand der modellbasierten abgeschätzten *p*HBA-Erträge sowie anhand ihrer Wirtschaftlichkeit und ihres Redoxzustands bezüglich *p*HBA ausgewählt.

### 5.1 Modellvalidierung

Um die *in silico* Biomasseerträge ( $Y_{XS}$ ) mittels FBA zu berechnen, wurde als einziger Fluss die Substrataufnahmerate beschränkt. Für alle Substrate wurde dazu ein Wert von 20 mmol ( $g_X h$ )<sup>-1</sup> gewählt, um sicherzustellen, dass die geschätzten Wachstumsraten ihren maximalen Wert erreichen können (Kapitel 3.6.1).

Die mit den Modellen iJP815 und iJP815<sub>mod</sub> mittels FBA bestimmten *in silico* Biomasseerträge der 57 Substrate sind in Abbildung 27 dargestellt. Die geschätzten Biomasseerträge lagen zwischen 0,26 molC molC<sup>-1</sup> und 0,7 molC molC<sup>-1</sup> (iJP815) beziehungsweise 0,24 molC molC<sup>-1</sup> und 0,55 molC molC<sup>-1</sup> (iJP815<sub>mod</sub>). Mit beiden Modellen war für 38 der 57 gewählten Substrate Biomassebildung möglich.

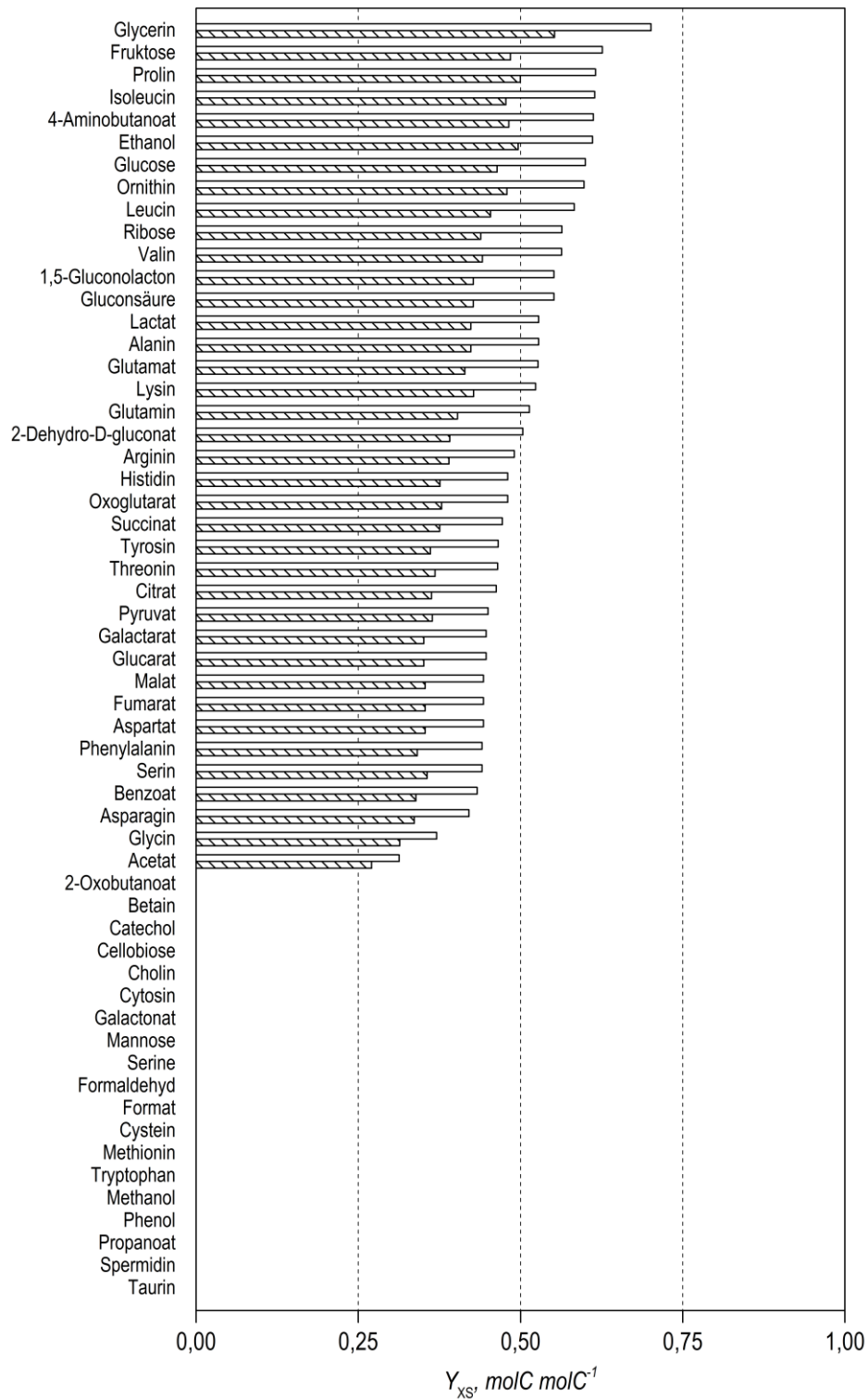


Abbildung 27 Mit den Modellen iJP815 (weiße Balken) und iJP815<sub>mod</sub> (schraffierte Balken) geschätzte Biomasserträge für die Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit *P. putida* KT2440.

Um die Abschätzungen der Modelle auf ihre Genauigkeit hin zu überprüfen, wurden die sechs Substrate Acetat, Glycerin, Pyruvat, Citrat, Succinat und Malat ausgewählt, die den Bereich maximaler (Glycerin) bis minimaler Biomasseerträge (Acetat) abdecken. Die *in silico* Biomasseerträge dieser Substrate sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Mit den Modellen *iJP815* und *iJP815<sub>mod</sub>* geschätzte Biomasseerträge der zur Validierung ausgewählten Substrate.  $Y_{XS,i}$ : Mit Modell *i* abgeschätzte Biomasseerträge.

	$Y_{XS,iJP815}, \text{molC}_X \text{ molC}_S^{-1}$	$Y_{XS,iJP815\text{mod}}, \text{molC}_X \text{ molC}_S^{-1}$
Acetat	0,31	0,27
Glycerin	0,70	0,55
Pyruvat	0,45	0,36
Citrat	0,46	0,36
Succinat	0,47	0,38
Malat	0,44	0,35

Die zur Modellvalidierung in Rührkesselreaktoren mit 3 L Arbeitsvolumen im Satzverfahren experimentell bestimmten Biomasseerträge sind in Abbildung 10 dargestellt. Der Vergleich zwischen experimentell bestimmten und von *iJP815* abgeschätzten Biomasseerträgen zeigte, dass *iJP815* die Biomasseerträge – mit Ausnahme des Substrates Acetat – um 21 % bis 50 % überschätzte. Für alle Substrate wurden von *iJP815* höhere Biomasseerträge geschätzt als von *iJP815<sub>mod</sub>*.

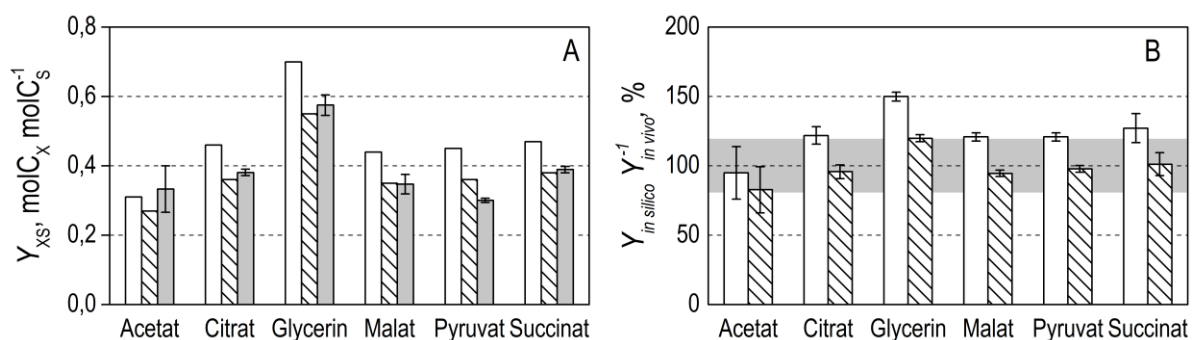


Abbildung 28 Experimentelle Validierung der genomweiten Modelle *iJP815* und *iJP815<sub>mod</sub>*. (A) Mit *iJP815* (weiße Balken) und *iJP815<sub>mod</sub>* (schraffierte Balken) geschätzte sowie experimentell ermittelte (graue Balken) Biomasseerträge. (B) Abweichungen zwischen *in silico* und *in vivo* Biomasseerträge. Weiße Balken: *iJP815*; schraffierte Balken: *iJP815<sub>mod</sub>*. Der grau hinterlegte Bereich markiert Abweichungen von  $\pm 20\%$ . Die Fehlerbalken basieren auf zwei Satzversuchen pro Substrat.

Der Vergleich zwischen den *in silico* Biomasseerträgen von iJP815<sub>mod</sub> und den experimentell bestimmten Biomasseerträgen zeigte, dass die von iJP815<sub>mod</sub> geschätzten Biomasseerträge für Citrat, Malat, Pyruvat und Succinat nur um 5 % von den experimentell bestimmten Werten abwichen. Für Acetat und Glycerin lagen die Abweichungen bei 20 %.

### **Diskussion**

Ziel dieser Untersuchung war die experimentelle Validierung des genomweiten Stoffwechselmodells iJP815 und einer modifizierten Version iJP815<sub>mod</sub>. Wie bereits von Puchałka *et al.* (2008) und van Duuren *et al.* (2013) beschrieben wurde und anhand der hier dargestellten Ergebnisse bestätigt werden konnte, führte die Erhöhung von GAM und NAGM im Modell iJP815<sub>mod</sub> zu geringeren *in silico* Biomasseerträgen. Durch diese Änderungen konnte die Übereinstimmung der *in silico* Biomasseerträge mit den experimentell gemessenen Werten für fünf der sechs Substrate (Citrat, Glycerin, Malat, Pyruvat und Succinat) deutlich verbessert werden. Die Abweichung zwischen geschätzten und experimentell bestimmten Biomasseertrag war für Acetat mit iJP815<sub>mod</sub> größer als mit iJP815. Dies kann vermutlich auf die experimentell bestimmten Werte zurückgeführt werden, die bei Acetat eine etwas höhere Standardabweichung aufweisen als bei den anderen Substraten.

Da bei fünf von sechs Substraten die Genauigkeit durch die Anpassung von GAM und NGAM verbessert werden konnte, wurde für die im Folgenden durchgeführten Analysen zur Abschätzung der pHBA-Erträge das Modell iJP815<sub>mod</sub> verwendet.

## **5.2 *In silico* Abschätzung von *p*HBA-Erträgen für *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC***

Das modifizierte genomweite Modell  $iJP815_{\text{mod}}$  wurde für eine computergestützte Abschätzung der Substratverwertbarkeit von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC* zur Produktion von *p*HBA verwendet. Die *p*HBA-Erträge wurden anhand des Modells für Sauerstoff- und Anodenatmung abgeschätzt.

Dazu wurde das Modell  $iJP815_{\text{mod}}$  modifiziert, um als Modell  $iJP815_{\text{mod},p\text{HBA}}$  die gentechnischen Modifikationen des rekombinanten Stammes *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC* sowie die Anodenatmung abzubilden (Kapitel 4.9 und Anhang 14.5.2). Die anhand der FBA ermittelten Abschätzungen vernachlässigen das Biomassewachstum und stellen folglich die theoretisch maximal möglichen *p*HBA-Erträge dar.

Die geschätzten *p*HBA-Erträge (Abbildung 29) zeigten, dass unter aeroben Bedingungen mit 38 der 57 evaluierten Substrate eine Produktion von *p*HBA zu erwarten ist. Die 19 Substrate ohne *p*HBA-Bildung entsprechen den 19 Substraten, für die im vorhergehenden Kapitel keine Biomassebildung möglich war. Die für Anodenatmung geschätzten *p*HBA-Erträge zeigten zusätzlich für Lysin, Tyrosin, Phenylalanin und Benzoat keine *p*HBA-Bildung.

Die höchsten *p*HBA-Erträge sind nach diesen Ergebnissen für Glycerin und Glucose zu erwarten. Für höher oxidierte Substrate wie beispielsweise Carbonsäuren aus dem Zitronensäurezyklus wurden geringere *p*HBA-Erträge vorhergesagt. Die unter aeroben Bedingungen geschätzten *p*HBA-Erträge waren in allen Fällen höher als die unter anodischen Bedingungen geschätzten *p*HBA-Erträge.

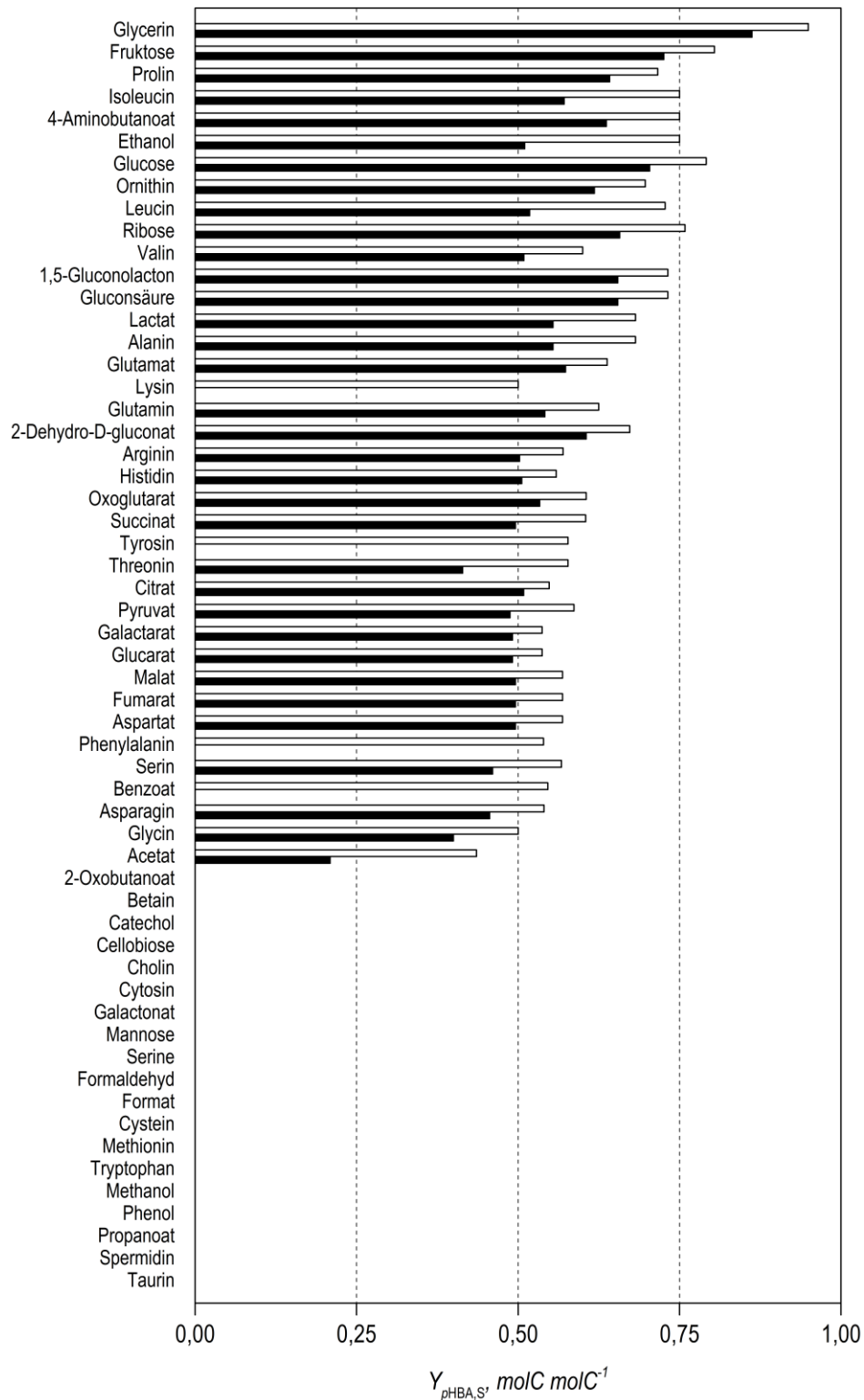


Abbildung 29 *In silico* pHBA-Erträge für die Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$ . Sauerstoffatmung (weiße Balken) und Anodenatmung (schwarze Balken).

### 5.3 Diskussion

Das Ziel dieser Analyse war es, Substrate zu identifizieren, die bei Sauerstoff- und Anodenatmung die Bildung von *p*HBA ermöglichen und im Folgenden experimentell untersucht werden sollten. Anhand des genomweiten Modells  $iJP815_{\text{mod},p\text{HBA}}$  wurden 33 Substrate identifiziert, für die eine *p*HBA-Produktion mit Sauerstoff- und Anodenatmung zu erwarten ist. Aus diesem Substratspektrum wurde aufgrund folgender Überlegungen eine Auswahl getroffen.

Zunächst wurden unter der Berücksichtigung der Wirtschaftlichkeit alle Aminosäuren als Substrate aufgrund hoher Kosten ausgeschlossen, sodass 19 Substrate übrig blieben. Anhand der modellgestützten Abschätzungen der Substratverwertbarkeit zur *p*HBA-Produktion (Abbildung 29) wurden aus diesen 19 Substraten Glucose und Glycerin ausgewählt, da für diese Substrate mit dem Modell für Sauerstoff- und Anodenatmung hohe *p*HBA-Erträge geschätzt worden waren (Tabelle 9).

Tabelle 9 Substrate zur *p*HBA-Produktion unter Sauerstoff- und Anodenatmung.  $Y_{p\text{HBA},S,\text{in silico}}$ : Mittels  $iJP815_{\text{mod},p\text{HBA}}$  abgeschätzte *p*HBA-Erträge ohne Berücksichtigung des Wachstums; SA: Sauerstoffatmung; AA: Anodenatmung;  $n_{e^-}$ : Mol Elektronen, die bei der vollständigen Reduktion (positives Vorzeichen) oder zur vollständigen Reduktion (negatives Vorzeichen) des Substrates zu *p*HBA freigesetzt beziehungsweise benötigt werden.

Kriterium	Glucose	Glycerin	Citrat	Succinat	Malat
$Y_{p\text{HBA},S,\text{in silico}, SA}$ , molC molC <sup>-1</sup>	0,79	0,95	0,55	0,60	0,57
$Y_{p\text{HBA},S,\text{in silico}, AA}$ , molC molC <sup>-1</sup>	0,70	0,86	0,51	0,50	0,50
$n_{e^-}$ , mol	0	-5	+42	+14	+28

Bei der Anodenatmung kommt es zur Akkumulation reduzierter Redoxäquivalente (Kracke und Krömer, 2014). Deshalb wurden für alle 19 Substrate mittels Redox-Halbreaktionen die theoretisch maximale Anzahl an Elektronen bestimmt, die bei einer vollständigen Umsetzung des Substrates zu *p*HBA benötigt beziehungsweise abgegeben werden muss (Kapitel 14.4). Einem Überschuss reduzierter Redoxäquivalente kann durch die Verwendung von Substraten entgegengewirkt werden, die oxidierter sind als *p*HBA. Von den 19 Substraten waren 11 oxidierter als *p*HBA. Aus diesen 11 Substraten wurden Citrat, Succinat und Malat ausgewählt, da sie sich bezüglich der notwendigen Menge an Elektronen deutlich unterschieden. Basierend auf den Abschätzungen des Modells und dem Redoxzustand bezüglich des Produktes *p*HBA wurden somit die Substrate Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat für die experimentellen Untersuchungen ausgewählt.



## 6 Reaktionstechnische Analyse der aeroben *p*HBA-Produktion

Anhand der in Kapitel 5.3 dargestellten theoretischen Überlegungen wurden fünf für *p*HBA-Produktion mit Sauerstoff- und Anodenatmung geeignete Substrate (Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat) identifiziert, die sich hinsichtlich ihrer Redoxzustände bezüglich des Produktes *p*HBA sowie den geschätzten *p*HBA-Erträgen unterschieden.

In den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde experimentell untersucht, wie sich die Wahl der Substrate auf die *p*HBA-Produktion mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* unter aeroben Bedingungen auswirkt. Die experimentellen Untersuchungen wurden im Rahmen einer vergleichenden reaktionstechnischen Analyse von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* im Satzverfahren durchgeführt. Das Ziel der Untersuchungen war die Generierung von Vergleichswerten zur Einordnung der Ergebnisse aus der später durchzuführenden reaktionstechnischen Charakterisierung der *p*HBA-Produktion in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung.

Neben diesem Hauptzweck wurden die Untersuchungen auch genutzt, um Informationen über die metabolischen Effekte der gentechnischen Modifikationen zu erlangen. Dazu wurde zusätzlich zur Identifikation prozesscharakterisierender Parameter ( $\mu$ ,  $q_s$ , Erträge) auch die Nebenproduktbildung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* analysiert. Anhand einer reaktionstechnischen Charakterisierung des Wildtyp-Stammes *P. putida* KT2440 wurden die Auswirkungen der gentechnischen Modifikationen schließlich eingeordnet.

### 6.1 Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC*

Die reaktionstechnischen Analysen von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* erfolgte in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1 L. Die Bestimmung von Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen wurde in regelmäßigen Abständen von 10 Minuten durchgeführt. Während des Übergangs von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase wurde der Reaktor im Abstand von 5 Minuten beprobt. CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Abgas sowie das Gewicht des Reaktors wurden während der kompletten Prozesszeit online aufgezeichnet. Aus den mittels HPLC bestimmten Substrat- und *p*HBA-Konzentrationen sowie den photometrisch ermittelten Biomassekonzentrationen wurden mit einer sigmoidalen Funktion (Richards-Funktion, Gleichungen 19 und 20) die Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen während der gesamten Prozesszeit abgeschätzt. Anhand der

Ausgleichsfunktionen wurden die spezifischen Wachstums-, Substrataufnahme- und *p*HBA-Bildungsraten bestimmt (Kapitel 4.10). Mit der Ausgleichsfunktion der Biomassekonzentration und den CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgasmessungen wurden die spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten ermittelt. Des Weiteren wurde der Respirationsquotient bestimmt. Unter Berücksichtigung von Substrat, Biomasse, *p*HBA, CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurden außerdem die Wiederfindungen für Kohlenstoff und Elektronen über die Prozesszeit sowie die integralen Biomasse-, *p*HBA- und CO<sub>2</sub>-Erträge zu Prozessende bestimmt. Bei allen im 1 L-Rührkesselreaktor durchgeführten Satzprozessen wurde sowohl für die Vorkulturherstellung als auch für die Satzprozesse im Rührkesselreaktor das definierte M9-Medium mit der jeweils untersuchten Kohlenstoffquelle verwendet, sodass zu Prozessbeginn Verzögerungsphasen vermieden werden konnten. Um aussagekräftige Konzentrationsverläufe von Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentration darstellen zu können, wurden diese Daten für Glycerin (Prozesslaufzeit 18 h) aus zwei Versuchsläufen kombiniert. Bei allen übrigen Substraten waren die Prozesslaufzeiten kürzer, sodass Ergebnisse aus nur einem Versuch dargestellt sind. Nach der ersten Verdopplung der Biomassekonzentration wurde das Gen *ubiC*, das für die 4-Hydroxybenzoat-3-Hydroxymonooxygenase kodiert, mit IPTG induziert. Die Verläufe aller in den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  gemessenen Prozessgrößen sind – vergleichend für die fünf untersuchten Substrate – in Abbildung 30 dargestellt.

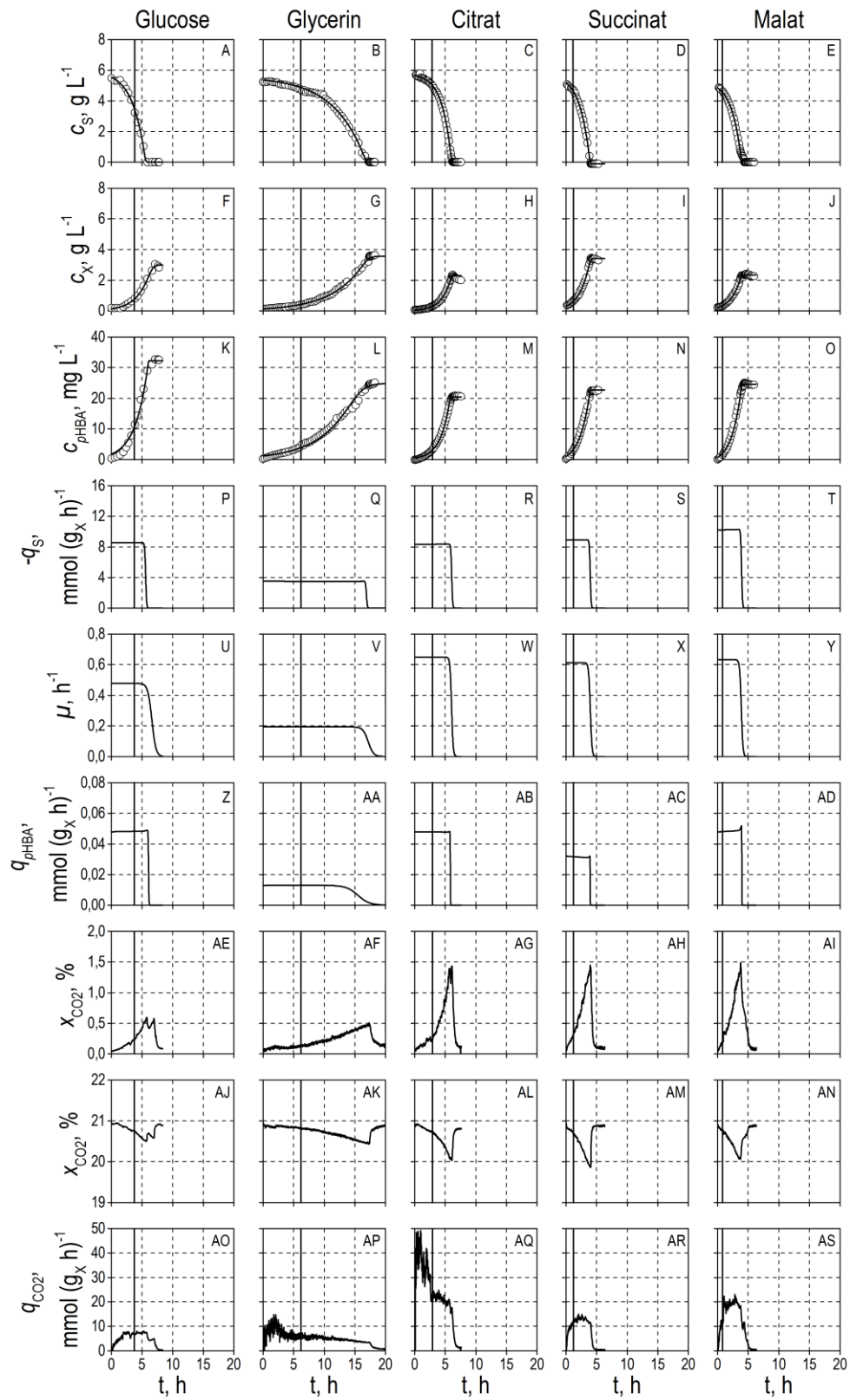
Die in Abbildung 30 A-E gezeigten Substratkonzentrationen nahmen mit der Prozesszeit exponentiell ab. Von Prozessbeginn bis zum Zeitpunkt des vollständigen Substratumsatzes vergingen zwischen 4 h (Succinat) und 17 h (Glycerin). Es wurde eine exponentielle Zunahme der Biomassekonzentration beobachtet (Abbildung 30 F-J). Mit Ausnahme des Satzprozesses mit Glucose korrelierten die Zeitpunkte des vollständigen Substratumsatzes mit dem Übergang der Zellen in die stationäre Wachstumsphase. Im Satzprozess mit Glucose wurde nach dem vollständigen Umsatz von Glucose nach 5,6 h noch für weitere 1,5 h bis zu einer Prozesszeit von 7,1 h eine Zunahme der Biomassekonzentration beobachtet. Die in der stationären Phase bestimmten maximalen Biomassekonzentrationen lagen zwischen 2,3 g L<sup>-1</sup> (Citrat) und 3,6 g L<sup>-1</sup> (Glycerin). Dementsprechend unterschieden sich auch die integralen Biomasseerträge, die zwischen 0,44 molC<sub>X</sub> molC<sub>S</sub><sup>-1</sup> (Citrat) und 0,66 molC<sub>X</sub> molC<sub>S</sub><sup>-1</sup> (Glycerin) lagen. In Tabelle 10 sind die Biomasseerträge der übrigen Substrate aufgeführt.

Wie Abbildung 30 K-O zeigt, konnte *P. putida*  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  alle untersuchten Substrate zur *p*HBA-Bildung nutzen. Es wurden maximale Konzentrationen zwischen 18,5 mg L<sup>-1</sup> (Pyruvat) und 34,1 mg L<sup>-1</sup> (Glucose) beziehungsweise maximale *p*HBA-Erträge von 5,47 mmolC<sub>*p*HBA} molC<sup>-1</sup><sub>Pyruvat</sub></sub>

und  $9,05 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}^{-1}_{\text{Glucose}}$  erreicht (Tabelle 10). Die *p*HBA-Produktion war in allen Fällen direkt zu Prozessbeginn und damit vor der Induktion des Gens *ubiC* zu beobachten. Durch die Induktion des Gens *ubiC* mit IPTG nach der ersten Biomasseverdopplung (schwarze senkrechte Linien in Abbildung 30) sollte die Chorismat-Pyruvat-Lyase überexprimiert werden und so zur Steigerung der *p*HBA-Produktion führen. Allerdings konnte keine Erhöhung der *p*HBA-Bildung nach der Induktion festgestellt werden. Anhand der Ausgleichsfunktionen für Substrat-, Biomasse und *p*HBA-Konzentrationen wurden nach Gleichung 17 die spezifischen Substrataufnahme-, Wachstums- und *p*HBA-Bildungsraten berechnet (Abbildung 30 P-AD). Die höchste spezifische Substrataufnahmerate wurde im Satzprozess mit Malat ( $10,07 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ ) ermittelt, die Geringste im Satzprozess mit Glycerin ( $3,53 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ ). Die spezifischen Wachstumsraten lagen zwischen  $0,19 \text{ h}^{-1}$  (Glycerin) und  $0,65 \text{ h}^{-1}$  (Citrat), die *p*HBA-Bildungsraten zwischen  $0,01 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Glycerin) und  $0,05 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Glucose und Citrat).

Tabelle 10 Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit *P. putida* KT2440  $\Delta p\text{obA}/p\text{SEVA-ubiC}$ . Die Tabelle zeigt die maximalen Biomasse-, *p*HBA-, und  $\text{CO}_2$ -Erträge ( $Y_{\text{XS}}$ ,  $Y_{p\text{HBA,S}}$  und  $Y_{\text{CO}_2,\text{S}}$ ), maximale spezifische Substrataufnahme-, Wachstums-, *p*HBA-Bildungs-,  $\text{CO}_2$ -Bildungs- und  $\text{O}_2$ -Aufnahmerate ( $q_{\text{S,max}}$ ,  $\mu_{\text{max}}$ ,  $q_{p\text{HBA,max}}$ ,  $q_{\text{CO}_2,\text{max}}$  und  $q_{\text{O}_2,\text{max}}$ ) sowie die Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen in der stationären Phase.

	Glucose	Glycerin	Citrat	Succinat	Malat
$Y_{\text{XS}}, \text{molC}_X \text{ molC}_S^{-1}$	0,56	0,66	0,44	0,64	0,50
$Y_{p\text{HBA,S}}, \text{mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$	9,05	7,30	5,84	6,06	7,59
$Y_{\text{CO}_2,\text{S}}, \text{molC}_{\text{CO}_2} \text{ molC}_S^{-1}$	0,37	0,48	0,56	0,41	0,57
$-q_{\text{S,max}}, \text{mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$	8,55	3,53	8,38	8,93	10,07
$\mu_{\text{max}}, \text{h}^{-1}$	0,48	0,19	0,65	0,61	0,63
$q_{p\text{HBA,max}}, \text{mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$	0,05	0,01	0,05	0,03	0,05
$q_{\text{CO}_2,\text{max}}, \text{mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$	6,90	12,11	42,56	13,43	19,82
$-q_{\text{O}_2,\text{max}}, \text{mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$	10,13	21,90	21,16	10,96	13,62
Kohlenstoffbilanz, %	99	102	100	100	100
Elektronenbilanz, %	100	107	100	98	100



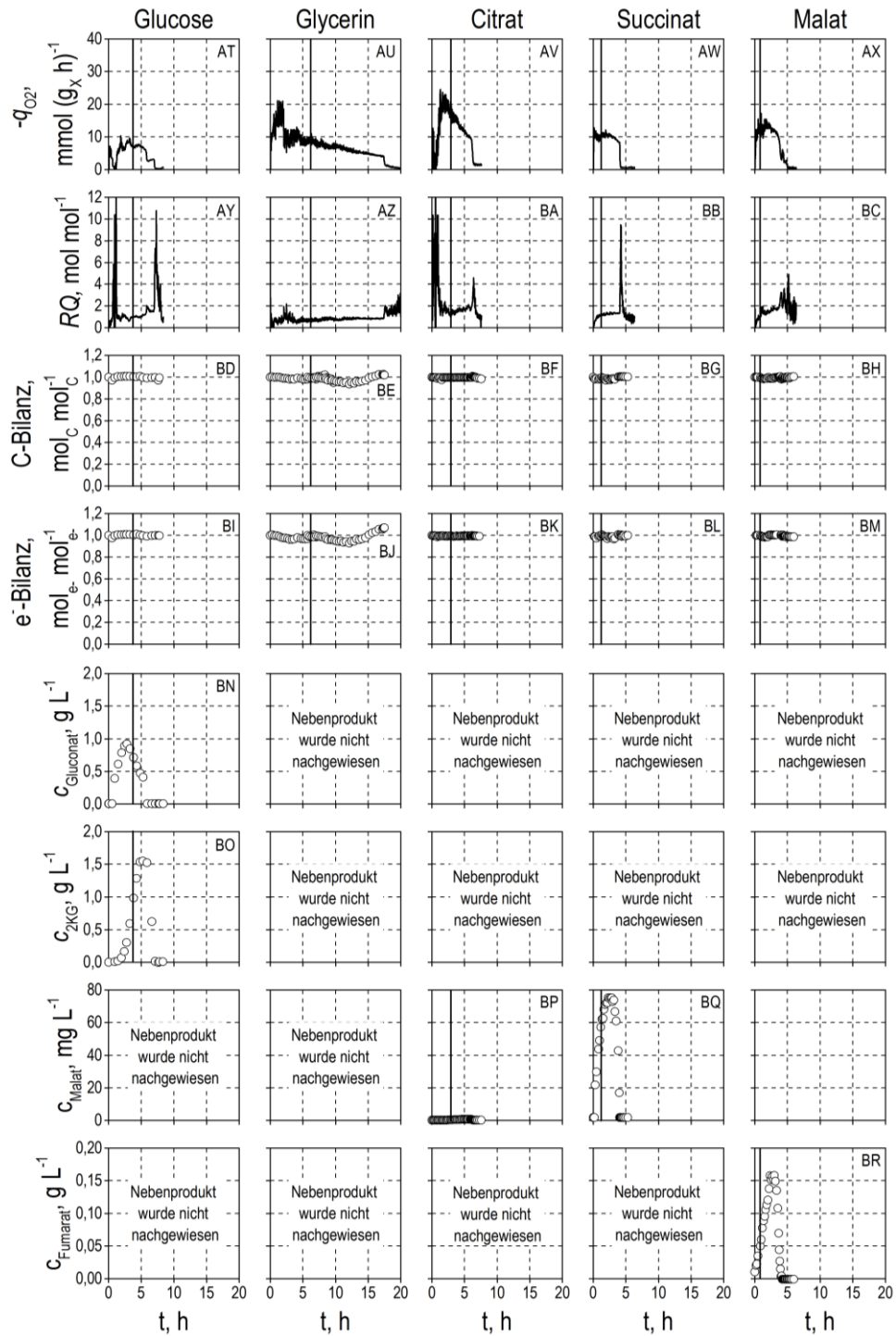


Abbildung 30 Aerobe Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  zur *p*HBA-Produktion. *c*<sub>i</sub>: Konzentration der Komponente *i*; *S*: Substrat; *X*: Biomasse; *q*<sub>*i*</sub>: spezifische Rate der Komponente *i*;  $\mu$ : Spezifische Wachstumsrate; *x*<sub>*i*</sub>: Molanteil der Komponente *i* im Abgasstrom; *RQ*: Respirationskoeffizient; C-Bilanz: Kohlenstoffbilanz; *e*-Bilanz: Elektronenbilanz; 2KG: 2-Ketogluconat. Die senkrechte schwarze Linie markiert den Zeitpunkt der Induktion des Gens *ubiC*.

Mit der Inokulation stieg der Kohlenstoffdioxidanteil im Abgasstrom während der exponentiellen Wachstumsphasen an und fiel mit Erreichen der stationären Phase wieder ab (Abbildung 30 AE-AI). Dabei konnte beobachtet werden, dass das Messsignal den CO<sub>2</sub>-Wert zu Prozessbeginn nicht mehr erreichte. Diese Drift des Abgasmesssignals ist im Satzprozess mit Glycerin am deutlichsten ausgeprägt. In den Satzprozessen mit Glucose und Citrat zeigten die CO<sub>2</sub>-Verläufe je zwei Maxima, während mit den übrigen Substraten nur ein Maximum beobachtet wurde. Die O<sub>2</sub>-Abgassignale zeigten zu den CO<sub>2</sub>-Messwerten komplementäre Verläufe (Abbildung 30 AJ-AN). Auch hier wurde eine Drift des Messsignals während der Prozesszeit beobachtet. Anhand der CO<sub>2</sub>-Abgasmessung wurden die integralen CO<sub>2</sub>-Erträge für jedes Substrat zu Prozessende bestimmt. Diese lagen zwischen 0,37 molC<sub>CO2</sub> molC<sub>S</sub><sup>-1</sup> (Glucose) und 0,57 molC<sub>CO2</sub> molC<sub>S</sub><sup>-1</sup> (Malat). Die CO<sub>2</sub>-Erträge aller übrigen Substrate sind in Tabelle 10 zu finden.

Basierend auf den mit den Ausgleichsfunktionen geschätzten Biomassekonzentrationen und den CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgasmessungen wurden die spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten während der Prozesszeit bestimmt (Abbildung 30 AO-AX). In allen Satzprozessen stiegen die spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten mit der Inokulation an und fielen zum Zeitpunkt des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase steil ab. Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigten CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten für die verschiedenen Substrate unterschiedliche Verläufe. Im Folgenden sind zunächst die Verläufe der CO<sub>2</sub>-Bildungsraten und dann die Verläufe der O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten beschrieben.

Im Satzprozess mit Glycerin wurde nach einer Prozesszeit von 1,5 h die maximale CO<sub>2</sub>-Bildungsrate von 12,11 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> erreicht (Tabelle 10) und fiel dann zu einer Prozesszeit von 3,5 h auf 6,40 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> ab. Die CO<sub>2</sub>-Bildungsrate verringerte sich während der exponentiellen Wachstumsphase langsam. Nach 17 h, am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, lag sie bei 3,49 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> (Abbildung 30 AP). Der steilste Anstieg der CO<sub>2</sub>-Bildungsrate wurde im Satzprozess mit Citrat beobachtet (Abbildung 30 AQ). Hier erreichte sie innerhalb der ersten 30 min 43,02 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> (Tabelle 10). Mit der Induktion des Gens *ubiC* nach 2,6 h fiel die CO<sub>2</sub>-Bildungsrate innerhalb von 18 min auf 21,97 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup>. Bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase blieb sie konstant. In den Satzprozessen mit Glucose, Succinat und Malat (Abbildung 30 AO, AR, AS) wurden nach einem anfänglichen Anstieg der CO<sub>2</sub>-Bildungsraten während der exponentiellen Phase konstante maximale Raten von 6,90 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> (Glucose), 13,43 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> (Succinat) und 19,82 mmol (g<sub>X</sub> h)<sup>-1</sup> (Malat) bestimmt (Tabelle 10).

Die im Folgenden beschriebenen Verläufe der spezifischen  $O_2$ -Aufnahmeraten (Abbildung 30 AT-AX) unterschieden sich ebenfalls während der exponentiellen Wachstumsphase. In dieser Wachstumsphase wurden im Satzprozess mit Glucose Schwankungen der  $O_2$ -Aufnahmeraten (Abbildung 30 AT) zwischen  $6,07 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  und  $9,07 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  beobachtet. Nach 5,7 h fiel die  $O_2$ -Aufnahmerate auf  $2,5 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  und blieb für die folgenden 36 Minuten bis zu einer Prozesszeit von 6,3 h konstant. Erst dann konnte der Abfall der  $O_2$ -Aufnahmerate gegen Null beobachtet werden, der mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase korrelierte.

Im Satzprozess mit Glycerin (Abbildung 30 AU) wurde die maximale  $O_2$ -Aufnahmerate ( $21,90 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ ) nach 1 h erreicht. Zu einer Prozesszeit von 2 h fiel die  $O_2$ -Aufnahmerate innerhalb von 13 min auf  $9,77 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ . Ab diesem Zeitpunkt wurde eine lineare Abnahme der  $O_2$ -Aufnahmerate beobachtet. Nach 17 h zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine  $O_2$ -Aufnahmerate von  $4,03 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  bestimmt. Der Verlauf der  $O_2$ -Aufnahmerate im Satzprozess mit Citrat (Abbildung 30 AV) entsprach der im Satzprozess mit Glycerin. Nach dem Erreichen der maximalen  $O_2$ -Aufnahmerate ( $21,16 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ ) nach 1,5 h wurde eine lineare Abnahme auf  $9,19 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  zu einer Prozesszeit von 4 h beobachtet, bevor die  $O_2$ -Aufnahmerate steil gegen Null lief. In den Satzprozessen mit Succinat (Abbildung 30 AW) und Malat (Abbildung 30 AX) wurden während der exponentiellen Wachstumsphasen konstante  $O_2$ -Aufnahmeraten von  $10,69 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Succinat) und  $13,62 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Malat) bestimmt. Die maximalen spezifischen  $CO_2$ -Bildungs- und  $O_2$ -Aufnahmeraten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Die aus dem Verhältnis von  $q_{CO_2}$  und  $q_{O_2}$  bestimmten Respirationskoeffizienten ( $RQ$ ) waren in den Satzprozessen mit Glycerin ( $0,94 \text{ mol mol}^{-1}$ ), Citrat ( $1,70 \text{ mol mol}^{-1}$ ), Succinat ( $1,25 \text{ mol mol}^{-1}$ ) und Malat ( $1,71 \text{ mol mol}^{-1}$ ) während der exponentiellen Phase konstant. Im Satzprozess mit Glucose stieg der  $RQ$  während der exponentiellen Phase von  $0,52 \text{ mol mol}^{-1}$  auf  $1,62 \text{ mol mol}^{-1}$  (Abbildung 30 AY-BB).

### 6.1.1 Nebenproduktbildung

Gentechnische Veränderungen in Mikroorganismen können die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten zur Folge haben. Wenn Kohlenstoff und Elektronen in Prozessen nicht wiedergefunden werden, kann dies auf die Bildung nicht berücksichtigter Nebenprodukte hinweisen. Für die durchgeführten Prozesse wurden deshalb die Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen

über den gesamten Prozessverlauf überprüft. Dabei wurden zunächst nur Substrat, Biomasse, *p*HBA und CO<sub>2</sub> beziehungsweise O<sub>2</sub> berücksichtigt.

Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen konnten mit Erreichen der stationären Phase geschlossen werden. Die Wiederfindung lag in allen Satzprozessen zu Beginn der stationären Phase zwischen 99 % und 102 % (Kohlenstoffbilanz) sowie 98 % und 107 % (Elektronenbilanz) (Tabelle 10). Im Satzprozess mit Glycerin wurden Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen mit 102 % und 107 % überschätzt. Dies ist auf die bereits zuvor beschriebene Drift der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub> Messsignale zurückzuführen, die sich bei Glycerin aufgrund der längeren Prozesszeit deutlicher ausgeprägt hat als bei den übrigen Substraten.

Wurden Kohlenstoff- und Elektronenwiederfindung während der exponentiellen Wachstumsphase betrachtet, konnte im Satzprozess mit Glucose festgestellt werden, dass sich die Wiederfindungen unter ausschließlicher Berücksichtigung von Glucose, Biomasse, *p*HBA und CO<sub>2</sub> beziehungsweise O<sub>2</sub> mit zunehmender Prozesszeit bis auf circa 70 % ( $t = 6$  h) reduzierten (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Prozessverlauf erhöhten sich die Wiederfindungen von Kohlenstoff und Elektronen wieder, sodass die Bilanzen mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase geschlossen werden konnten. Außerdem konnte, wie bereits zuvor beschrieben, nach dem vollständigen Umsatz von Glucose nach einer Prozesszeit von 5,6 h eine Zunahme der Biomassekonzentration für weitere 1,5 h beobachtet werden. Des Weiteren zeigten CO<sub>2</sub>- beziehungsweise O<sub>2</sub>-Abgasmesssignale zwei lokale Maxima nach 5,75 h und 6,2 h, und der *RQ* stieg während des Prozesses an. Alle diese Beobachtungen deuteten auf die Bildung von Nebenprodukten hin, die im weiteren Prozessverlauf wieder verstoffwechselt wurden.

Für den Wildtyp-Stamm *P. putida* KT2440 ist aus der Literatur bekannt, dass es bei der Umsetzung des Substrates Glucose zur Bildung von Gluconat und 2-Ketogluconat kommt. Mittels HPLC konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von Glucose mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/*p*SEVA-*ubiC* ebenso zur Bildung von Gluconat und 2-Ketogluconat führte (Abbildung 30 BN, BO). Dabei wurde zunächst nur eine Zunahme der Gluconat-Konzentration gemessen, bis nach 2,8 h eine maximale Konzentration von 0,6 g L<sup>-1</sup> erreicht wurde. Im weiteren Prozessverlauf kam es zu einer simultanen Umsetzung von Glucose und Gluconat und zur Bildung von 2-Ketogluconat. Die maximale 2-Ketogluconat-Konzentration betrug 1,55 g L<sup>-1</sup>. Im Anschluss an die vollständige Umsetzung von Glucose und Gluconat nach 5,8 h wurde das zuvor gebildete 2-Ketogluconat metabolisiert. Das Maximum im CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgassignal nach 5,75 h entspricht der zeitlichen Umstellung des mikrobiellen Metabolismus von Glucose/Gluconat auf 2-Ketogluconat. Das Maximum nach 6,2 h fällt mit der vollständigen



Umsetzung von 2-Ketogluconat zusammen. Wurden die mittels HPLC bestimmten Gluconat- und 2-Ketogluconatkonzentrationen für die Bilanzierung von Kohlenstoff und Elektronen berücksichtigt, konnten diese während der exponentiellen Phase geschlossen werden (Abbildung 30 BD, BI).

Für die übrigen Substrate wird in der Literatur keine Bildung von Nebenprodukten beschrieben. Deshalb wurden in einem ersten Schritt die HPLC-Chromatogramme analysiert, um anhand der Erhöhungen von nicht zugeordneten Signalen unbekannte Substanzen mit steigender Konzentration ausfindig zu machen. Mittels Co-Injektionen von Proben und Standards konnten anhand eines Vergleichs der Elutionszeiten potentielle Verbindungen identifiziert werden. Mit freundlicher Unterstützung der Herren Lai und Chrysanthopoulos (University of Queensland, Australien) sowie Herrn Prof. Eisenreich und Frau Dr. Huber (Lehrstuhl für Biochemie, TU München) wurden ausgewählte Proben mittels HPLC und GC-MS überprüft. Dies ermöglichte eine stoffliche Zuordnung und damit im Anschluss eine Konzentrationsbestimmung der Nebenprodukte über die Prozesszeit mittels HPLC.

Im Satzprozess mit Citrat konnte die Bildung des Nebenproduktes Malat (Abbildung 30 BP) mittels GC-MS nachgewiesen werden. Die Konzentrationen wurden dann mittels HPLC bestimmt. Die Bildung von Malat begann mit der Induktion des für die Chorismat-Pyruvat-Lyase codierenden Gens *ubiC* nach 2,7 h. Nach 5,8 h wurde die maximale Konzentration von  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  erreicht. Mit dem vollständigen Umsatz von Citrat kam es nach 5,8 h zur Metabolisierung von Malat. Die Zeitpunkte der beginnenden Malat-Umsetzung (5,8 h) und dessen vollständiger Verstoffwechslung (6,6 h) fallen mit dem Anstieg des  $\text{O}_2$ -Abgassignals auf ein zweites Maximum zusammen. Dieses zweite Maximum ist im Vergleich zu dem bei der Umsetzung von Glucose beobachteten zweiten Maximum nur gering ausgeprägt, was auf die geringe Malat-Konzentration zurückzuführen ist.

Im Satzprozess mit Succinat konnte ebenfalls Malat (Abbildung 30 BQ) als Nebenprodukt identifiziert werden. Im Gegensatz zum Satzprozess mit Citrat wurde Malat im Satzprozess mit Succinat schon vor der Induktion des Gens *ubiC* gebildet und erreichte nach 3,2 h eine maximale Konzentration von  $75 \text{ mg L}^{-1}$ . Nach einer Prozesszeit von 3,2 h kam es zu einer Co-Metabolisierung von Succinat und Malat. Dies zeigte sich weder im Verlauf der  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Messsignale, in denen jeweils nur ein einziger lokaler Extremwert beobachtet wurde (Abbildung 30 AH, AM), noch in der Wiederfindung von Kohlenstoff oder Elektronen, die – auch ohne Berücksichtigung des Nebenproduktes Malat – während der exponentiellen Phase immer größer als 97 % (Daten nicht gezeigt) war. Unter

Berücksichtigung von Malat konnten die Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen auf 98 % geschlossen werden (Abbildung 30 BG, BL).

Im Satzprozess mit Malat konnte die Bildung des Nebenproduktes Fumarat (Abbildung 30 BR) mittels HPLC festgestellt werden. Dies wurde durch eine unabhängige HPLC-Messung an der University of Queensland bestätigt. Die maximale Fumarat-Konzentration von  $0,16 \text{ g L}^{-1}$  wurde nach einer Prozesszeit von 3,2 h bestimmt. Zu einer Prozesszeit von 3,2 h setzte eine Co-Metabolisierung von Malat und Fumarat ein (Abbildung 30 E, BR). Das Abgasmesssignal gab auf diese metabolische Umstellung keinen Hinweis (Abbildung 30 AI, AN). Die minimale Wiederfindungen von Kohlenstoff und Elektronen lagen während der exponentiellen Phase ohne Berücksichtigung von Fumarat bei 94 % (Daten nicht gezeigt) und ließen dementsprechend ebenfalls keine relevante Nebenproduktbildung erwarten. Wurde Fumarat bei der Bilanzierung von Kohlenstoff und Elektronen berücksichtigt, konnten die Bilanzen zu jedem Messzeitpunkt über 97 % geschlossen werden (Abbildung 30 BH, BM).

### 6.1.2 Diskussion

Ein Ziel der durchgeführten reaktionstechnischen Analysen war es, die Herstellung von *pHBA* mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  ausgehend von Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat zu untersuchen, um so ein möglichst vollständiges Bild über den Stamm *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  zu erlangen.

Im Rahmen der reaktionstechnischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die exponentiellen Abbeziehungsweise Zunahmen der Substrat-, Biomasse- und *pHBA*-Konzentrationen den für Satzprozesse zu erwartenden Verläufen entsprechen. Die Verläufe der spezifischen Substrataufnahme-, Wachstums- und *pHBA*-Bildungsraten waren während der exponentiellen Phasen für alle Substrate konstant.

Es wurde festgestellt, dass *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  in der Lage ist, alle ausgewählten Kohlenstoffquellen zur Produktion von *pHBA* zu nutzen. Die *pHBA*-Bildung konnte in allen Fällen direkt zu Prozessbeginn und damit vor der Induktion des Gens *ubiC* beobachtet werden. Dies zeigt, dass in *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  eine Basalexpression des Enzyms Chorismat-Pyruvat-Lyase vorliegt. Durch die Induktion des Gens *ubiC* mit IPTG sollte die Chorismat-Pyruvat-Lyase überexprimiert werden und so zur Steigerung der *pHBA*-Bildung führen. Allerdings konnte keine

Erhöhung der *p*HBA-Bildung durch die Induktion festgestellt werden. Damit stellen sich die Fragen, ob die Überexpression des Gens *ubiC* zu funktionsfähigen Proteinen führt und in welchen intrazellulären Konzentrationen die Chorismat-Pyruvat-Lyase exprimiert wird. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Für den Satzprozess mit der Kohlenstoffquelle Citrat konnte festgestellt werden, dass es durch die Induktion zur Bildung des Nebenproduktes Malat kam. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Induktion zu einer Änderung des Metabolismus kommt, und dass diese möglicherweise durch die Überexpression des Gens *ubiC*, das für die Chorismat-Pyruvat-Lyase kodiert, ausgelöst wird.

Außerdem wurden die integralen *p*HBA-Erträge bestimmt. Diese zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Der höchste *p*HBA-Ertrag ( $9,05 \text{ mmol}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$ , Substrat Glucose) ist mit Erträgen aus Satzprozessen mit *Saccharomyces cerevisiae* ( $9,13 \text{ mmol}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$ , Substrat Glucose, Krömer *et al.*, 2013) und *Klebsiella pneumonia* ( $10,15 \text{ mmol}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$ , Substrat Glucose, Müller *et al.*, 1995) vergleichbar. Im Satzprozess mit Glycerin verringerte sich der *p*HBA-Ertrag im Vergleich zum Satzprozess mit Glucose um 19 %. Verglichen mit dem Glucose-Katabolismus werden bei der Umsetzung von Glycerin Entner-Doudoroff-, Gluconat- und 2-Ketogluconat-Wege herunterreguliert, der Pentosephosphat-Weg bleibt unverändert und der Glyoxylat-Weg ist anstelle des Zitronensäurezyklus aktiv. Auf diese Weise werden effizient Ausgangsstoffe der Biomassebildung zur Verfügung gestellt (Nikel *et al.*, 2014; Nickel *et al.*, 2015). Diese effiziente Bildung von Biomasse ausgehend von Glycerin spiegelte sich im hohen Biomassertrag von  $0,66 \text{ molC}_X \text{ molC}_S^{-1}$ . Die für die Biomassebildung notwendigen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin werden genau wie *p*HBA über den Shikimat-Weg gebildet. Somit stehen diese Stoffwechselwege in direkter Konkurrenz zur *p*HBA-Bildung. Ein durch die erhöhte Biomassebildung gesteigerter Aminosäurebedarf bietet eine mögliche Erklärung für den im Vergleich zu Glucose geringeren *p*HBA-Ertrag. Eine Ermittlung der Ursachen, weshalb die *p*HBA-Erträge in den Prozessen mit Citrat, Succinat und Malat noch geringer waren, ist anhand der verfügbaren Daten nicht möglich.

Im Rahmen der reaktionstechnischen Analyse wurde gezeigt, dass es für alle Substrate mit Ausnahme von Glycerin zur Bildung von Nebenprodukten kam. Bei der Umsetzung von Glucose wurden die Nebenprodukte Gluconat und 2-Ketogluconat gefunden. Die Bildung dieser beiden Intermediate ist für den Wildtyp-Stamm *P. putida* KT2440 in der Literatur beschrieben (Tlemçani *et al.*, 2008). In den Satzprozessen mit Citrat und Succinat konnte die Bildung des Nebenproduktes Malat festgestellt werden. Im Satzprozess mit Malat wurde die Bildung von Fumarat beobachtet. Für keines dieser

Substrate ist in der Literatur für den Wildtyp-Stamm die Bildung von Nebenprodukten beschrieben. Da es in den Satzprozessen mit Citrat und Succinat zur Bildung von Malat kam und im Satzprozess mit Malat zur Bildung von Fumarat, weist dies darauf hin, dass die Umsetzung von Malat in *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* limitiert ist. Durch die Deletion des Gens *pobA* kommt es zur Akkumulation von *p*HBA, da der Abbau über den Ortho-Weg unterbrochen ist. Damit könnte es zu einem erhöhten Fluss in den Ubichinol-Synthese-Weg über die 4-Hydroxybenzoat-Octaprenyltransferase kommen. Dieser Überschuss an Ubichinol könnte dazu geführt haben, dass Ubichinon-abhängige Reaktionen langsamer ablaufen. Ein Ubichinon-abhängiges Enzym, das Malat umsetzt, ist die Malatchinon-Oxidoreduktase. Die verminderte Umsetzung von Malat zu Oxalacetat durch die limitierte Malatchinon-Oxidoreduktase könnte bei den Substraten Citrat und Succinat zur Akkumulation von Malat geführt haben. Bei Einsatz des Substrats Malat könnte der große Malat-Überschuss zu einer Akkumulation von Fumarat geführt haben, das die vorherige Verbindung im Zitronensäurezyklus darstellt. Für das Substrat Glycerin konnte kein Nebenprodukt identifiziert werden. Auf Grund der langsamen Umsetzung von Glycerin kann vermutet werden, dass keine beziehungsweise nur sehr geringe Mengen an Stoffwechselintermediaten gebildet wurden und deshalb nicht aus der Zelle heraus transportiert werden mussten.

Wurden die Nebenprodukte bei der Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen berücksichtigt, konnten die Bilanzen zu jedem Messzeitpunkt über 97 % geschlossen werden. Dies bedeutet, dass alle relevanten Stoffwechselprodukte mit der verwendeten Analytik erfasst und berücksichtigt wurden. Zu Prozessende kam es bei der Umsetzung von Glycerin zu einer deutlichen Überschätzung der Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen. Dies weist auf Messfehler hin und kann auf eine Drift des Abgassignals während des Prozesses zurückgeführt werden. Diese prägte sich bei Glycerin auf Grund der im Vergleich zu den anderen Satzprozessen längeren Prozesszeit deutlicher aus.

## 6.2 Effekte der gentechnischen Modifikationen auf Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC*

Anhand der Untersuchung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von Glucose, Citrat, Succinat und Malat zur Nebenproduktbildung führt. In der Literatur wird mit Ausnahme von Glucose für den Wildtyp-Stamm *P. putida* KT2440 jedoch keine Nebenproduktbildung beschrieben. Daher lag die Vermutung nahe, dass die gentechnischen Modifikationen die Ursache für die beobachtete Nebenproduktbildung sein könnten.

Durch eine reaktionstechnischen Charakterisierung des Wildtyp-Stammes *P. putida* KT2440 und den anschließenden Vergleich von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* sollten die Auswirkungen der gentechnischen Modifikationen eingeordnet werden. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse dargestellt.

### 6.2.1 Satzprozesse mit *P. putida* KT2440

Die reaktionstechnische Charakterisierung von *P. putida* KT2440 erfolgte entsprechend den vorherigen Untersuchungen mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1 L. Die Bestimmung von Substrat- und Biomassekonzentrationen wurde in regelmäßigen Abständen von 10 min durchgeführt. Während des Übergangs von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase wurde der Reaktor im Abstand von 5 min beprobt. CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Abgas sowie das Gewicht des Reaktors wurde während der kompletten Prozesszeit online aufgezeichnet. Aus den mittels HPLC bestimmten Substratkonzentrationen sowie den photometrisch ermittelten Biomassekonzentrationen wurden mit einer sigmoidalen Funktion (Richards-Funktion, Gleichungen 19 und 20) Substrat- und Biomassekonzentrationen während der gesamten Prozesszeit abgeschätzt. Anhand der Ausgleichsfunktionen wurden die spezifischen Wachstums- und Substrataufnahmeraten bestimmt (Kapitel 4.10). Mit der Ausgleichsfunktion der Biomassekonzentration und den CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgasmessungen wurden die spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten ermittelt. Des Weiteren wurde der Respirationsquotient bestimmt. Unter Berücksichtigung von Substrat, Biomasse, CO<sub>2</sub> beziehungsweise O<sub>2</sub> wurden außerdem die Wiederfindungen für Kohlenstoff und Elektronen über die Prozesszeit sowie die integralen Biomasse- und CO<sub>2</sub>-Erträge zu Prozessende bestimmt. Bei allen im 1 L-Rührkesselreaktor durchgeführten Satzprozessen wurde sowohl für die Vorkulturherstellung als auch für die Satzprozesse im Rührkesselreaktor das definierte M9-Medium mit der jeweils untersuchten Kohlenstoffquelle verwendet, sodass zu Prozessbeginn Verzögerungsphasen vermieden werden konnten. Die Verläufe

aller in den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440 gemessenen Prozessgrößen sind – vergleichend für die fünf untersuchten Substrate – in Abbildung 31 dargestellt.

Tabelle 11 Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit *P. putida* KT2440 wt. Die Tabelle zeigt die maximalen Biomasse-, und CO<sub>2</sub>-Erträge ( $Y_{XS}$  und  $Y_{CO_2,S}$ ), die maximalen spezifischen Substrataufnahme-, Wachstums-, CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten ( $q_{S,max}$ ,  $\mu_{max}$ ,  $q_{CO_2,max}$  und  $q_{O_2,max}$ ) sowie die Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen in der stationären Phase.

	Glucose	Glycerin	Citrat	Succinat	Malat
$Y_{XS}$ , molC <sub>X</sub> molC <sub>S</sub> <sup>-1</sup>	0,59	0,86	0,45	0,49	0,55
$Y_{CO_2,S}$ , molC <sub>CO<sub>2</sub></sub> molC <sub>S</sub> <sup>-1</sup>	0,42	0,32	0,53	0,57	0,51
$-q_{S,max}$ , mmol (g <sub>X</sub> h) <sup>-1</sup>	6,43	3,52	9,24	11,68	9,86
$\mu_{max}$ , h <sup>-1</sup>	0,57	0,25	0,71	0,67	0,57
$q_{CO_2,max}$ , mmol (g <sub>X</sub> h) <sup>-1</sup>	12,94	4,65	25,67	18,02	17,64
$-q_{O_2,max}$ , mmol (g <sub>X</sub> h) <sup>-1</sup>	22,21	7,50	15,90	19,58	9,57
Kohlenstoffbilanz, %	101	114	100	100	101
Elektronenbilanz, %	100	115	100	100	99

Die in Abbildung 31 A-E gezeigten Substratkonzentrationen nahmen mit der Prozesszeit exponentiell ab, die Biomassekonzentrationen nahmen exponentiell zu (Abbildung 31 F-J). Dabei variierte die Prozesszeit bis zum Erreichen der stationären Phase in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle zwischen 3,8 h (Malat) und 13 h (Glycerin). Mit Ausnahme des Satzprozesses mit Glucose korrelierten die Zeitpunkte des vollständigen Substratumsatzes mit dem Übergang der Zellen in die stationäre Wachstumsphase. Im Satzprozess mit Glucose konnte nach dem vollständigen Umsatz von Glucose nach 5,9 h noch bis zu einer Prozesszeit von 6,9 h eine Zunahme der Biomassekonzentration beobachtet werden. In den stationären Phasen wurden maximale Biomassekonzentrationen zwischen 2,2 g L<sup>-1</sup> (Citrat) und 4,7 g L<sup>-1</sup> (Glycerin) bestimmt. Entsprechend variierten die integralen Biomasserträge, welche zwischen 0,45 molC<sub>X</sub> molC<sub>Citrat</sub><sup>-1</sup> und 0,86 molC<sub>X</sub> molC<sub>Glycerin</sub><sup>-1</sup> lagen. Die Biomasserträge der übrigen Substrate sind in Tabelle 11 angegeben.

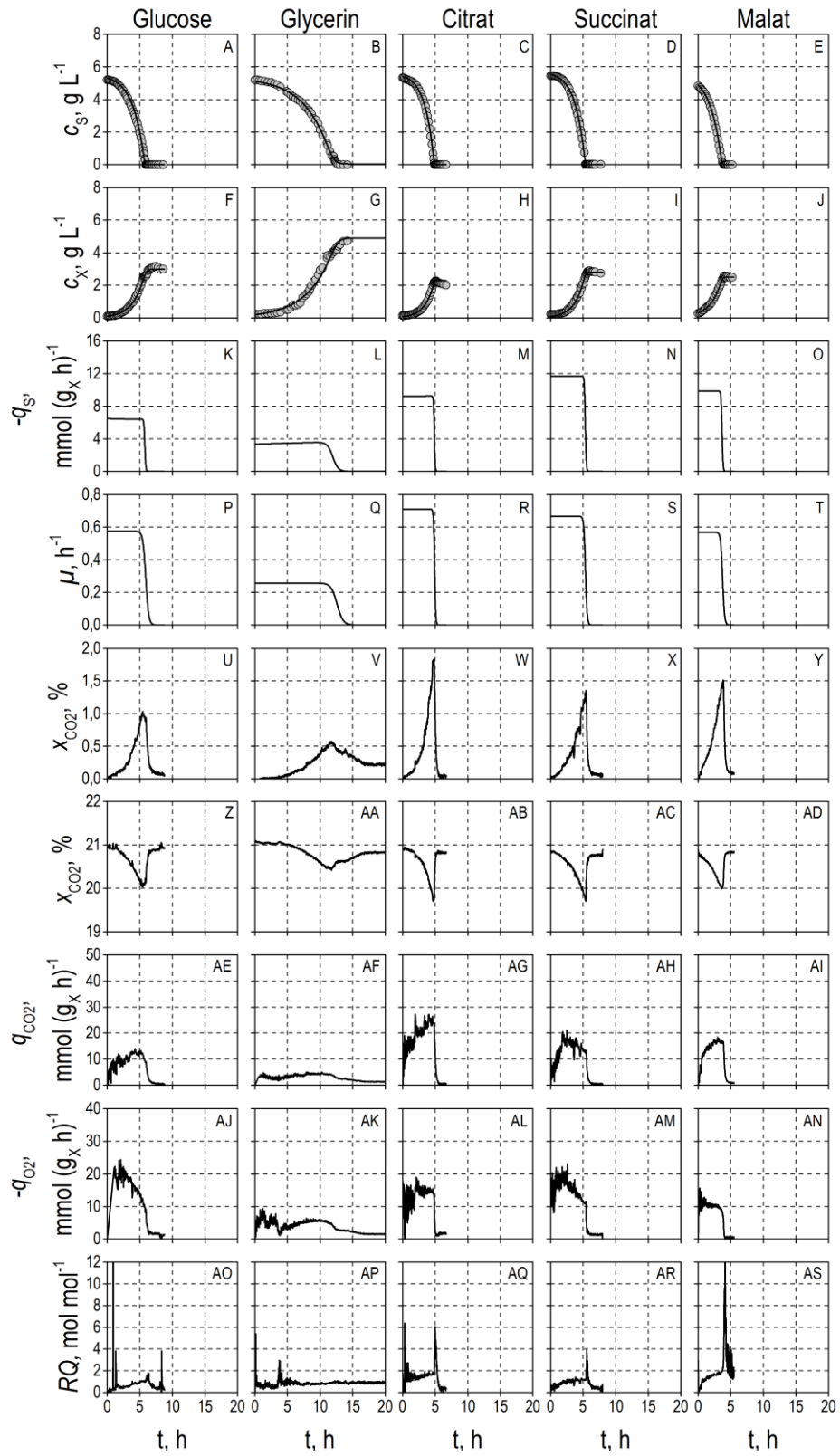
Anhand der Ausgleichsfunktionen für Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen wurden nach Gleichung 17 die spezifischen Substrataufnahme- und Wachstumsraten berechnet (Abbildung 31 K-T). Diese waren während der exponentiellen Wachstumsphase konstant und fielen mit Erreichen der

stationären Phase auf Null ab. Die maximalen spezifischen Substrataufnahmeraten lagen zwischen  $3,52 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Glycerin) und  $11,68 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Succinat) und die Wachstumsraten zwischen  $0,25 \text{ h}^{-1}$  (Glycerin) und  $0,71 \text{ h}^{-1}$  (Citrat). In Tabelle 11 sind spezifische Substrataufnahme- und Wachstumsraten der übrigen Substrate zu finden.

Mit der Inokulation stieg der Kohlenstoffdioxidanteil im Abgasstrom während der exponentiellen Wachstumsphase an und fiel mit Erreichen der stationären Phase wieder ab (Abbildung 31 U-Y). Dabei konnte beobachtet werden, dass das  $\text{CO}_2$ -Messsignal den Wert zu Prozessbeginn nicht mehr erreichte. Diese Drift des Abgasmesssignals ist im Satzprozess mit Glycerin am deutlichsten ausgeprägt. In allen Satzprozessen zeigten die  $\text{CO}_2$ -Verläufe ein Maximum. Die  $\text{O}_2$ -Abgassignale verliefen zu den  $\text{CO}_2$ -Messwerten komplementär (Abbildung 30 Z-AD). Auch hier konnte eine Drift des Messsignals während der Prozesszeit beobachtet werden. Anhand der  $\text{CO}_2$ -Abgasmessung wurden die integralen  $\text{CO}_2$ -Erträge für jedes Substrat zu Prozessende bestimmt. Diese lagen zwischen  $0,37 \text{ molC}_{\text{CO}_2} \text{ molC}_S^{-1}$  (Glucose) und  $0,57 \text{ molC}_{\text{CO}_2} \text{ molC}_S^{-1}$  (Malat). Die  $\text{CO}_2$ -Erträge aller übrigen Substrate sind in Tabelle 11 zu finden.

Basierend auf den mit den Ausgleichsfunktionen geschätzten Biomassekonzentrationen und den  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Abgasmessungen wurden die spezifischen  $\text{CO}_2$ -Bildungs- und  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten während der Prozesszeit bestimmt (Abbildung 31 AE-AN). In allen Satzprozessen stiegen die spezifischen  $\text{CO}_2$ -Bildungs- und  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten mit der Inokulation an und fielen zum Zeitpunkt des Übergangs von exponentieller zur stationären Wachstumsphase steil ab. Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigten  $\text{CO}_2$ -Bildungs- und  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten der verschiedenen Substrate unterschiedliche Verläufe. Im Folgenden sind zunächst die Verläufe der  $\text{CO}_2$ -Bildungsraten und dann die Verläufe der  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten beschrieben.

Die Verläufe der  $\text{CO}_2$ -Bildungsraten der Satzprozesse mit Glucose, Citrat und Malat waren ähnlich (Abbildung 31 AE, AG, AI). Ab dem Zeitpunkt der Inokulation stiegen die  $\text{CO}_2$ -Bildungsraten an und erreichten ihre maximalen Werte am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Diese lagen bei  $12,94 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Glucose),  $25,67 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Citrat),  $17,64 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Malat) (Tabelle 11).





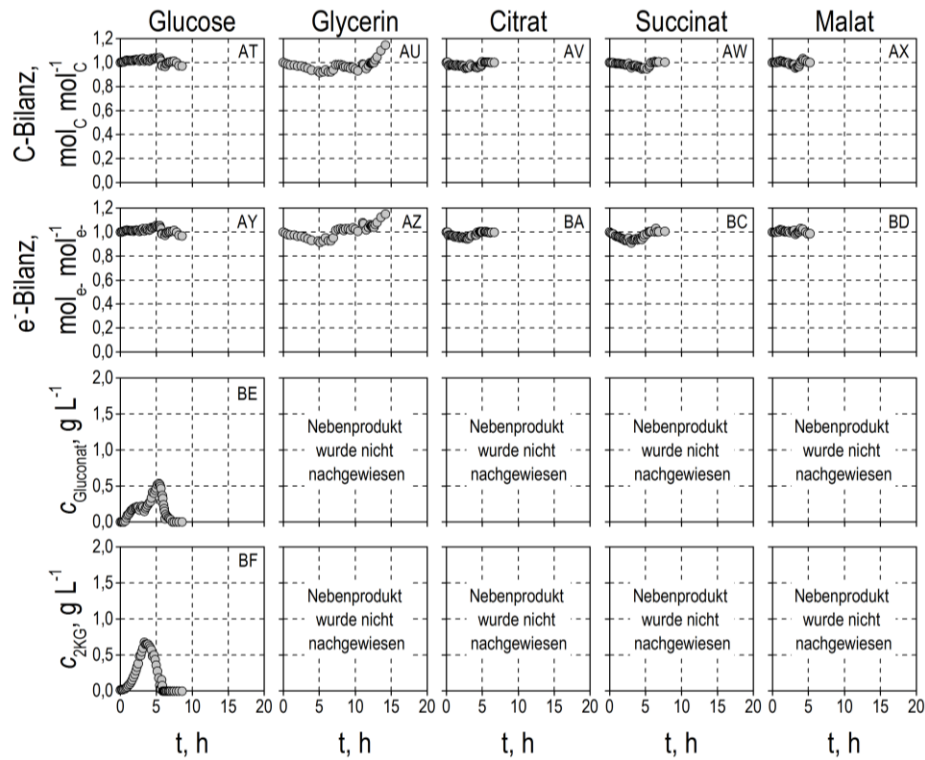


Abbildung 31 Aerobe Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit *P. putida* KT2440.  $c_i$ : Konzentration der Komponente  $i$ ;  $S$ : Substrat;  $X$ : Biomasse;  $q_s$ : Spezifische Substrataufnahmerate;  $\mu$ : Spezifische Wachstumsrate;  $x_i$ : Molanteil der Komponente  $i$  im Abgasstrom;  $RQ$ : Respirationskoeffizient; C-Bilanz: Kohlenstoffbilanz;  $e^-$ -Bilanz: Elektronenbilanz; 2KG: 2-Ketogluconat.

Im Satzprozess mit Glycerin stieg die  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate nach der Inokulation bis zu einer Prozesszeit von 1 h auf  $4,12 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  an, dann konnte eine Abnahme der  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate auf  $2,12 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  zu einer Prozesszeit von 3 h beobachtet werden. Im Folgenden erhöhte sich die  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate bis zum Ende der exponentiellen Phase wieder auf  $4,10 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ . Im Satzprozess mit Succinat erreichte die  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate bei einer Prozesszeit von 1,8 h ein Maximum von  $18,02 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Abbildung 31 AH). Bis zum Ende der exponentiellen Phase verminderte sich die  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate auf  $12,76 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ .

Die Verläufe der  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten ähnelten sich in den Satzprozessen mit Glucose und Succinat (Abbildung 31 AJ, AM). In beiden Fällen stiegen die  $\text{O}_2$ -Aufnahmeraten nach der Inokulation auf Maxima von  $22,21 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  ( $t = 2 \text{ h}$ , Glucose) und  $19,58 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  ( $t = 2,5 \text{ h}$ , Succinat) an (Tabelle 11) und fielen dann bis zum Ende der exponentiellen Phasen nach 5,6 h (Glucose) und 5,3 h (Succinat) auf  $10,37 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Glucose) und  $10,82 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  (Succinat) ab. In den

Satzprozessen mit Citrat und Malat ähnelten sich Verläufe der  $O_2$ -Aufnahmeraten ebenfalls (Abbildung 31 AL, AN). Hier wurden nach einem anfänglichen Anstieg konstante  $O_2$ -Aufnahmeraten erreicht, die erst mit dem Ende der exponentiellen Phasen wieder abfielen. Während der exponentiellen Phasen lagen die  $O_2$ -Aufnahmeraten bei  $18,90 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  (Citrat) und  $9,57 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  (Malat). Im Satzprozess mit Glycerin stieg die  $O_2$ -Aufnahmerate innerhalb von 1 h auf ein Maximum von  $7,5 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  an (Abbildung 31 AK, Tabelle 11). Bis zu einer Prozesszeit von 3,7 h verminderte sich die  $O_2$ -Aufnahmerate auf  $3,73 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  und stieg dann bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase wieder auf  $5,67 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  an.

Aus dem Verhältnis von  $q_{CO_2}$  und  $q_{O_2}$  wurden die Respirationskoeffizienten ( $RQ$ ) bestimmt (Abbildung 31 AO-AS). Mit Glycerin, Citrat, Succinat und Malat wurden während der exponentiellen Phase konstante Respirationskoeffizienten ( $RQ$ ) beobachtet. Diese lagen mit Glycerin bei  $0,95 \text{ mol mol}^{-1}$ , mit Citrat bei  $1,63 \text{ mol mol}^{-1}$ , mit Succinat  $1,11 \text{ mol mol}^{-1}$  und mit Malat bei  $1,66 \text{ mol mol}^{-1}$ . Mit Glucose stieg der  $RQ$  während der exponentiellen Phase von  $0,40 \text{ mol mol}^{-1}$  auf  $1,42 \text{ mol mol}^{-1}$  an.

### 6.2.2 Nebenproduktbildung

Da für den *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  die Bildung von Nebenprodukten beobachtet wurde, die für den Wildtyp-Stamm in der Literatur nicht beschrieben sind, wurde die Nebenproduktbildung des Wildtyp-Stammes ebenfalls untersucht. Dabei wurde auf gleiche Weise vorgegangen wie bereits für *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  beschrieben (Kapitel 6.1.1). Kohlenstoff und Elektronen wurden über die Prozesslaufzeit bilanziert und als Indikator für mögliche Nebenproduktbildungen verwendet. Während der exponentiellen Phasen in den Satzprozessen mit Glycerin, Citrat, Succinat und Malat sanken die Wiederfindungen von Kohlenstoff und Elektronen auf bis zu 95 % (Abbildung 31 AU-AX und AZ-BD). Daher wurden, wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, HPLC-Chromatogramme bezüglich der sich mit der Zeit vergrößernden Signalstärken analysiert. Hierbei konnten keine sich über die Prozesszeit deutlich ändernden Signalstärken und somit auch keine Nebenprodukte identifiziert werden. Für Glucose konnte die Kohlenstoff- und Elektronenbilanz unter zusätzlicher Berücksichtigung der Nebenprodukte Gluconat und 2-Ketogluconat geschlossen werden (Abbildung 31 AT -BD). Die zu Prozessende für die Umsetzung von Glycerin auffälligen Überschätzungen der Wiederfindungen von Kohlenstoff und Elektronen auf 114 % und 115 % (Tabelle 11) sind auf die Drift der  $CO_2$ - und  $O_2$ -Abgasmesssignale (Abbildung 31 AA, AF) während des Satzprozesses zurückzuführen.

### 6.2.3 Diskussion

Das Ziel der oben beschriebenen reaktionstechnischen Analysen der Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 war es, die Effekte der gentechnischen Modifikationen des Stammes *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  besser einordnen zu können.

Im Rahmen der reaktionstechnischen Charakterisierung der Satzprozess mit *P. putida* KT2440 wurden die charakteristischen Prozessgrößen  $q_s$ ,  $\mu$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $RQ$ ,  $Y_{X/S}$  und  $Y_{CO_2/X}$  bestimmt. Diese zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Substraten. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist nur für wenige dieser Größen möglich, da vollständige reaktionstechnische Analysen von Satzprozessen in Rührkesselreaktoren in der Literatur für *P. putida* KT2440 nicht verfügbar sind. Eine Ausnahme stellten die von Tlemçani *et al.* (2008) und von van Duuren *et al.* (2013) publizierten Satzprozesse mit Glucose dar, die sich jedoch deutlich voneinander unterscheiden – von van Duuren *et al.* (2013) wurde als spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max} = 0,59 \text{ h}^{-1}$  ermittelt, während Tlemçani *et al.* (2008)  $\mu_{max} = 0,71 \text{ h}^{-1}$  bestimmten. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte spezifische Wachstumsrate liegt bei  $0,57 \text{ h}^{-1}$  und weicht somit um 3,3 % von der von van Duuren *et al.* (2013) bestimmten Wachstumsrate ab. Für Glycerin weicht  $\mu_{max}$  mit  $0,25 \text{ h}^{-1}$  um 12 % von dem von Poblete-Castro *et al.* (2014) bestimmten  $\mu_{max}$  von  $0,22 \text{ h}^{-1}$  ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Umsetzung von Citrat eine maximale spezifische Wachstumsrate von  $0,71 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die von Follonier *et al.* (2011) für die Umsetzung von Citrat bestimmte Wachstumsrate ( $\mu_{max} = 0,54 \text{ h}^{-1}$ ) wurde im Schüttelkolben ermittelt und war – vermutlich aufgrund des geringeren Leistungseintrags – im Vergleich zu der in dieser Arbeit bestimmten Wachstumsrate um 20 % geringer. Für Succinat stimmt die ermittelte maximale Wachstumsrate von  $0,67 \text{ h}^{-1}$  gut mit der von Nikel *et al.* (2014) bestimmten Wachstumsrate von  $0,72 \text{ h}^{-1}$  überein. Für die Umsetzung von Malat konnten keine Literaturwerte zum Vergleich gefunden werden. Dieser Vergleich zeigt, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Wachstumsraten im erwarteten Bereich liegen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob *P. putida* KT2440 ebenso wie *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  Nebenprodukte bildet. Dabei wurde nur mit Glucose die Bildung der Nebenprodukte Gluconat und 2-Ketogluconat beobachtet. Dies ist in der Literatur beschrieben (Tlemçani *et al.*, 2008) und die Gluconat- und 2-Ketogluconat-Konzentrationsverläufe entsprachen den von Tlemçani *et al.* (2008) beschriebenen Verläufen. Ebenso stimmen die Respirationskoeffizienten in den Prozessphasen der Umsetzung von Glucose, Gluconat und 2-Ketogluconat mit den von Tlemçani *et al.* (2008) bestimmten Werten gut überein. Bei den übrigen Substraten konnte in Übereinstimmung mit der Literatur keine Nebenproduktbildung festgestellt werden. Dies konnte anhand der Wiederfindung von

Kohlenstoff und Elektronen bestätigt werden, die zu jedem Messpunkt über 95 % lagen. Dies zeigt, dass alle relevanten Stoffwechselprodukte mit der verwendeten Analytik erfasst und berücksichtigt wurden. Die Überschätzung der Wiederfindungen mit Glycerin nach Erreichen der stationären Phase ist auf eine Drift der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgassignale zurückzuführen, welche sich bei Glycerin auf Grund der längeren Prozesszeiten deutlicher ausprägten als bei den übrigen Substraten.

### 6.3 Vergleich von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC*

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der reaktionstechnischen Charakterisierungen von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* und *P. putida* KT2440 in aeroben Satzverfahren einander gegenübergestellt, um so die Auswirkungen der gentechnischen Modifikationen einordnen zu können. Dazu wurden die Verläufe aller zur reaktionstechnischen Analyse gemessenen Prozessgrößen – vergleichend für die fünf untersuchten Substrate sowie die beiden untersuchten Stämme *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* – in Abbildung 32 graphisch dargestellt.

#### Glucose

Wie die vergleichende Darstellung der Satzprozesse mit Glucose zeigt, wurden mit *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* sehr ähnliche exponentielle Substrat- und Biomassekonzentrationsverläufe gemessen (Abbildung 32 A, F). Die in der stationären Phase erreichten maximalen Biomassekonzentrationen unterschieden sich ebenso wie die daraus bestimmten Biomasserträge um nur 5 % (Tabelle 12). Der Vergleich der spezifischen Substrataufnahme- und Wachstumsraten zeigte, dass *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* eine um 33 % höhere spezifische Substrataufnahmerate erreichte als der Wildtyp-Stamm, während die spezifische Wachstumsrate von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* um 17 % geringer war als die des Wildtyp-Stammes (Abbildung 32 P, U, Tabelle 12). Der Verläufe von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Abgas zeigten im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* zwei Maxima, während im Satzprozess mit *P. putida* KT2440 nur ein Maximum beobachtet wurde (Abbildung 32 AE, AJ). Die im Satzprozess mit dem Wildtyp-Stamm bestimmte maximale spezifische CO<sub>2</sub>-Bildungsrate war um 80 % höher als die der Mutante (Abbildung 32 AO, Tabelle 12). Die maximale spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahmerate des Wildtyp-Stammes war um 120 % größer als die der Mutante (Abbildung 32 AT, Tabelle 12). Die Unterschiede von  $q_{CO_2}$  und  $q_{O_2}$  spiegeln sich in den Respirationskoeffizienten ( $RQ$ ) wider (Abbildung 32 AY). Im Satzprozess mit dem Wildtyp-Stamm wurden drei unterschiedliche  $RQ$  (0,4 mol mol<sup>-1</sup>, 1,0 mol mol<sup>-1</sup> und 1,4 mol mol<sup>-1</sup>) bestimmt, während sich im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* zwei verschiedene  $RQ$ s (1,0 mol mol<sup>-1</sup> und 1,6 mol mol<sup>-1</sup>) einstellten. Der Vergleich der Konzentrationsverläufe der Intermediate Gluconat und 2-Ketogluconat (2KG) zwischen den beiden Stämmen zeigte im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* eine gleichzeitige Umsetzung von Glucose und Gluconat und eine darauffolgende Metabolisierung von 2KG, während es bei dem Wildtyp-Stamm zu einer Co-Metabolisierung von 2KG und Glucose kommt und erst nach deren vollständiger Umsetzung eine Abnahme der Gluconat-Konzentration beobachtet wurde (Abbildung 32 BN, BO). Dabei wurde mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm eine um

den Faktor 2,4 höhere 2KG-Konzentration und eine um den Faktor 2 höhere Gluconatkonzentration gemessen.

Tabelle 12 Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* (mut) und *P. putida* KT2440 (wt). Die Tabelle zeigt die maximalen Biomasse-, *p*HBA-, und CO<sub>2</sub>-Erträge ( $Y_{XS}$ ,  $Y_{pHBA,S}$  und  $Y_{CO_2,S}$ ), maximale spezifische Substrataufnahme-, Wachstums-, *p*HBA-Bildungs-, CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmerate ( $q_{S,max}$ ,  $\mu_{max}$ ,  $q_{pHBA,max}$ ,  $q_{CO_2,max}$  und  $q_{O_2,max}$ ) sowie die Wiederfindung von Kohlenstoff und Elektronen in der stationären Phase.

	Glucose		Glycerin		Citrat		Succinat		Malat	
	mut	wt	mut	wt	mut	wt	mut	wt	mut	wt
$Y_{XS}$ , molC <sub>X</sub> molC <sub>S</sub> <sup>-1</sup>	0,56	0,59	0,66	0,86	0,44	0,45	0,64	0,49	0,50	0,55
$Y_{pHBA,S}$ , mmolC <sub>pHBA</sub> molC <sub>S</sub> <sup>-1</sup>	9,05	-	7,30	-	5,84	-	6,06	-	7,59	-
$Y_{CO_2,S}$ , molC <sub>CO2</sub> molC <sub>S</sub> <sup>-1</sup>	0,37	0,42	0,48	0,32	0,56	0,53	0,41	0,57	0,57	0,51
$-q_{S,max}$ , mmol (gx h) <sup>-1</sup>	8,55	6,43	3,53	3,52	8,38	9,24	8,93	11,68	10,07	9,86
$\mu_{max}$ , h <sup>-1</sup>	0,48	0,57	0,19	0,25	0,65	0,71	0,61	0,67	0,63	0,57
$q_{pHBA,max}$ , mmol (gx h) <sup>-1</sup>	0,05	-	0,01	-	0,05	-	0,03	-	0,05	-
$q_{CO_2,max}$ , mmol (gx h) <sup>-1</sup>	6,90	12,94	12,11	4,65	42,56	25,67	13,43	18,02	19,82	17,64
$-q_{O_2,max}$ , mmol (gx h) <sup>-1</sup>	10,13	22,21	21,90	7,50	21,16	15,90	10,96	19,58	13,62	9,57
Kohlenstoffbilanz, %	99	101	102	114	100	100	100	100	100	101
Elektronenbilanz, %	100	100	107	115	100	100	98	100	100	99

### Glycerin

Der Vergleich der Glycerin-Umsetzung zwischen Wildtyp-Stamm und Mutante zeigte eine um 30 % kürzere Prozesszeit für den Wildtyp-Stamm, der im Vergleich zur Mutante auch eine um 34 % höhere maximale Biomassekonzentration erreichte (Abbildung 32 B, G). Obwohl für beide Stämme sehr ähnliche Substrataufnahmeraten bestimmt wurden, war die maximale spezifische Wachstumsrate des Wildtyp-Stammes um 32 % höher als die der Mutante (Abbildung 32 R, W, Tabelle 12). Die Verläufe von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> waren bis auf die Verschiebung der maximalen Konzentrationen gut vergleichbar (Abbildung 32 AF, AK). Die maximalen spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten waren im Satzprozess mit der Mutante vor allem zu Prozessbeginn deutlich größer (Abbildung 32 AP, AU, Tabelle 12). Die für beide Prozesse bestimmten *RQ* waren jedoch während der exponentiellen Phasen

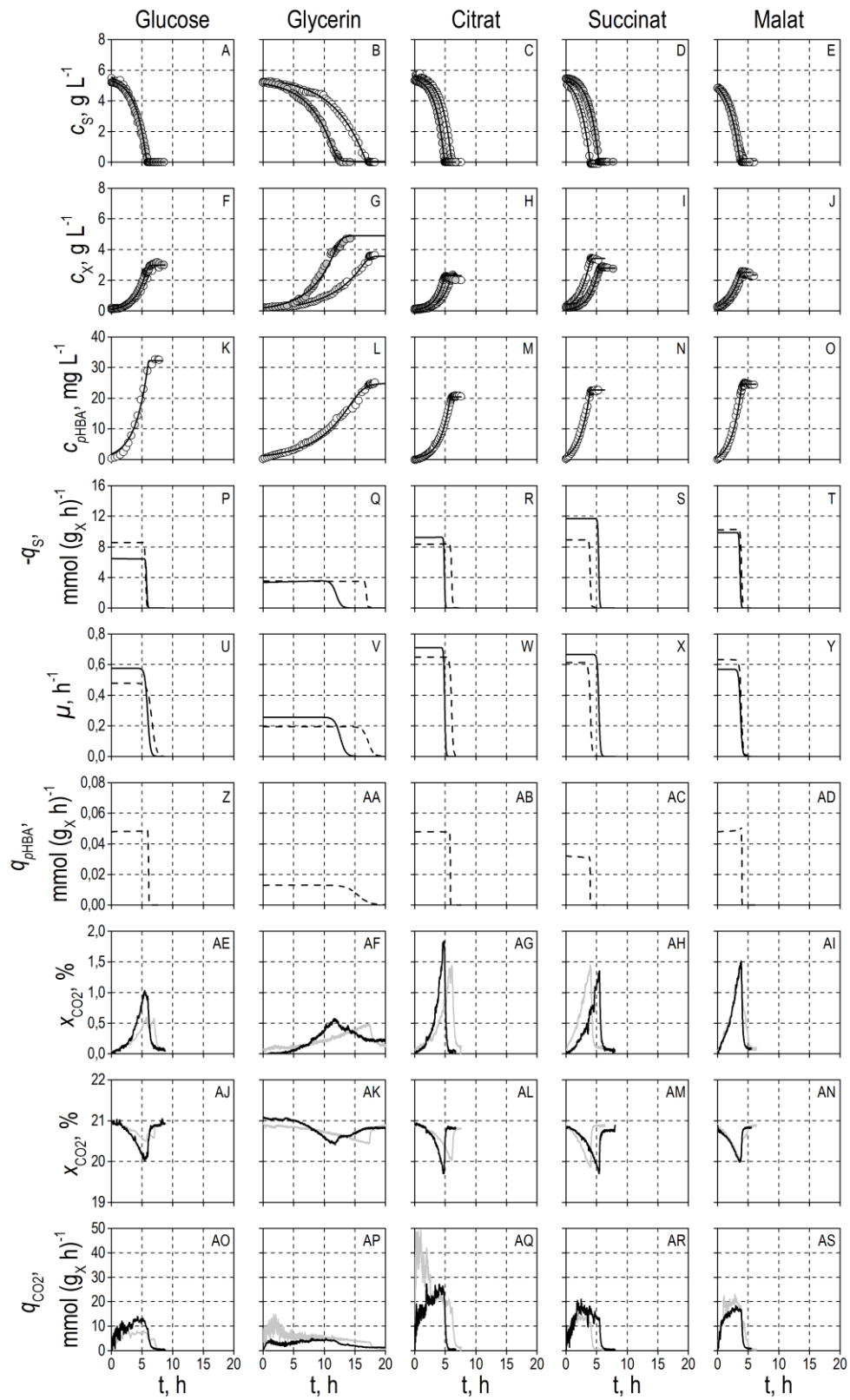
nahezu identisch (Abbildung 32 AZ). Für beide Stämme konnte keine Nebenproduktbildung nachgewiesen werden.

### Citrat

Im Satzprozess mit Citrat wurden für den Wildtyp-Stamm und die Mutante sehr ähnliche Verläufe der Citrat- und Biomassekonzentrationen festgestellt (Abbildung 32 C, H). Die maximalen Biomassekonzentrationen waren in beiden Fällen identisch und wurden nach 5,0 h und 6,3 h erreicht (Abbildung 32 H). Die daraus bestimmten Biomasseerträge unterschieden sich nur um 2 % (Tabelle 12). Die spezifischen Substrataufnahme- und Wachstumsraten des Wildtyp-Stammes waren um 10 % beziehungsweise 9 % größer (Abbildung 32 R, W, Tabelle 12). Der Vergleich der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgassignale zeigte zwei Maxima in den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC*, die für den Wildtyp-Stamm nicht beobachtet wurden (Abbildung 32 AG, AL). Obwohl zwischen den spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungsraten bis zu einer Prozesszeit von 2,4 h deutliche Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 32 AQ), waren die Verläufe der *RQ*s während der exponentiellen Phase gut vergleichbar (Abbildung 32 BA BA). Im Satzprozess mit *P. putida* KT2440 konnte kein Nebenprodukt nachgewiesen werden. Im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* wurde das Nebenprodukt Malat nachgewiesen (Abbildung 32 BP).

### Succinat

Der Vergleich der Satzprozesse mit Succinat zwischen Wildtyp-Stamm und Mutante zeigte eine um 1,5 h kürzere Prozesszeit für die Mutante (Abbildung 32 D). Die in dieser Zeit im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* erreichte maximale Biomassekonzentration überstieg die des Wildtyp-Stammes um den Faktor 1,2 (Abbildung 32 I). Die bestimmten spezifischen Substrataufnahme- und Wachstumsraten waren bei dem Wildtyp-Stamm um 31 % und 10 % größer (Abbildung 32 S, X, Tabelle 12). Mit Ausnahme der zeitlichen Verschiebung zeigt der Vergleich der Abgassignale sehr ähnliche Verläufe (Abbildung 32 AH, AM). Ebenso verliefen  $q_{CO_2}$  und  $q_{O_2}$  ähnlich, wobei sich die maximalen Raten um 21 % und 34 % unterschieden (Abbildung 32 AR, AW, Tabelle 12). Die für beide Stämme bestimmten *RQ* erreichten während der exponentiellen Phase sehr ähnliche Werte (Abbildung 32 BB). In den Satzprozessen mit Succinat wurde nur mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* die Bildung von Malat beobachtet (Abbildung 32 BQ).





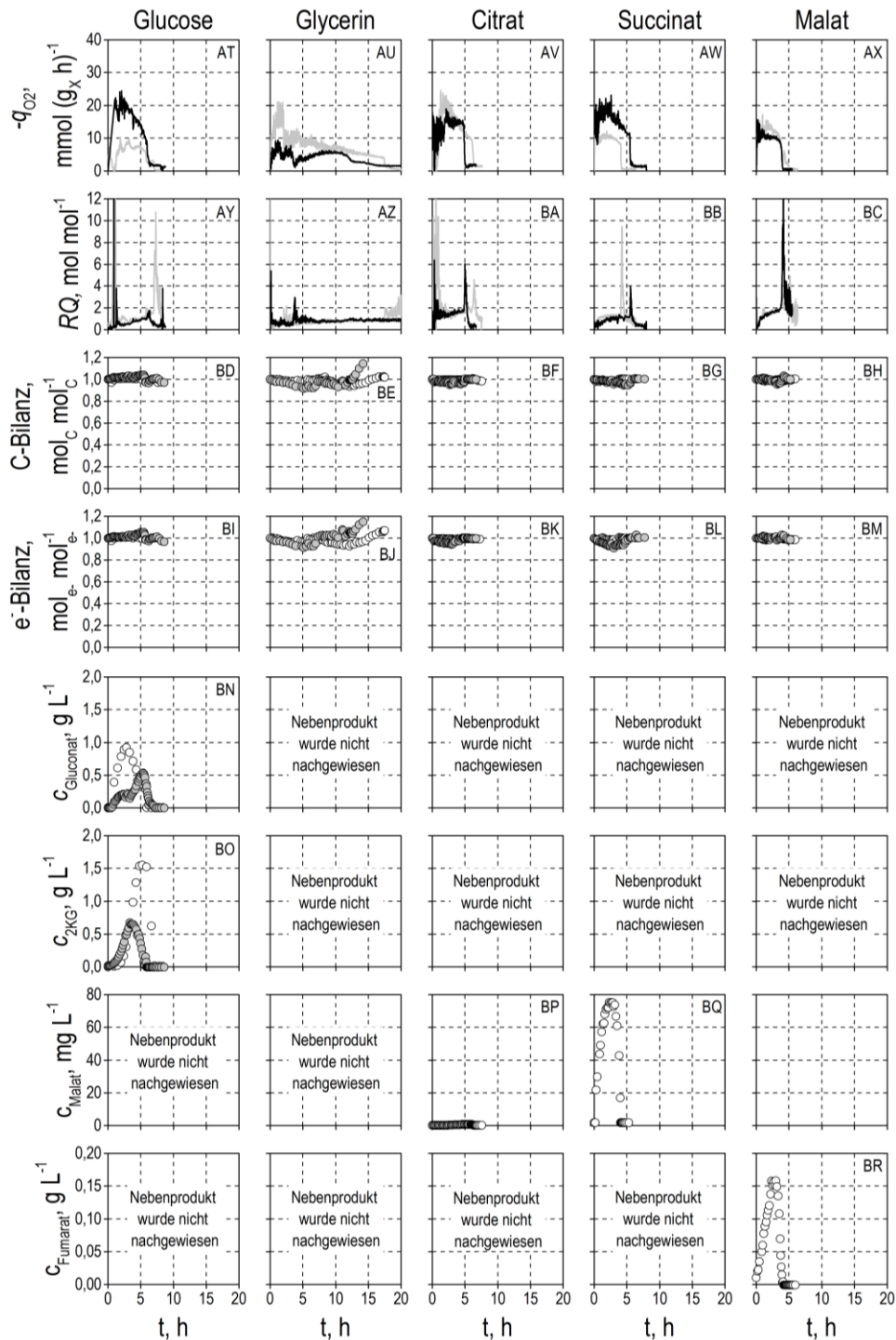


Abbildung 32 Vergleichende Darstellung aerober Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 (wt) und *P. putida* KT2440  $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC (mut). Substrat-, Biomasse-, Gluconat- und 2-Ketogluconat (2KG)- Konzentrationen, Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen: wt ( $\bullet$ ), mut ( $\circ$ ). Spezifische Substrataufnahme- und Wachstumsraten: wt (—), mut (---).  $CO_2$  und  $O_2$  Abgassignal, spezifische  $CO_2$ -Bildungs- und  $O_2$ -Aufnahmeraten, Respirationskoeffizient: wt (—), mut (—). Abbildungen ohne Buchstabencode: Die entsprechenden Nebenprodukte konnten in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden.

## Malat

In den Satzprozessen mit Malat wurden mit dem Wildtyp-Stamm und der Mutante identische Prozesszeiten bestimmt. Die während der Prozesszeit gebildete Biomassekonzentration beziehungsweise die daraus bestimmten Biomasserträge unterschieden sich für den Wildtyp-Stamm und Mutante um nur 7 % beziehungsweise 10 % (Abbildung 32 E, J, Tabelle 12). Die maximalen spezifischen Substrataufnahmeraten variierten um 3 % (Abbildung 32 T, Tabelle 12) und die spezifische Wachstumsraten um 9 % (Abbildung 32 Y, Tabelle 12). Der Vergleich der Abgassignale zeigte für den Satzprozess mit der Mutante ein etwas langsames Abfallen beziehungsweise Ansteigen von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> im Abgas als für den Wildtyp-Stamm (Abbildung 32 AI, AN). Bis auf diesen Unterschied waren die Verläufe sehr ähnlich. Die spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungsraten, die O<sub>2</sub>-Aufnahmerate und die *RQ* waren fast identisch (Abbildung 32 AS, AX, BC, Tabelle 12). Die Bildung des Nebenproduktes Fumarat wurde nur im Satzprozess mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* beobachtet (Abbildung 32 BR).

### 6.3.1 Diskussion

Ziel des Vergleiches von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* war es, die Auswirkungen der gentechnischen Modifikation – die Deletion des Gens *pobA* sowie die Überexpression des Gens *ubiC* – einordnen zu können.

Die Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* zeigten für Glucose, Citrat, Succinat und Malat nahezu identische Verläufe für Substrat- und Biomassekonzentrationen. Ebenso waren die aus den spezifischen CO<sub>2</sub>-Bildungs- und O<sub>2</sub>-Aufnahmeraten bestimmten *RQ*s sehr ähnlich.  $\mu_{max}$  und  $q_{S,max}$  unterschieden sich um bis zu 16 % beziehungsweise 23 %. Dies zeigt, dass die Deletion von *pobA* und/oder die Überexpression von *ubiC* das Wachstum von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* ausgehend von Glucose, Citrat, Succinat und Malat nur geringfügig beeinflussten. Es wurden jedoch wesentliche Unterschiede bezüglich der Nebenproduktbildung festgestellt.

Im Satzprozess mit Glucose unterschieden sich die Gluconat- und 2-Ketogluconatkonzentrationen zwischen den Stämmen. Mit der Mutante wurden deutlich höhere Gluconat- und 2-Ketogluconatkonzentrationen bestimmt. Außerdem unterschied sich die Reihenfolge, in der die Nebenprodukte Gluconat und 2KG von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* gebildet und wieder verstoffwechselt wurden. Die Bildung von Gluconat und 2-Ketogluconat (2KG) verläuft über die Glucose-Dehydrogenase, die die Umsetzung von Glucose zu Gluconat katalysiert. Über die

Gluconat-Dehydrogenase wird die Umsetzung von Gluconat zu 2KG katalysiert, die mit der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol einhergeht (Ebert *et al.*, 2011). Durch einen Ubichinol-Überschuss könnte es demnach zu einer Akkumulation von Gluconat und 2KG kommen.

Bei der Umsetzung der drei Carbonsäuren (Citrat, Succinat und Malat) mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  kam es zur Bildung der Nebenprodukte Malat (Substrate: Citrat und Succinat) und Fumarat (Substrat: Malat), die mit *P. putida* KT2440 nicht beobachtet wurden. Dies deutet auf eine limitierte Malatumsetzung, wahrscheinlich im Zitronensäurezyklus, hin. Bereits in Kapitel 6.1.2 wurde vermutet, dass dies auf die Deletion des Gens *poba* zurückzuführen ist, welche die Umsetzung von *pHBA* über den Ortho-Weg verhindert und so zu einem erhöhten Fluss in den Ubichinol-Syntheseweg führte, was einen Ubichinol-Überschuss zur Folge haben könnte. Dies hätte eine direkte Limitierung des Ubichinon-abhängigen Enzyms Malatchinon-Oxidoreduktase zur Folge. Indirekt – durch eine limitierte Regeneration von NADH über die Atmungskette – wird eine Limitierung des NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzyms Malat-Dehydrogenase verursacht, sodass die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat vermindert ist.

Bei der Umsetzung von Glycerin konnte für keinen der untersuchten Stämme die Bildung von Nebenprodukten festgestellt werden. Daher ist es ohne die Messung intrazellulärer Metabolite nicht möglich abzuschätzen, weshalb mit *P. putida* KT2440 in kürzerer Zeit eine höhere Biomassekonzentration bestimmt wurde als mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ . Wie in Abbildung 16 dargestellt ist, entsteht durch die Phosphorylierung von Glycerin zunächst Glycerin-3-Phosphat. Dieses wird durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase, einem Ubichinon-abhängigen Enzym, zu Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt. Diese Umsetzung würde bei einem Ubichinol-Überschuss langsamer ablaufen. Da für beide Stämme jedoch beinahe identische spezifische Substrataufnahmeraten bestimmt wurden, ist davon auszugehen, dass Glycerin in *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  über einen weiteren Weg umgesetzt wurde, der dazu führte, dass mehr CO<sub>2</sub> und somit weniger Biomasse gebildet wird. Auf Basis der zur Verfügung stehenden Daten bleibt jedoch offen, um welchen Weg es sich handeln könnte.

## 7 Untersuchungen zum externen Elektronentransfer

Mikrobielles Wachstum und Produktbildung benötigen die Verfügbarkeit terminaler Elektronenakzeptoren (Munk, 2008). Elektroden bieten als terminale Elektronenakzeptoren die Möglichkeit, die Erhaltung von Masse und Ladung zu entkoppeln und erlauben damit eine Beeinflussung des Metabolismus. Damit anstelle von Sauerstoff die Elektrode als terminaler Akzeptor verwendet werden kann, muss die Anodenatmung unter anaeroben Bedingungen stattfinden (Kapitel 3.2.1).

Daher wurde zunächst untersucht, wie sich Sauerstoffmangel auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 auswirkt. Im Anschluss wurde *P. putida* KT2440 unter unterschiedlichen Bedingungen in bio-elektrochemischen Systemen (BES) kultiviert, um zu untersuchen, ob *P. putida* KT2440 in der Lage ist, Elektronen über die äußere Zellmembran an eine Elektrode (Anode) abzugeben.

### 7.1 Einfluss anaerober Bedingungen auf das Wachstum von *P. putida* KT2440

*P. putida* KT2440 wurde in Anaerobflaschen in definiertem (M9) und komplexem (LB) Medium kultiviert. Als Kohlenstoffquelle wurde im definierten Medium Glucose verwendet. Nach der Inokulation wurde für *P. putida* KT2440 im definierten Medium kein signifikantes Wachstum beobachtet. Die Biomassekonzentration blieb über die Prozessdauer von 76 h konstant (Abbildung 33 A).

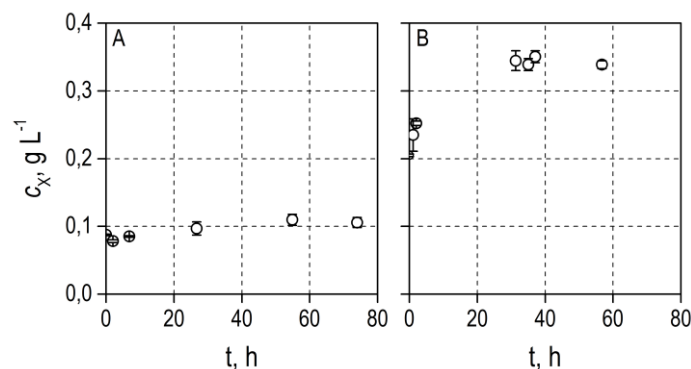


Abbildung 33 Anaerobe Satzprozesse von *P. putida* KT2440 in Anaerobflaschen. (A) Definiertes Medium + Glucose. (B) Komplexmedium (LB-Medium).

Im Komplexmedium wurde innerhalb der ersten 30 h eine Zunahme der Biomassekonzentration von 0,20 g L<sup>-1</sup> auf 0,35 g L<sup>-1</sup> um 75% beobachtet. Im Anschluss daran wurde bis zum Ende des Satzprozesses nach 58 h ebenfalls eine konstante Biomassekonzentration bestimmt.

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wurden nach Prozessende Proben beider Ansätze auf M9-Agarplatten mit Citrat als Kohlenstoffquelle ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Zellen aus beiden Ansätzen bildeten über Nacht Kolonien (Daten nicht gezeigt).

### 7.1.1 Diskussion

In dem Satzprozess mit *P. putida* KT2440 in Anaerobflaschen wurde kein (definiertes Medium) beziehungsweise nur initiales Wachstum (Komplexmedium) beobachtet. Diese Ergebnisse können durch die Verfügbarkeit von terminalen Elektronenakzeptoren erklärt werden. Im definierten Medium sind keine Substanzen enthalten, die als terminale Elektronenakzeptoren dienen können. Da *P. putida* KT2440 auch keine fermentativen Stoffwechselwege besitzt (Schmitz et al. 2015), kam es im definierten Medium zu keinem Wachstum. Im Gegensatz dazu beinhalten komplexe Medienbestandteile wie Hefeextrakt eine Vielzahl von redoxaktiven Stoffen. Diese könnten zu Beginn des Satzprozesses mit Komplexmedium als terminale Elektronenakzeptoren genutzt worden sein. Eine Reduktion dieser Elektronenakzeptoren könnte die beobachtete Zunahme der Biomassekonzentration erklären. Da im verwendeten Reaktionssystem keine Möglichkeit zur Regenerierung reduzierter Substanzen bestand, endete das Wachstum nach Reduktion aller geeigneten Medienkomponenten.

Basierend auf diesen Beobachtungen kann nicht geklärt werden, ob das Wachstum im Komplexmedium über die Aufnahme und intrazelluläre Verstoffwechslung terminaler Elektronenakzeptoren erfolgte oder aber durch eine extrazelluläre Übertragung von Elektronen auf terminale Elektronenakzeptoren.

Nach über 50 h unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen in eine aerobe Umgebung mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle überführt und begannen daraufhin, erneut zu wachsen. Dies zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Steen *et al.* (2013) und Nickel und Lorenzo (2013), dass *P. putida* KT2440 in der Lage ist, über einen langen Zeitraum ohne Sauerstoff zu überleben.

## **7.2 Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440**

Im Komplexmedium konnte unter anaeroben Bedingungen zu Prozessbeginn eine initiale Biomassezunahme festgestellt werden, die vermutlich mit der vollständigen Reduktion der verfügbaren alternativen Elektronenakzeptoren endete. Elektroden in bio-elektrochemischen Systemen bieten die Möglichkeit, alternative externe Elektronenakzeptoren (Mediatoren) zu regenerieren (indirekter externer Elektronentransfer, EET). Diese können dem Medium zugesetzt werden oder vom Mikroorganismus selbst produziert werden. Elektroden können auch selbst als terminale Elektronenakzeptoren dienen, wenn der Mikroorganismus über redoxaktive Proteine in der äußeren Membran (direkter EET) verfügt.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche dienten der Aufklärung des Elektronentransfermechanismus von *P. putida* KT2440. Dazu mussten die folgenden Fragen geklärt werden:

- Handelt es sich um intrazellulären oder extrazellulären Elektronentransfer?
- Handelt es sich um direkten oder indirekten Elektronentransfer?
- Werden künstliche Mediatoren benötigt?

### **7.2.1 Intrazellulärer oder extrazellulärer Elektronentransfer: Untersuchungen im Komplexmedium**

Wie bereits gezeigt werden konnte, kam es unter anaeroben Bedingungen im Komplexmedium zu einer Biomassezunahme von *P. putida* KT2440. Die Ergebnisse ließen jedoch keine Rückschlüsse zu, ob der Transfer auf den terminalen Elektronenakzeptor intrazellulär oder extrazellulär stattfindet. Um dies zu untersuchen, wurde *P. putida* KT2440 in Komplexmedium (LB-Medium) in einem bio-elektrochemischen System kultiviert. Erfolgt der Elektronentransfer intrazellulär durch die Metabolisierung von Verbindungen aus dem Komplexmedium, sollte kein Stromfluss messbar sein und die Biomassekonzentration mit der unter anaeroben Bedingungen erreichten Biomassekonzentration vergleichbar sein. Kommt es hingegen zu extrazellulärem Elektronentransfer, können Elektronen direkt an die Elektrode abgegeben werden (direkter EET) oder reduzierte Mediatoren an der Anode regeneriert werden (indirekter EET) und es würde anodischer Strom gemessen werden. Gleichzeitig sollte durch die Regeneration ein besseres Wachstum erreicht werden.

Das verwendete LB-Medium enthält die Komplexbestandteile Hefeextrakt und Pepton und enthält somit alle in Hefen vorkommenden redoxaktiven Verbindungen und Proteine. Um möglichst alle im

Komplexmedium vorhandenen redoxaktiven Substanzen regenerieren zu können, muss das Anodenpotential auf einen ausreichend hohen Wert eingestellt werden. Cytochrom f besitzt mit +0,168 V (versus Ag/AgCl) das höchste in Zellen vorkommende Redoxpotential (Tabelle 2). Das Potential der Arbeitselektrode wurde auf +0,500 V (versus Ag/AgCl) eingestellt, da so eine Regeneration aller im Komplexmedium vorhandenen redoxaktiven Komponenten möglich sein sollte. Da die redoxaktiven Bestandteile des Hefeextraktes in oxidiert oder reduzierter Form vorliegen können, wurde das Medium für 24 h vor der Inokulation durch das Anlegen eines Potentials oxidiert. Mit der Inokulation konnte zunächst für 0,5 h ein kurzzeitiger Anstieg der Stromstärke von 0,007 mA beobachtet werden (Abbildung 34 C). Dies zeigt, dass die Zeitspanne von 24 h zu kurz war, um eine vollständige Oxidation aller redoxaktiven Komponenten im Hefeextrakt zu erreichen. Im Folgenden fiel die Stromstärke bis zu einer Prozesszeit von 50 h auf 25  $\mu\text{A}$  ab. Erst dann stieg die Stromstärke wieder an und erreichte zu Prozessende 34  $\mu\text{A}$ .

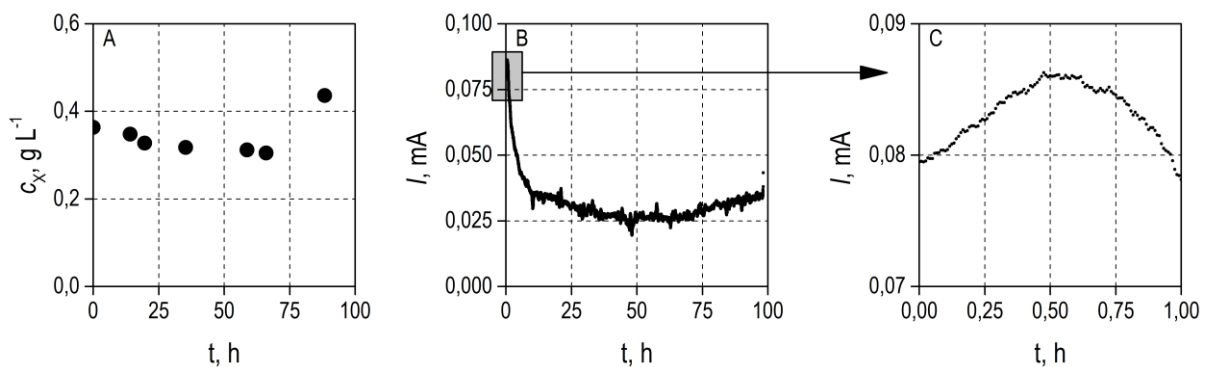


Abbildung 34 Anodenatmung von *P. putida* KT2440 im Satzverfahren in Komplexmedium. (A) Verlauf der Biomassekonzentration  $c_x$  und (B) der Stromstärke  $I$  über den gesamten Satzprozess. (C) Vergrößerung des Verlaufs der Stromstärke  $I$  zu Beginn des Satzprozesses.  $c_x$ : Biomassekonzentration;  $I$ : Stromstärke; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl); Arbeitselektrodenmaterial: Graphitgewebe; Arbeitsvolumen 0,1 L; Reaktor: 0,1 L-Parallelsystem.

Im Vergleich zu den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440 in Anaerobflaschen kam es bei dem Versuch im bio-elektrochemischen System mit der Inokulation zu keiner Biomassezunahme (Abbildung 34 A). Es wurde im Gegenteil innerhalb der ersten 35 h des Satzprozesses eine Abnahme von 0,36  $\text{g L}^{-1}$  auf 0,30  $\text{g L}^{-1}$  beobachtet. In den darauffolgenden 30 h bis zu einer Prozesszeit von 66 h wurde keine Änderung der Biomassekonzentration festgestellt. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Biomassekonzentration von 0,30  $\text{g L}^{-1}$  auf 0,44  $\text{g L}^{-1}$ . Im Vergleich zur Anfangsbiomassekonzentration entspricht dies einer Biomasseerhöhung um 22 %. Während des Satzprozesses wurde die Bildung

eines Biofilms auf der Elektrode beobachtet. In Abbildung 35 ist der Biofilm auf dem Graphitgewebe zu Prozessende dargestellt. Diese zeigt, dass sich die Zellen in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen befinden.

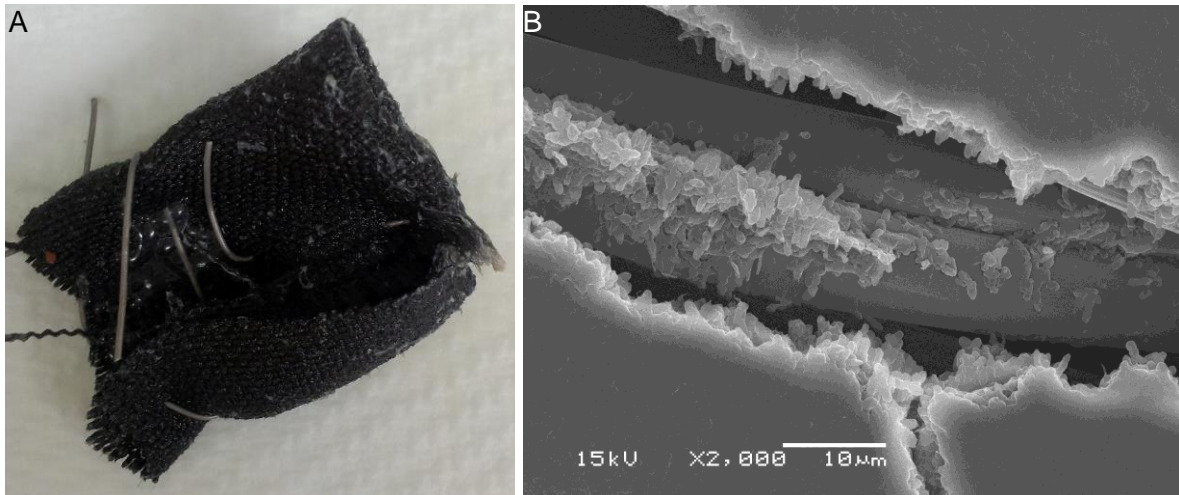


Abbildung 35 Biofilm auf Graphitgewebe, das als Arbeitselektrode in einem Satzprozess mit *P. putida* KT2440 in Komplexmedium verwendet wurde. (A) Foto der Elektrode nach der Anwendung. (B) Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Elektrode.

### Diskussion

Entgegen der Erwartung, dass das Biomassewachstum durch die Regeneration der redoxaktiven Verbindungen im Hefeextrakt verbessert werden könnte, kam es zu einer initialen Abnahme der Biomassekonzentration in der Reaktionslösung. Die Konzentration der suspendierten Zellen verringerte sich, da es zu einer Anlagerung von Zellen auf die Elektrodenoberfläche kam (Abbildung 35). Dieser Teil der Zellen wurde bei der Probenahme und somit bei der Messung der optischen Dichte nicht mehr berücksichtigt.

Nach einem kurzzeitigen Anstieg der Stromstärke mit der Inokulation konnte im Folgenden ein weiteres Abfallen beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Zeitspanne von 24 h zu kurz war, um eine vollständige Oxidation aller redoxaktiven Komponenten im Hefeextrakt zu erreichen. Der kurzzeitige Stromanstieg kann durch einen externen Elektronentransfer von *P. putida* KT2440 erklärt werden. Erst nach einer Prozesszeit von 50 h, in der mikrobielle Reduktionsreaktionen und elektrochemische Oxidationsreaktionen stattfanden, konnte ein Anstieg der Stromstärke beobachtet werden. Dies zeigt, dass extrazellulärer Elektronentransfer stattfindet und dass das eingestellte Anodenpotential die Regeneration redoxaktiver Verbindungen ermöglicht.



Anhand dieser Ergebnisse kann nicht festgestellt werden, ob Elektronen über einen direkten Kontakt zur Elektrodenoberfläche (direkter EET) übertragen wurden oder über redoxaktive Stoffe im Medium (indirekter EET). Außerdem könnte *P. putida* KT2440 dazu in der Lage sein, Mediatoren zu bilden.

### 7.2.2 Direkter oder indirekter externer Elektronentransfer: Untersuchungen im definierten Medium

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob *P. putida* KT2440 auf die Verfügbarkeit von Mediatoren im Medium angewiesen ist oder selbst Elektronen über die äußere Zellmembran transportiert. Da diese Untersuchung in einem Medium ohne redoxaktive Komponenten durchgeführt werden muss, wurde das definierte M9-Medium verwendet. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde Glucose eingesetzt. Analog zum Versuch mit Komplexmedium wurde das Potential der Arbeitselektrode auf +0,500 V (versus Ag/AgCl) eingestellt.

Während der gesamten Prozesszeit wurde keine Glucose-Aufnahme beobachtet (Abbildung 36 A) und die Stromstärke stieg nicht an (Abbildung 36 C). Wie bereits im Satzprozess mit *P. putida* KT2440 im Komplexmedium kam es auch im definierten Medium zu einer Verminderung der Biomassekonzentration nach der Inokulation (Abbildung 36 B).

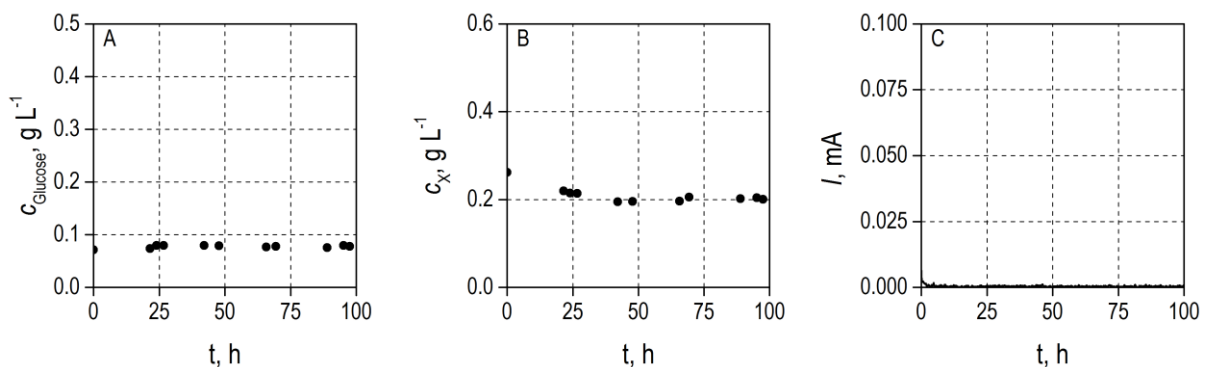


Abbildung 36 Anodenatmung von *P. putida* KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium (M9).  $c_{\text{Glucose}}$ : Glucosekonzentration;  $c_X$ : Biomassekonzentration;  $I$ : Stromstärke; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl); Arbeitselektrodenmaterial: Graphitgewebe; Arbeitsvolumen 0,1 L; Reaktor: 0,1 L-Parallelsystem.

### Diskussion

Da die Glucose-Konzentration über die Prozessdauer konstant blieb, fand keine Verstoffwechslung der Glucose durch *P. putida* KT2440 statt. Die Elektrode konnte somit nicht als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden. Diese Interpretation wird dadurch bestätigt, dass kein elektrischer Strom zwischen Anode und Kathode gemessen wurde. Die initiale Abnahme der Biomassekonzentration kann wie zuvor dadurch erklärt werden, dass ein Teil der Gesamtpopulation die Anode besiedelt und damit nicht mehr bei der Messung der optischen Dichte der Zellsuspension berücksichtigt werden kann.

Da es während des Satzprozesses zu keinem Anstieg der Stromstärke kam, zeigte dieses Experiment, dass *P. putida* weder in der Lage ist, Elektronen durch direkten Kontakt mit der Elektrodenoberfläche zu übertragen, noch Mediatoren zu bilden, die Elektronen über die äußere Membran transportieren könnten. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Schmitz *et al.* (2015).

Um in diesem Fall einen externen Elektronentransfer in definiertem Medium zu erreichen, gibt es drei Möglichkeiten: Der Mikroorganismus kann gentechnisch so modifiziert werden, dass er redoxaktive Proteine in der äußeren Membran exprimieren oder Mediatoren produzieren kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dem Medium künstlichen Mediator zuzusetzen. Alle diese Möglichkeiten bieten Vor- und Nachteile, die im Folgenden erläutert werden.

1. Damit eine Übertragung von Elektronen über die äußere Membran durch direkten Kontakt mit der Elektrode möglich ist, müssen alle Zellen in direktem Kontakt mit der Elektrodenoberfläche stehen. Lösen sie sich ab, kann kein EET mehr stattfinden und der Stoffwechsel kommt zum Stillstand. Exoelektrogene Mikroorganismen, die über diese Art des EET verfügen, neigen zur Biofilmbildung auf Elektroden (*Geobacter sulfurreducens*, Bond *et al.* (2012); *Shewanella oneidensis*, Thormann *et al.* (2004)). In Biofilmen können Stofftransportlimitierungen für Substrate und Produkte auftreten, die die Reaktion deutlich verlangsamen (Stewart, 2003). Gleichzeitig kann der Elektronentransfer nur an der Grenzfläche zwischen Medium und Elektrode stattfinden. Allerdings vereinfacht ein Biofilm die Aufarbeitung von im Medium gelösten Produkten, da weniger Biomasse in Suspension vorliegt und abgetrennt werden muss.
2. Die Bildung von Mediatoren durch den Mikroorganismus beschränkt den Ort des Elektronentransfers nicht mehr auf die Grenzfläche zwischen Elektrodenoberfläche und Medium,

sondern ermöglicht die extrazelluläre Abgabe von Elektronen überall in der flüssigen Phase. Damit ein unlimitierter externer Elektronentransfer gewährleistet ist, muss die Menge an produziertem Mediator groß genug sein. Um dieses Ziel zu erreichen, müssten die Zellen zusätzlich über Regulationsmechanismen zur Mediatorproduktion verfügen. Außerdem steht die Produktion des Mediators unweigerlich in Konkurrenz zur Produktproduktion und würde somit zu einer Verringerung des Produktertrags führen. Interessant ist dieser Ansatz, wenn der Mediator das gewünschte Produkt darstellt.

3. Die Verwendung von künstlichen Mediatoren ermöglicht ebenfalls einen EET in der flüssigen Phase. Dabei kann die benötigte Mediatorkonzentration sehr einfach eingestellt werden. Allerdings können künstliche Mediatoren instabil sein, auf den Mikroorganismus toxisch wirken und die Prozesskosten deutlich erhöhen, weshalb sie während der Aufarbeitung aufwendig entfernt oder zurückgewonnen werden müssen (Allen und Bennetto, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde entschieden, dem Medium einen Mediator zuzusetzen, da dessen Konzentration unabhängig vom mikrobiellen Organismus einstellbar ist und somit durch einen weiteren Freiheitsgrad eine flexiblere Prozessführung zulässt.

### 7.2.3 Definiertes Medium mit künstlichen Mediatoren

Wie das vorhergehende Kapitel zeigt, konnte beim anaeroben Satzprozess mit *P. putida* KT2440 im definierten Medium in einem bio-elektrochemischen System ohne Zugabe von künstlichen Mediatoren keine signifikante metabolische Aktivität (in Form einer Zunahme der Biomassekonzentration in der Suspension oder der Stromstärke) gemessen werden, obwohl die als Anode geschaltete Elektrode als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung stand. Es fand demnach kein externer Elektronentransfer statt. Aus den im vorherigen Kapitel erläuterten Gründen wurden dem definierten Medium künstliche Mediatoren zugegeben. Die drei Mediatoren Eisen(III)chlorid ( $\text{FeCl}_3$ ), Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) und Riboflavin wurden anhand ihrer unterschiedlichen Redoxpotentiale ( $E^0$ , Tabelle 3) ausgewählt.

#### Untersuchung der Mediatoren

Wie bereits in Kapitel 7.2.1 erläutert wurde, muss das Arbeitselektrodenpotential größer sein als das Redoxpotential des Mediators, damit die Mediatoren an der Elektrode regeneriert werden können. Da dieses vom Medium, der Temperatur und der Mediatorkonzentration abhängt, wurden von allen drei

Mediatoren zyklische Voltammogramme (engl. *cyclic voltammogramm*, CV) aufgenommen. Die Messung wurde im 0,1 L-Parallelsystem durchgeführt. Anhand der CVs kann ermittelt werden auf welches Potential die Arbeitselektrode polarisiert werden sollten. Die zyklischen Voltammogramme wurden mit Vorschubgeschwindigkeiten von  $10 \text{ mV s}^{-1}$  im definierten M9-Medium mit der Kohlenstoffquelle Glucose unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Sie sind in Abbildung 37 gezeigt.

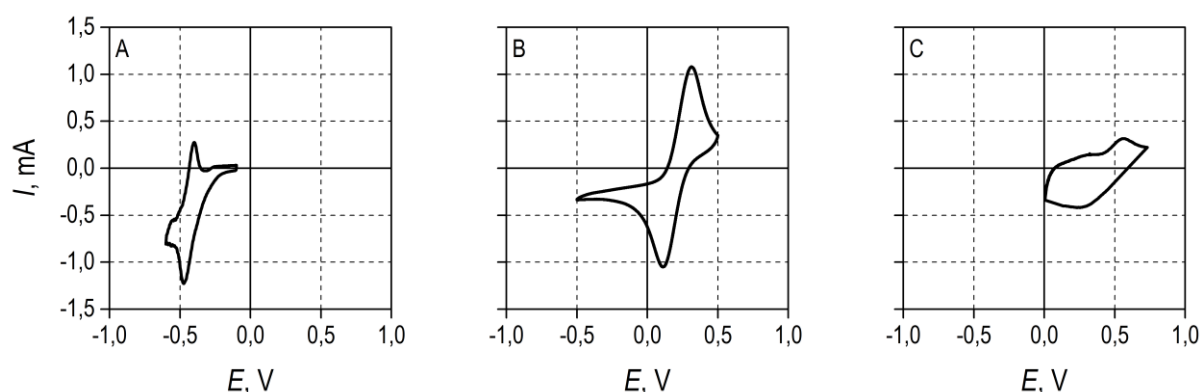


Abbildung 37 Zyklische Voltammogramme der Mediatoren (A) Riboflavin, (B) Kaliumhexacyanoferrat und (C) Eisen (III)chlorid. Die CVs wurden in definiertem M9-Medium bei  $30^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die Konzentration der Mediatoren war  $1 \text{ mM}$ . Vorschubgeschwindigkeit  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $E$ : Elektrodenpotential (versus Ag/AgCl);  $I$ : Stromstärke.

Die anodischen Spitzenstrompotentiale lagen bei  $-0,399 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) (Riboflavin),  $+0,315 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) und  $+0,560 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) ( $\text{FeCl}_3$ ). Das Arbeitselektrodenpotential ( $E_{\text{AE}}$ ) sollte größer sein als die mittels zyklischer Voltammetrie bestimmten anodischen Spitzenstrompotentiale ( $E_{\text{p,a}}$ ).

Dementsprechend wurde das Arbeitselektrodenpotential an das Redoxpotential des Mediators angepasst. Im Prozess mit  $\text{FeCl}_3$  wurde ein  $E_{\text{AE}}$  von  $+0,600 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) eingestellt. Ein  $E_{\text{AE}} = +0,500 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) wurde für die Untersuchungen mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  gewählt und für die Untersuchung von Riboflavin wurde die Arbeitselektrode auf  $-0,300 \text{ V}$  (versus Ag/AgCl) polarisiert.

Die Untersuchung der Anodenatmung von *P. putida* KT2440 wurden im Satzverfahren im 0,1 L-Parallelsystem durchgeführt. Es wurde definiertes M9-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Mediatorkonzentrationen wurden auf  $1 \text{ mM}$  eingestellt. Vor der Inokulation wurden die Mediatoren für  $24 \text{ h}$  oxidiert. Die Potentiale der Arbeitselektroden wurden wie oben angegeben eingestellt.

### Eisen(III)chlorid

Durch Einsatz des Mediators  $\text{FeCl}_3$  kam es im Vergleich zu dem bereits diskutierten Satzprozess mit *P. putida* KT2440 bei Anodenatmung im definierten Medium ohne Mediator (Abbildung 36 C) mit der Inokulation zu einer Erhöhung der Stromstärke (Abbildung 38 C). Die Stromstärke stieg innerhalb von 3,4 h von  $1,0 \mu\text{A}$  auf  $5,4 \mu\text{A}$  und erreichte damit den maximalen Wert. Im weiteren Prozessverlauf stellte sich nach 25 h ein konstanter Strom von  $3,5 \mu\text{A}$  ein.

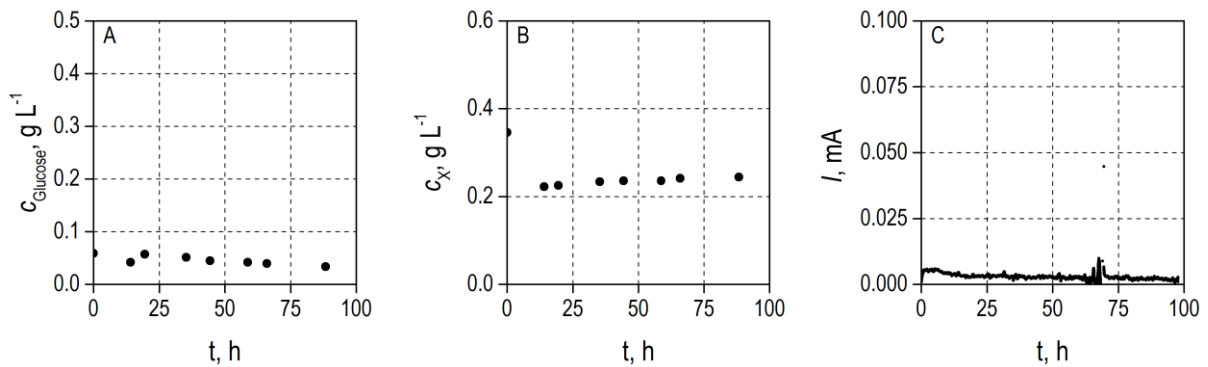


Abbildung 38 Anodenatmung im Satzverfahren mit *P. putida* KT2440 in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators  $\text{FeCl}_3$  (1mM).  $c_{\text{Glucose}}$ : Glucosekonzentration;  $c_X$ : Biomassekonzentration;  $I$ : Stromstärke; Arbeitselektrodenpotential: +0,600 V (versus Ag/AgCl); Elektrodenmaterial: Graphitgewebe; Arbeitsvolumen 0,1 L; Reaktor: 0,1 L-Parallelsystem.

Während des Prozesses wurde die Umsetzung von Glucose beobachtet. Innerhalb von 88 h sank die Glucose-Konzentration um  $25 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 38 A). Nach der Inokulation wurde innerhalb der ersten 25 h eine Biomasseabnahme von  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,22 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet. Zu Prozessende wurde eine Biomassekonzentration von  $0,24 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 38 B). Es fand demnach keine signifikante Biomassezunahme statt. Jedoch wurde die Bildung eines Biofilms auf der Elektrodenoberfläche beobachtet.

### Kaliumhexacyanoferrat

Als weiterer Mediator wurde  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  untersucht. Innerhalb einer Prozesszeit von 75 h wurde Glucose vollständig umgesetzt (Abbildung 39 A). Nach der Inokulation wurde einer initiale Abnahme der Biomassekonzentration von  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,20 \text{ g L}^{-1}$  innerhalb von 25 h beobachtet. Im folgenden Prozessverlauf war eine leichte Zunahme der Biomassekonzentration zu verzeichnen. Zu Prozessende lag die Biomassekonzentration bei  $0,22 \text{ g L}^{-1}$  (Abbildung 39 B). Auch bei diesem Versuch wurde die Bildung eines Biofilms auf dem als Anode verwendeten Graphitgewebe festgestellt. Durch die

Verwendung des Mediators  $K_3Fe(CN)_6$  kam es mit der Inokulation innerhalb von 3,6 h zu einer signifikanten Erhöhung der Stromstärke von  $1,9 \mu A$  auf  $82,9 \mu A$  (Abbildung 39 C). Im Folgenden wurde eine Abnahme der Stromstärke beobachtet. Nach einer Prozesszeit von 88 h wurde nur noch eine Stromstärke von  $17,3 \mu A$  gemessen. Zu diesem Zeitpunkt wurde erneut Glucose zugegeben, was unmittelbar zu einer deutlichen Erhöhung der Stromstärke auf  $72,5 \mu A$  führte.

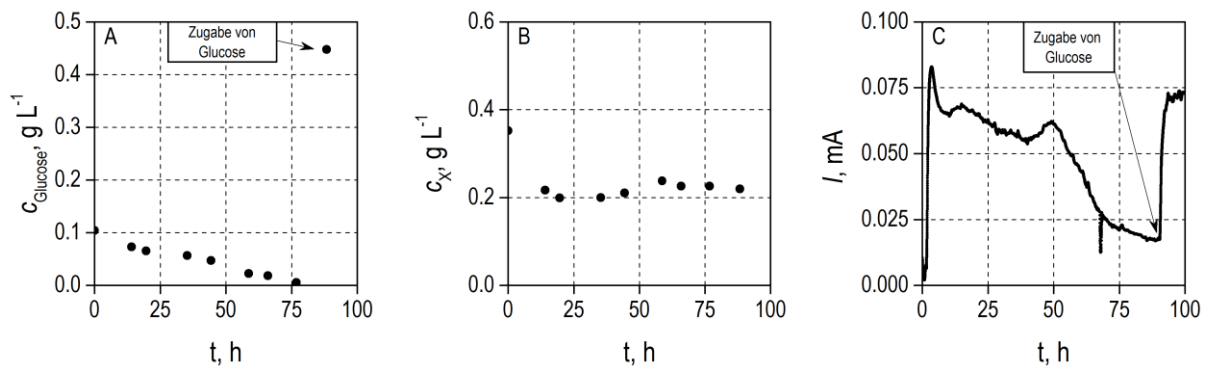


Abbildung 39 Anodenatmung von *P. putida* KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators  $K_3Fe(CN)_6$  (1mM).  $c_{Glucose}$ : Glucosekonzentration;  $c_X$ : Biomassekonzentration;  $I$ : Stromstärke; Arbeitselektrodenpotential:  $+0,500$  V (versus Ag/AgCl); Elektrodenmaterial: Graphitgewebe; Arbeitsvolumen  $0,1$  L; Reaktor:  $0,1$  L-Parallelsystem.

### Riboflavin

Als dritter Mediator wurde Riboflavin untersucht. Die Verwendung dieses Mediators ermöglichte keine Umsetzung von Glucose (Abbildung 40 A). Die Biomassekonzentration verminderte sich innerhalb von 14 h von  $0,36 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ . Nach einer Prozesszeit von 75 h konnte keine Biomasse mehr nachgewiesen werden. Außerdem wurde für diesen Versuch keine Biofilmbildung auf der Arbeitselektrode festgestellt. Nach der Inokulation wurde innerhalb von 16 h ein Anstieg der Stromstärke auf  $7,7 \mu A$  beobachtet (Abbildung 40 C). Im weiteren Verlauf des Satzprozesses fiel die Stromstärke auf den vor der Inokulation gemessenen Ausgangswert von  $1,8 \mu A$ .

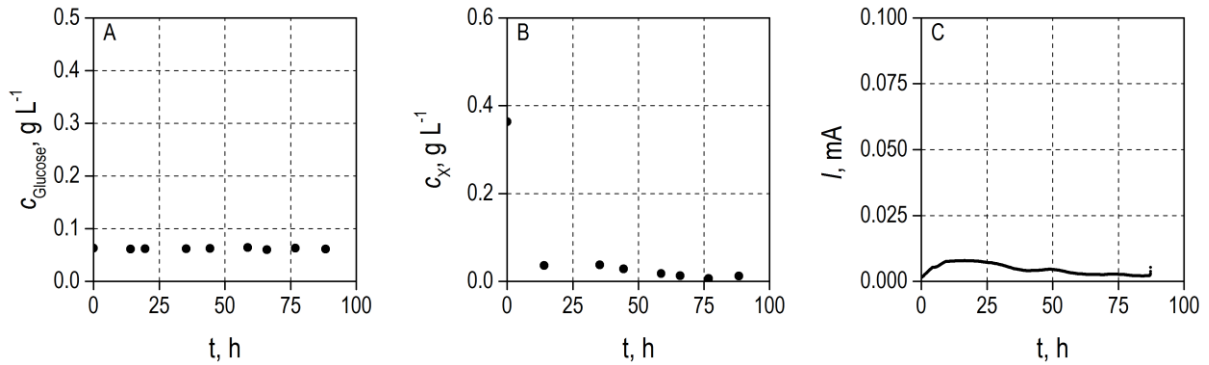


Abbildung 40 Anodenatmung von *P. putida* KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators Riboflavin (1mM).  $c_{\text{Glucose}}$ : Glucosekonzentration;  $c_X$ : Biomassekonzentration;  $I$ : Stromstärke; Arbeitselektrodenpotential:  $-0,300\text{ V}$  (versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ); Elektrodenmaterial: Graphitgewebe; Arbeitsvolumen  $0,1\text{ L}$ ; Reaktor:  $0,1\text{ L}$ -Parallelsystem.

Die folgende Tabelle dient der übersichtlichen Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Satzprozessen mit *P. putida* KT2440 mit  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  und Riboflavin.

Tabelle 13 Anodenatmung von *P. putida* KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium mit  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  oder Riboflavin. Zusammenfassung der Ergebnisse. Angegeben sind die maximalen Stromstärken  $I_{\text{max}}$ , die maximale Biomassekonzentration  $c_{X\text{max}}$  zu Prozessende und die Biofilmbildung auf der Graphitelektrode.

Mediator	$I_{\text{max}}, \mu\text{A}$	$c_{X\text{max}}, \text{g L}^{-1}$	Biofilmbildung
$\text{FeCl}_3$	5,4	0,24	Ja
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	82,9	0,22	Ja
Riboflavin	7,7	0,0	Nein

### 7.2.4 Diskussion

Im Rahmen der Untersuchungen des externen mediatorvermittelten Elektronentransfers wurden zunächst die Mediatoren mittels CVs untersucht. Die dabei bestimmten Oxidationspotentiale (angegeben versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) von  $-0,399\text{ V}$  (Riboflavin),  $+0,315\text{ V}$  ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) und  $+0,560\text{ V}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) stimmen gut mit den aus der Literatur beschriebenen Werten von  $-0,405\text{ V}$  (Riboflavin, Canstein *et al.*, 2008),  $+0,239\text{ V}$  ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , Sharpe, 1976; Kwong, 2001; Pandurangachar *et al.*, 2010) und  $+0,573\text{ V}$  ( $\text{FeCl}_3$ , Sharpe (1976)) überein. Diese CVs zeigten außerdem, dass der Elektronentransfer zwischen den Mediatoren und der Graphitgewebeelektrode gegeben ist.

Die Mediatoren  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  und Riboflavin wurden in Satzprozessen mit *P. putida* KT2440 im bio-elektrochemischen Parallelsystem eingesetzt. Mit allen Mediatoren wurde zu Prozessbeginn ein Anstieg der Stromstärke beobachtet. Es kam also – im Gegensatz zum Prozess bei Anodenatmung mit definiertem Medium ohne Mediator – zu einem externen Elektronentransfer.

Elektronen werden immer von negativen zu positiven Potentialen übertragen (Kapitel 3.1.8). Dies gilt auch für die Elektronen der mikrobiellen Atmungskette. Da das Redoxpotential des Mediators  $\text{FeCl}_3$  mit +0,560 V (versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) nur um 0,063 V kleiner ist als das des natürlichen terminalen Elektronenakzeptors Sauerstoff (+0,623 V (versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ )), wurde davon ausgegangen, dass es zu einem externen Elektronentransfer kommen sollte. Wie die Ergebnisse zeigen, konnte für die Zugabe des Mediators  $\text{FeCl}_3$  auch metabolische Aktivität gemessen werden, was sich in der Umsetzung der Glucose und dem Anstieg der Stromstärke äußerte. Im Vergleich zu der Verwendung des Mediators  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , der mit +0,239 V (versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) ein deutlich niedrigeres Redoxpotential aufweist als der Mediator  $\text{FeCl}_3$ , waren die Stromstärken beziehungsweise der externe Elektronentransfer jedoch sehr gering. Dies kann drei Ursachen haben:

1. Die unterschiedliche Membrangängigkeit der beiden Mediatoren. Das Ion  $\text{Fe}^{3+}$  des Mediators  $\text{FeCl}_3$  kann über mindestens zwei Eisen-Siderophor-Transportsysteme, drei ABC Eisentransporter (ATP-bindende Kassette, engl.: *ATP binding cassette*, ABC) und 18 Siderophor-Rezeptoren auf der äußeren Membran (Dos Santos *et al.*, 2004) aufgenommen oder komplexiert und über die innere Membran transportiert werden (Visca *et al.* 2002). Das hydrophile  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  kann im Gegensatz dazu nur über die äußere, nicht aber über die innere Membran gelangen (Rawson *et al.*, 2014).
2. Die Löslichkeit von  $\text{Fe}^{3+}$  in Wasser. Das sehr geringe Löslichkeitsprodukt ( $[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{OH}^-]^3 = 10^{-39}$ ) des sich bildenden Eisenhydroxids ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) führt dazu, dass die  $\text{Fe}^{3+}$  Konzentration bei pH 7 bei  $10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$  liegt (Lengeler *et al.*, 1999). Im hier vorliegenden Fall könnte die Löslichkeit des  $\text{Fe}^{3+}$  etwas besser sein, da in der Spurenelementlösung EDTA (Konzentration von EDTA im Medium:  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise 0,035 mM) verwendet wurde. Entsprechend der Nernst-Gleichung, führt die Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$  mit EDTA zu einer Verringerung des Redoxpotentials um 0,650 V auf -0,077 V (versus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ), da EDTA  $\text{Fe}^{3+}$   $10^{11}$ -mal besser bindet als  $\text{Fe}^{2+}$  (Bors *et al.*, 1983). Kommt es also zu einer Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$ , ist es nur noch möglich, redoxaktive Enzyme in der Atmungskette bis Cytochrom b zu oxidieren. Das zyklische Voltammogramm, das mit  $\text{FeCl}_3$  aufgezeichnet wurde, zeigt im Vergleich mit



$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  gering ausgeprägte Spitzenströme. Dies kann ebenfalls auf eine geringe  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration zurückzuführen sein.

3. Ein schlechter Elektronenübergang zwischen  $\text{FeCl}_3$  und Graphitgewebe-Elektrode. Eine hohe Überspannung für die Elektronentransferreaktion könnte ebenfalls die gering ausgeprägten Spitzenströme erklären, die im CV von  $\text{FeCl}_3$  beobachtet wurden.

Aus einer oder einer Kombination dieser Ursachen könnte die Verwendung von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu einem besseren externen Elektronentransfer geführt haben als die Verwendung von  $\text{FeCl}_3$ .

Mit dem Mediator Riboflavin, der ein Redoxpotential von -0,399 V (versus Ag/AgCl) besitzt, wurde direkt nach der Inokulation ein geringer Anstieg der Stromstärke beobachtet. Allerdings fand keine Substratumsetzung statt. Im Gegensatz zu den Satzprozessen mit  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fiel die Biomassekonzentration auf nahezu  $0 \text{ g L}^{-1}$  und es konnte keine Biofilmbildung auf der Elektrode festgestellt werden. Photolyse von Riboflavin führt zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Riboflavin zerfällt bei dieser Reaktion (Wang und Nixon, 1978) und steht im Folgenden nicht länger als Mediator zur Verfügung.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein sehr reaktiver Stoff, der zu starken Schädigungen der Zellen führt und damit den Abfall der Biomassekonzentration verursacht. Diese antimikrobielle Wirkung von Riboflavin wurde bereits für *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Makdoui *et al.*, 2010). Diese Mikroorganismen sind ebenso wie *P. putida* KT2440 Katalase-positiv (Dudek, 2006, 2007; Parija, 2009; Ramos-González und Molin, 1998). Mit *P. aeruginosa* wurde eine Abnahme von  $9,4 \cdot 10^3$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  auf Null innerhalb von 60 Minuten in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  Riboflavin beobachtet. Dies könnte erklären, weshalb es mit dem Mediator Riboflavin zu keiner Stabilisierung der Biomassekonzentration kam, so wie sie in den übrigen Satzprozessen mit und ohne Mediatoren zur Untersuchung der Anodenatmung beobachtet worden war obwohl *P. putida* KT2440 Katalase-positiv ist.

Unter denen im Rahmen dieser Experimente untersuchten Mediatoren war  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  am Besten für die Anodenatmung von *P. putida* KT2440 geeignet. Dieser Mediator wurde deshalb in allen folgenden anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung verwendet.

### 7.3 Inhibierender Einfluss von $K_3Fe(CN)_6$

Um eine geeignete Mediatorkonzentration auswählen zu können, wurde der Einfluss von  $K_3Fe(CN)_6$  auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  unter aeroben Bedingungen untersucht. Die Untersuchungen wurden im definierten Medium (M9) mit Citrat als Kohlenstoffquelle in Schüttelkolben im Dreifachansatz durchgeführt.

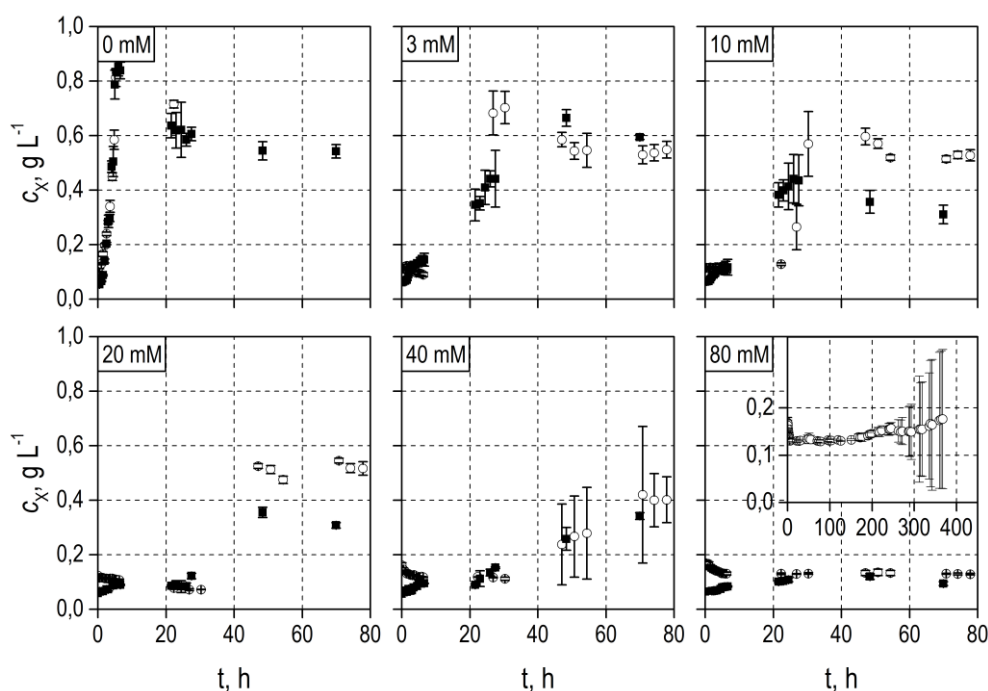


Abbildung 41 Satzprozesse mit *P. putida* KT2440 (■) und *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  (○) im definierten Medium mit unterschiedlichen  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentrationen in Schüttelkolben.  $c_X$ : Biomassekonzentration. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Ansätzen gezeigt. Die Untersuchungen wurden im 500 mL-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL durchgeführt.

Wie aus Abbildung 41 und Abbildung 42 ersichtlich, reduzierten bereits Mediatorkonzentrationen von 3 mM die Wachstumsrate und führten zu einer Verlängerung der Verzögerungsphase sowie geringeren maximalen Biomassekonzentrationen. Mit der Erhöhung der Mediatorkonzentration kam es zu einer deutlicheren Ausprägung dieser Effekte.

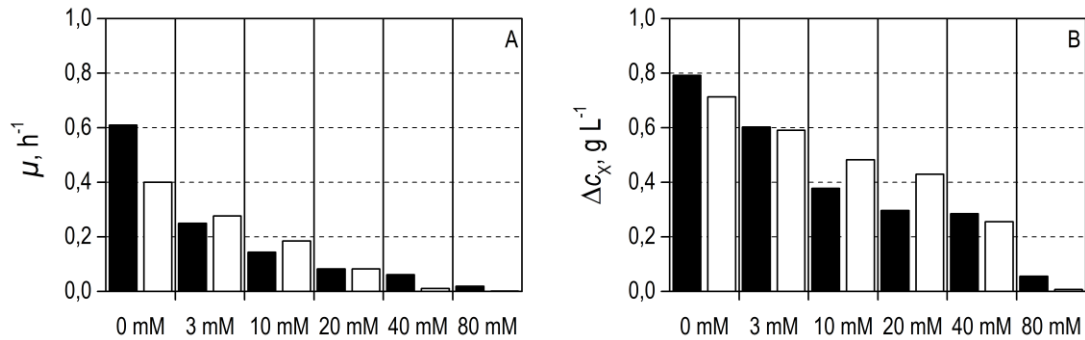


Abbildung 42 Einfluss der  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration auf die Wachstumsrate (A) und die Biomassezunahme (B) von *P. putida* KT2440 (schwarze Balken) und *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  (weiße Balken) unter aeroben Bedingungen.

### 7.3.1 Diskussion

Die Untersuchung des Einflusses von  $K_3Fe(CN)_6$  auf das aerobe Wachstum von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  zeigte, dass bereits geringe Konzentrationen von 3 mM einen deutlichen Einfluss auf Wachstumsrate, maximale Biomassekonzentration und die Verzögerungsphase hatten. Mit steigenden  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentrationen kam es zur Verminderung der Wachstumsraten und der maximalen Biomassekonzentration sowie zur Verlängerung der Verzögerungsphase. Es wurde jedoch keine lineare Zunahme oder eine Abnahme der Biomassekonzentration beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass  $K_3Fe(CN)_6$  im untersuchten Konzentrationsbereich für *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  nicht letal ist, da es in keinem Fall zu einer Verminderung der Biomasse kam. Da dem Medium  $K_3Fe(CN)_6$  zugegeben wurde, ist eine Reduktion zu  $K_4Fe(CN)_6$  möglich. Auf  $K_3Fe(CN)_6$  übertragene Elektronen stehen nicht länger für den Aufbau eines Protonengradienten zur Verfügung und das Wachstum vermindert sich. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits 1935 von Wood *et al.* beschrieben. Redoxaktive Verbindungen verringerten im oxidierten Zustand das Wachstum von *Bacillus megatherium*.

## **8 Einfluss verschiedener Substrate auf die Herstellung von *p*HBA mit *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* bei Anodenatmung**

Wie zuvor gezeigt wurde, kann *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* unter aeroben Bedingungen Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat zur Produktion von *p*HBA nutzen, wobei das eingesetzte Substrat die erreichten *p*HBA-Erträge deutlich beeinflusst. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von Glucose durch *P. putida* KT2440 unter Bereitstellung des Mediators  $K_3Fe(CN)_6$  in einem bio-elektrochemischen System durch Anodenatmung möglich ist. In den in diesem Kapitel dargestellten Untersuchungen wurde geprüft, inwiefern ausgehend von den zuvor ausgewählten Substraten (Kapitel 5) eine *p*HBA-Produktion in anaeroben Satzprozessen mit mediatorvermittelter Anodenatmung möglich ist.

### **8.1 Anodenatmung mit unterschiedlichen Substraten**

Die Untersuchungen der *p*HBA-Bildung in einem bio-elektrochemischen System mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* ausgehend von Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat erfolgten im 1 L-System im Satzverfahren. In allen Versuchen wurden als Arbeitselektrode Graphitgewebe verwendet. Das Arbeitselektrodenpotential wurde auf +0,500 V (versus Ag/AgCl) eingestellt. Das Arbeitsvolumen betrug 1 L. Es wurde das definierte M9-Medium verwendet, dem 1 - 6 mM  $K_3Fe(CN)_6$  als Mediator zugesetzt wurde. Die Bestimmung von Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen erfolgte durch regelmäßige Probenahmen. Substrat- und *p*HBA-Konzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt, Biomasse- und  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentrationen wurden photometrisch ermittelt. Zusätzlich wurden die integralen *p*HBA-Erträge bestimmt. Zur Vorkulturherstellung wurde ebenfalls das M9-Medium verwendet. Dieses enthielt dasselbe Substrat, das im 1 L-System untersucht wurde, um Verzögerungsphasen zu Prozessbeginn zu vermeiden. Die Induktion des Gens *ubiC*, das für die Chorismat-Pyruvat Lyase kodiert, erfolgte mit IPTG nach der ersten Verdopplung der Biomasse in der Vorkultur. Die Verläufe aller in den Satzprozessen gemessenen Prozessgrößen sind – vergleichend für die fünf untersuchten Substrate – in Abbildung 43 – dargestellt.

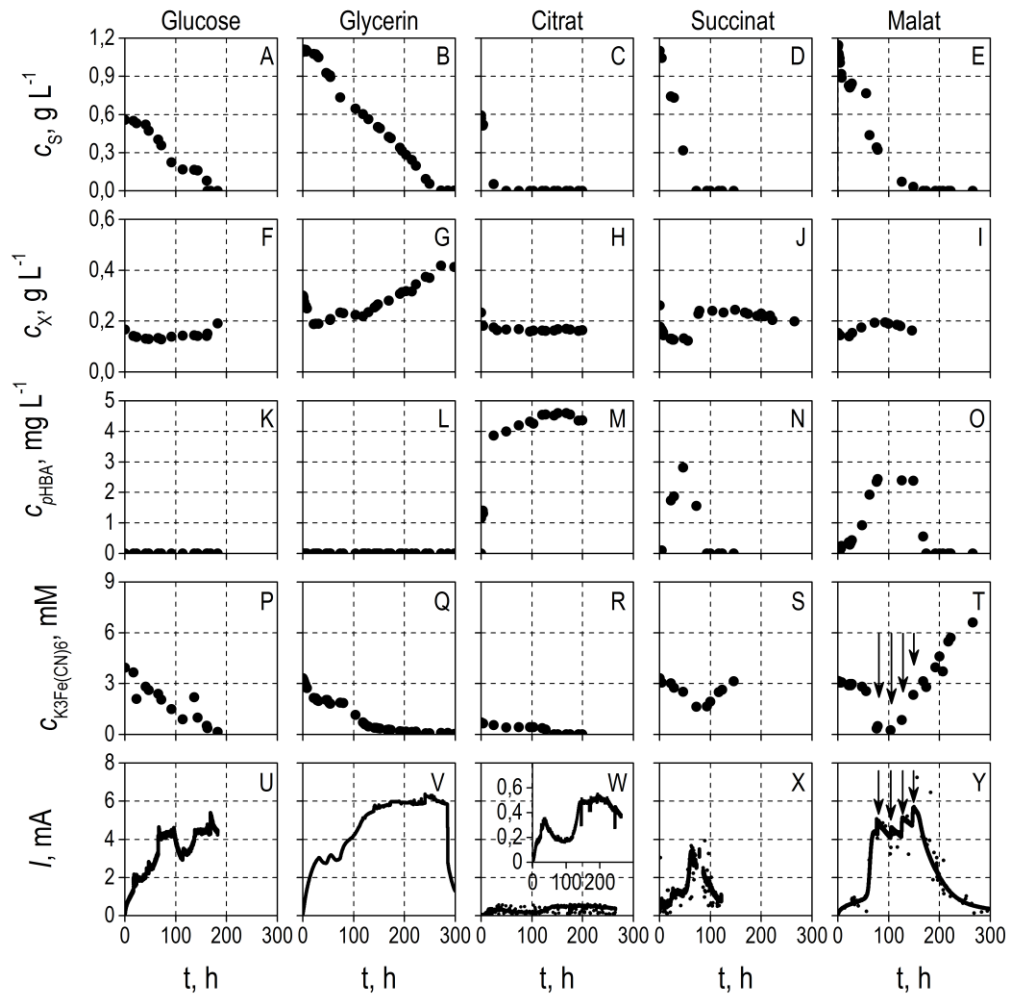


Abbildung 43 Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im Satzverfahren in definiertem Medium mit unterschiedlichen Substraten. Alle Versuche wurden im 1 L-System durchgeführt. Arbeitselektrode: Graphitgewebe; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl); Mediator:  $K_3Fe(CN)_6$ .  $c_i$ : Konzentration der Komponente  $i$ ; S: Substrat; X: Biomasse;  $I$ : Stromstärke; Pfeile: Mediatorzugaben.

Die Substratkonzentrationen nahmen in allen Versuchen über die Prozesszeit linear ab (Abbildung 43 A-E). In den Satzprozessen mit Glucose, Glycerin und Malat konnten bis zu vier Phasen beobachtet werden, in denen sich die lineare Substrataufnahme erhöhte oder verminderte, während die Substratkonzentration in den Satzprozessen mit Citrat und Succinat über die komplette Prozesszeit konstant abnahm (Abbildung 43 A-E). Die maximalen Substrataufnahmeraten lagen bei  $0,039 \text{ g (gx h)}^{-1}$  (Glucose),  $0,025 \text{ g (gx h)}^{-1}$  (Glycerin),  $0,127 \text{ g (gx h)}^{-1}$  (Citrat),  $0,092 \text{ g (gx h)}^{-1}$  (Succinat) und  $0,054 \text{ g (gx h)}^{-1}$  (Malat). Da es in allen Satzprozessen zu Biofilmbildung auf dem als Arbeitselektrode verwendeten Graphitgewebe kam, wurden die spezifischen Raten nur auf die in

Suspension befindliche Biomasse bezogen. Die Prozesszeiten bis zur vollständigen Metabolisierung der Kohlenstoffquellen variierten zwischen 25 h (Citrat) und 250 h (Glycerin).

Wie bereits in Kapitel 7 beschrieben wurde, kam es nach der Inokulation zu einem initialen Abfall der Biomassekonzentration in der Zellsuspension. Diese stabilisierte sich in allen Prozessen innerhalb von 24 h (Abbildung 43 F-J). Im weiteren Prozessverlauf wurde bei allen Substraten – mit Ausnahme von Citrat – eine Zunahme der Biomassekonzentration festgestellt. Die höchste Biomassekonzentration bei Prozessende ( $0,42 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde im Satzprozess mit Glycerin bestimmt.

Obwohl *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* in der Lage war, alle Substrate umzusetzen, konnte nur in den Satzprozessen mit Citrat, Succinat und Malat die Bildung von *p*HBA beobachtet werden (Abbildung 43 M-O). In den Satzprozessen mit Glucose und Glycerin wurde kein *p*HBA nachgewiesen (Abbildung 43 K, L). Die höchste *p*HBA-Konzentration ( $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) wurde für Citrat nach einer Prozesszeit von 150 h bestimmt. Für Succinat und Malat wurden mit  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  und  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  etwas geringere Konzentrationen erreicht. Im weiteren Verlauf nahmen die *p*HBA-Konzentrationen in den Satzprozessen mit Citrat, Succinat und Malat wieder ab. Die geringste Abnahme wurde im Satzprozess mit Citrat beobachtet.

Während der Satzprozesse wurde die Konzentration der oxidierten Mediatorspezies  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  photometrisch bestimmt. Im Satzprozess mit Citrat wurde eine Mediatorkonzentration von 1 mM, entsprechend zu den in Kapitel 7 durchgeführten Untersuchungen gewählt. Die nun durchgeführte Messung der Reduktion von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zeigte im Satzprozess mit Citrat deutlich, dass es bei einer Prozesszeit von 100 h zu einer vollständigen Reduktion des Mediators kam (Abbildung 43 R). Deshalb wurden in den übrigen Satzprozessen mit Glucose, Glycerin, Succinat und Malat jeweils 3 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  vorgelegt (Abbildung 43 P, Q, S, T). Im Satzprozess mit Succinat konnte durch die Verdreifachung der  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentration eine vollständige Reduktion des Mediators verhindert werden. In den Satzprozessen mit Glucose, Glycerin und Malat kam es trotz der Verdreifachung der  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen zu einer vollständigen Reduktion des Mediators. Aus diesem Grund wurde im Satzprozess mit Malat die  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentration durch mehrfache manuelle Zugaben auf 6 mM erhöht (Abbildung 43 T). Die Mediatorzugaben verursachten die in Abbildung 43 Z sichtbaren Sprünge im Stromverlauf.

Während das Substrat verbraucht wurde, wurde in allen Versuchen eine steigende Stromstärke beobachtet. Der Verlauf der Stromstärke zeigte in allen Versuchen mehrere unterschiedliche Plateaus und intermittierende Zu- und Abnahmen. Bei den Umsetzungen von Glucose, Glycerin, Succinat und

Malat wurden maximale Stromstärken zwischen 4 mA und 6 mA gemessen (Abbildung 43 U-Y). Die für Citrat bestimmte maximale Stromstärke war um ein Zehnfaches niedriger. Der Zeitpunkt der finalen Abnahme der Stromstärke fiel in keinem der Prozesse mit der vollständigen Substratverstoffwechselung zusammen. Da Strom durch die metabolische Aktivität der Zellen erzeugt wird, deuteten die zeitliche Verschiebung von vollständigem Substratverbrauch und Abnahme der Stromstärke auf die Metabolisierung zuvor gebildeter Nebenprodukte hin.

Um zu untersuchen inwiefern Nebenprodukte gebildet worden waren, wurden, wie in Kapitel 6 bereits beschreiben, HPLC-Chromatogramme bezüglich Signalspitzen unbekannter Verbindungen analysiert, die über Teile der Prozesszeit kontinuierlich steigende oder sinkende Flächen aufwiesen. Dabei konnten die bereits in Kapitel 6 für *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* identifizierten Nebenprodukte Gluconat, 2-Ketogluconat, Malat und Fumarat, nachgewiesen werden (Abbildung 44). Die Nebenprodukte Gluconat und 2-Gluconat wurde im Prozess mit Glucose gebildet (Abbildung 44 F, G). Die Bildung beider Nebenprodukte setzte erst ab einer Prozesszeit von 30 h ein. Zu einer Prozesszeit von 100 h wurden die maximalen Konzentrationen von 0,1 g L<sup>-1</sup> Gluconat und 0,02 g L<sup>-1</sup> 2-Ketogluconat bestimmt. Im Folgenden kam es zu einer Co-Metabolisierung von Glucose, Gluconat und 2-Ketogluconat, wobei die Metabolisierung von 2-Ketogluconat zum Zeitpunkt der vollständigen Umsetzung von Glucose und Gluconat nach 170 h stagnierte. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Prozess abgebrochen. Im Satzprozess mit Citrat wurden die Nebenprodukte Malat und Fumarat nachgewiesen (Abbildung 44 A, C). Die Bildung von Malat sowie Fumarat begann direkt mit der Inokulation. Zu einer Prozesszeit von 50 h wurden die maximalen Konzentrationen von 6,4 mg L<sup>-1</sup> Malat und 3,2 mg L<sup>-1</sup> Fumarat gemessen. Die folgende Abnahme der Malat- und Fumaratkonzentration korreliert mit dem Zeitpunkt des vollständigen Citratumsatzes. Mit dem vollständigen Malatumsatz konnte dann auch die Abnahme der Stromstärke beobachtet werden.

Im Satzprozess mit Succinat wurden ebenfalls Malat und Fumarat nachgewiesen (Abbildung 44 B, D). Die maximalen Konzentrationen wurden nach 28 h (Malat) beziehungsweise 21 h (Fumarat) erreicht. Sie lagen bei 0,1 g L<sup>-1</sup> (Malat) und 8,5 mg L<sup>-1</sup> (Fumarat). Im Folgenden wurde eine Co-Metabolisierung von Succinat, Malat, Fumarat und *p*HBA beobachtet. Im Satzprozess mit Malat wurde nur Fumarat als Nebenprodukt identifiziert (Abbildung 44 E). Innerhalb von 27 h wurde die maximale Fumaratkonzentration von 0,18 g L<sup>-1</sup> erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine Umstellung des Metabolismus, was sich auch in der zeitlich korrelierenden Verminderung der Malataufnahme zeigt. Nach 48 h konnte dann eine Co-Metabolisierung von Malat und Fumarat festgestellt werden. Das Nebenprodukt, das bei der Umsetzung von Glycerin gebildet wurde, konnte nicht identifiziert werden (Abbildung 44 H).

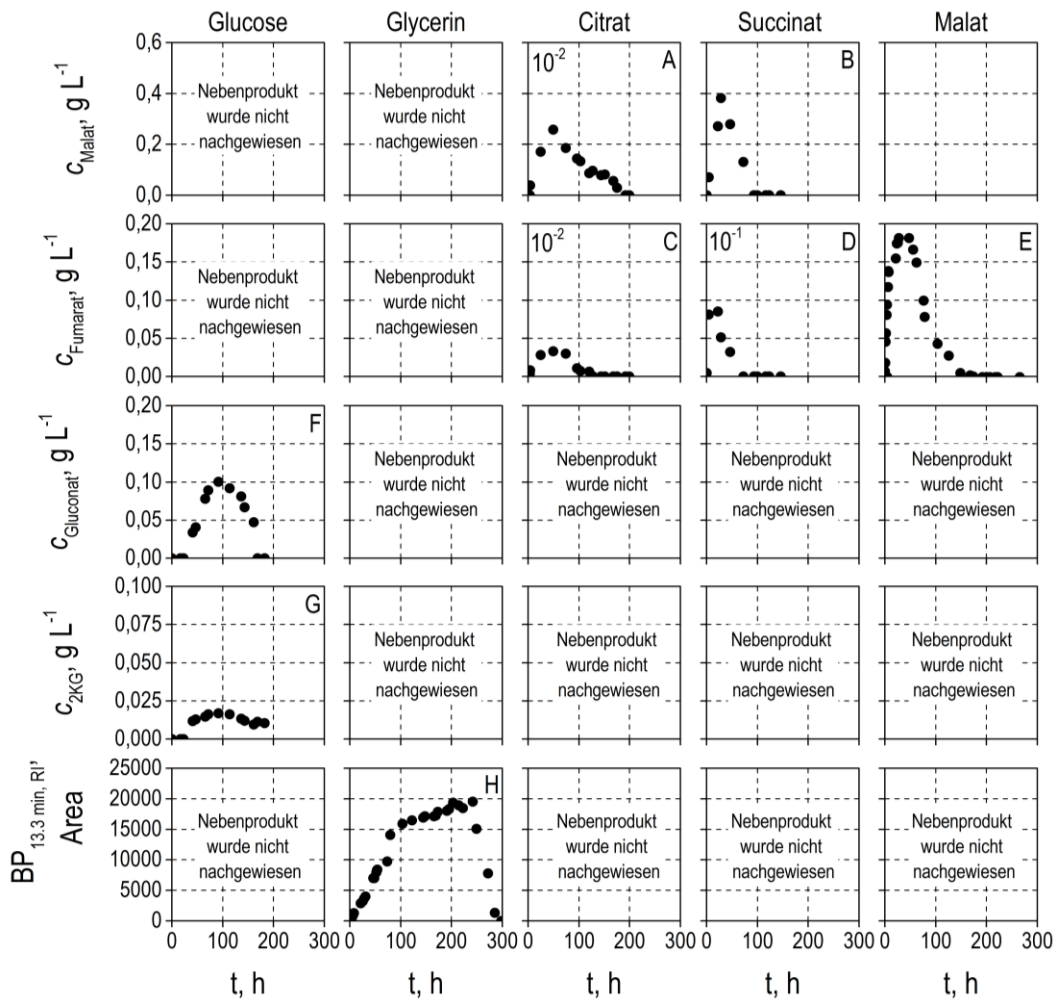


Abbildung 44 Nebenproduktbildung bei der Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im Satzverfahren in definiertem Medium mit unterschiedlichen Substraten. Alle Versuche wurden im 1 L-System durchgeführt. Arbeitselektrode: Graphitgewebe; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl); Mediator:  $K_3Fe(CN)_6$ .  $c_i$ : Konzentration der Komponente. Abbildungen ohne Buchstabencode: die entsprechenden Nebenprodukte konnten in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden.

### 8.1.1 Vergleich der *p*HBA-Erträge bei Anoden- und Sauerstoffatmung

Die *p*HBA-Erträge wurden für die Umsetzung aller Substrate in den anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung bestimmt und sind in Abbildung 45 im Vergleich zu den Erträgen aus den aeroben Satzprozessen (Kapitel 6.1) dargestellt. Anodenatmung mit Glucose und Glycerin führten zu keiner *p*HBA-Bildung. Im anaeroben Satzprozess mit Anodenatmung wurde für Citrat der *p*HBA-Ertrag verglichen mit dem aeroben Prozess um 43 % gesteigert. In den anaeroben Satzprozessen mit



Anodenatmung erreichten die *p*HBA-Erträge mit Succinat und Malat 85 % und 90 % der unter aeroben Bedingungen bestimmten *p*HBA-Erträge.

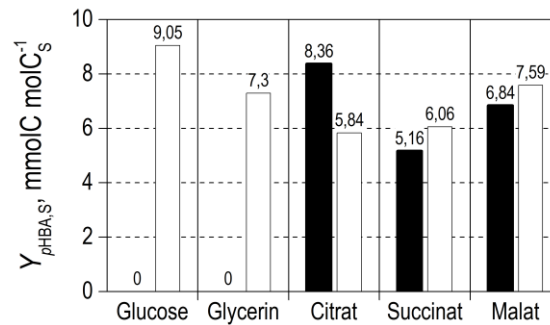


Abbildung 45 Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* im Satzverfahren: Vergleich der maximalen substratspezifischen *p*HBA-Erträge mit unterschiedlichen Substraten für Anodenatmung (schwarze Balken) und Sauerstoffatmung (weiße Balken).

### 8.1.2 Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* alle Substrate bei Anodenatmung im Satzprozess umsetzen. Dabei wurden in allen Satzprozessen mit Anodenatmung zeitlich lineare Verläufe der Produkt- und/oder Substratkonzentrationen beobachtet. Dies weist im Allgemeinen auf Limitierungen hin.

Limitierungen können durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen beispielsweise Substrat- oder Produktinhibierungen (Kunz, 2013), im Medium enthaltene toxische Verbindungen, Stofftransportlimitierungen (Kunz, 2016) oder pH-Änderungen im Medium (Madigan *et al.*, 2006).

Von diesen Punkten können Substrat- und Produktinhibierungen ausgeschlossen werden, da alle Substrate bereits unter aeroben Bedingungen in höheren Konzentrationen verwendet und in den aeroben Satzprozessen höhere *p*HBA-Konzentrationen erreicht wurden. Im Gegensatz zu den aeroben Satzprozessen wurde in den anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung der Mediator  $K_3Fe(CN)_6$  verwendet. Wie vorhergehende Versuche mit *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben bereits gezeigt hatten (Kapitel 7.3), führte  $K_3Fe(CN)_6$  zu einer Verlängerung der Verzögerungsphase sowie zu einer Verminderung der Wachstumsrate und maximalen Biomassekonzentration, jedoch nicht zu linearem Wachstum. In den Untersuchungen im bio-elektrochemischen System wurden unabhängig von der Mediatorkonzentration, die zwischen

1 mM (Citrat) und 6 mM (Malat) variiert worden war, dennoch ein linearer Verlauf der Substrat- und/oder Produktkonzentrationen gemessen.

Der pH wurde über externe Messungen während der Prozesse bei jeder Probenahme überprüft (Daten nicht gezeigt). Da nur geringe Substratkonzentrationen eingesetzt wurden, und das Medium gepuffert ist, kam es auch nur zu geringen Schwankungen des pH. Insbesondere unter Berücksichtigung der hohen Toleranz von *P. putida* KT2440 gegenüber pH-Änderungen (Kapitel 3.4), erscheint eine Limitierung des Metabolismus durch pH-Änderungen sehr unwahrscheinlich.

Mit Ausnahme des Satzprozesses mit Succinat konnte bei allen übrigen Substraten eine vollständige Reduktion des Mediators beobachtet werden. Die Arbeitselektrode war also nicht in der Lage den Mediator in ausreichender Geschwindigkeit zu regenerieren. Deshalb ist zu vermuten, dass in den Satzprozessen mit Glucose, Glycerin, Citrat und Malat der externe Elektronentransfer zwischen *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* und  $K_3Fe(CN)_6$  limitiert war. Im Satzprozess mit Succinat wurde der Mediator nicht vollständig reduziert, somit konnte auch keine Limitierung des externen Elektronentransfers vorliegen. Trotzdem wurden im Satzprozess mit Succinat lineare Abnahmen der Substrat- und Produktkonzentrationen beobachtet. Die Anodenatmung war demnach zeitweise durch die Übertragung der Elektronen auf den Mediator limitiert. Wie der Satzprozess mit Succinat zeigt, kann diese Limitierung jedoch nicht der alleinige Grund für die linearen Konzentrationsverläufe sein. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine vollständige Reduktion des Mediators zu konstanten Stromstärken führte, wobei die vollständige Reduktion des Mediators nicht die Voraussetzung für konstante Stromstärken war. Diese Beobachtung unterstützt die zuvor genannte Hypothese, dass es durch eine vollständige Reduktion des Mediators zu einer Limitierung des externen Elektronentransfers kommen kann, es aber nicht der alleinige Grund der beobachteten Limitierungen sein muss.

Ein verbleibender Faktor, der mikrobielle Reaktionen ebenfalls limitieren kann, ist der Stofftransport. In allen Satzprozessen war eine Biofilmbildung auf der Elektrode zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass der Stofftransport im Biofilm den Metabolismus der Zellen im Biofilm limitierte. Außerdem war die Durchmischung im Medium des verwendeten 1 L-Systems deutlich geringer als in den aeroben Satzprozessen, die im Rührkesselreaktor durchgeführt worden waren. Es ist somit möglich, dass auch die suspendierten Zellen stofftransportlimitiert waren.

Im Rahmen der Untersuchungen der Anodenatmung im Satzverfahren zur *p*HBA-Produktion wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Substrate unterschiedliche Nebenprodukte identifiziert. Wie in

Kapitel 6 bereits gezeigt wurde, kam es auch unter aeroben Bedingungen zur Bildung von Nebenprodukten. Der Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm ergab, dass diese Nebenproduktbildung durch die gentechnischen Modifikationen ausgelöst wurde und wahrscheinlich auf einen Ubichinol-Überschuss zurückzuführen ist. Die Deletion des Gens *pobA* könnte zu einem Ubichinol-Überschuss führen, da die Umsetzung von *p*HBA über den Ortho-Weg verhindert ist und sich somit der Fluss in den Ubichinol-Syntheseweg erhöht (Kapitel 3.4.1, Abbildung 16).

In den aeroben Satzprozessen mit Citrat und Succinat wurde das Nebenprodukt Malat gefunden, während im aeroben Satzprozess mit Malat Fumarat als Nebenprodukt identifiziert wurde. Dies wies drauf hin, dass die Bildung und Aufnahme von Malat schneller stattfand als dessen anschließende Umsetzung zu Oxalacetat. Bei der Anodenatmung mit Citrat und Succinat konnte neben Malat auch Fumarat als Nebenprodukt nachgewiesen werden. Bei der Anodenatmung mit Malat wurde mit  $0,2 \text{ g g}^{-1}_{\text{Malat}}$  deutlich mehr Fumarat gebildet als im aeroben Satzprozess ( $0,03 \text{ g g}^{-1}_{\text{Malat}}$ ) und das obwohl die initiale Malatkonzentration im Satzprozess zur Untersuchung der Anodenatmung um einen Faktor 5 niedriger war als die im aeroben Prozess eingesetzte Malatkonzentration. Während der Anodenatmung kommt es demnach zu einer deutlich größeren Limitierung der Umsetzung von Malat. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der externe Elektronentransfer im bioelektrochemischen System vermutlich deutlich langsamer abläuft als während der Sauerstoffatmung und es so zu einer weiteren intrazellulären Erhöhung der Ubichinol (UQH<sub>2</sub>)-Konzentration kommt. Damit stehen der Ubichinon-abhängigen Malatchinon-Oxidoreduktase sowie der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Malat-Dehydrogenase – direkt beziehungsweise indirekt durch eine limitierte Regeneration von NADH in der Atmungskette –weniger Ubichinon für die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat zur Verfügung.

Die im 1 L-System durchgeführten Untersuchungen hatten vor allem das Ziel, festzustellen ob auch in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung eine *p*HBA-Bildung ausgehend von Glucose, Glycerin, Citrat, Succinat und Malat möglich ist. Dabei wurde festgestellt, dass sich bei Anodenatmung nur Citrat, Succinat und Malat als Substrate zur *p*HBA- Bildung eignen. Der Vergleich mit den bei Sauerstoffatmung erreichten *p*HBA-Erträgen zeigte, dass sich der *p*HBA-Ertrag ausgehend von Citrat bei Anodenatmung erhöhte. Es wurde deshalb entschieden, Citrat für die folgenden Untersuchungen der *p*HBA-Produktion in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung zu verwenden.

Weshalb die *p*HBA-Produktion ausgehend von Glucose und Glycerin nicht möglich war wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Einen Hinweis könnten jedoch die von Lai *et al.* (2016)

durchgeführten Messungen der intrazellulären NADP/H-Konzentrationen bei der Umsetzung von Glucose mit *P. putida* F1 in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung geben. Diese zeigten, dass es im Vergleich zur aeroben Umsetzung von Glucose zu einer intrazellulären Erhöhung der NADP<sup>+</sup>-Konzentration im bio-elektrochemischen System kommt. NADPH wird als Reduktionsäquivalent im Shikimat-Weg zur *p*HBA-Bildung benötigt. Ein NADPH-Mangel könnte in diesem Fall die *p*HBA-Bildung ausgehend von Glucose unterbinden.

In den Satzprozessen mit Citrat, Succinat und Malat, in denen es zur *p*HBA-Bildung kam, verminderten sich die *p*HBA-Konzentrationen bei Anodenatmung. Dies könnte entweder durch eine chemische Redoxreaktion mit dem Mediator, einer elektrochemischen Reaktion mit der Elektrode oder durch eine Metabolisierung durch *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  verursacht werden und wurde im folgenden Kapitel untersucht.

## 8.2 Untersuchungen zur Umsetzung von *p*HBA bei Anodenatmung

Die im vorhergehenden Kapitel dargestellten Untersuchungen verschiedener Substrate zur *p*HBA-Produktion mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  bei Anodenatmung zeigten, dass es zu einer Verminderung der *p*HBA-Konzentration gegen Prozessende kam, obwohl durch die Deletion des für die 4-Hydroxybenzoat-3-Hydroxymonooxygenase kodierenden Gens *poba* der Abbau von *p*HBA über den Ortho-Weg nicht mehr möglich sein sollte.

Aus diesem Grund wurde die Umsetzung von *p*HBA durch eine chemische Redoxreaktion mit  $K_3Fe(CN)_6$  sowie die elektrochemische Reaktion an der Elektrode untersucht. Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment untersucht ob *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  trotz der Deletion von *poba* noch in der Lage ist *p*HBA als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren.

### 8.2.1 Untersuchungen zu elektrochemischen Reaktionen und chemischen Redoxreaktionen von *p*HBA

Um zu untersuchen inwiefern elektrochemischen Reaktionen und/oder chemische Redoxreaktionen im Medium von *p*HBA an der Elektrodenoberfläche stattfinden, die die Abnahme der *p*HBA-Konzentrationen erklären könnten, wurden zyklische Voltammogramme aufgenommen. Mit dieser elektrochemischen Methode ist es möglich, anhand der Anzahl der sich ausbildenden Spitzenstromstärken zu erkennen, ob eine elektrochemische Reaktion zwischen *p*HBA und der Elektrode stattfindet. Bei einer irreversiblen Reaktion zeigt das zyklische Voltammogramm einen Spitzenstrom, ist die Reaktion im untersuchten Potentialbereich reversibel, sollten zwei Spitzenströme erkennbar sein. Anhand des Halbstufenpotentials  $E_{1/2}$ , das aus den Spitzenstrompotentialen nach Gleichung 12 (Kapitel 3.1.11) bestimmt wird, kann überprüft werden, welche Verbindung an der Elektrode reagiert. Finden vor- oder nachgelagerte chemische Redoxreaktionen zwischen dem Mediator  $K_3Fe(CN)_6$  beziehungsweise  $K_4Fe(CN)_6$  statt, vermindern sich die Spitzenströme beim Durchlaufen mehrerer Zyklen.

Um zu untersuchen, ob *p*HBA an der Elektrode oxidiert beziehungsweise reduziert werden kann, wurde anaeroben M9-Medium *p*HBA zugegeben. Im mit *p*HBA supplementierten Medium wurden fünf zyklische Voltammogramme (CVs) mit einer Vorschubgeschwindigkeit von  $1 \text{ mV s}^{-1}$  aufgenommen (Abbildung 46 A). Im untersuchten Potentialbereich von  $-0,100 \text{ V}$  bis  $+0,500 \text{ V}$  (versus  $Ag/AgCl$ ) konnte bei keinem der fünf CVs eine Erhöhung der Stromstärke beziehungsweise die Ausbildung eines Spitzenstroms festgestellt werden.

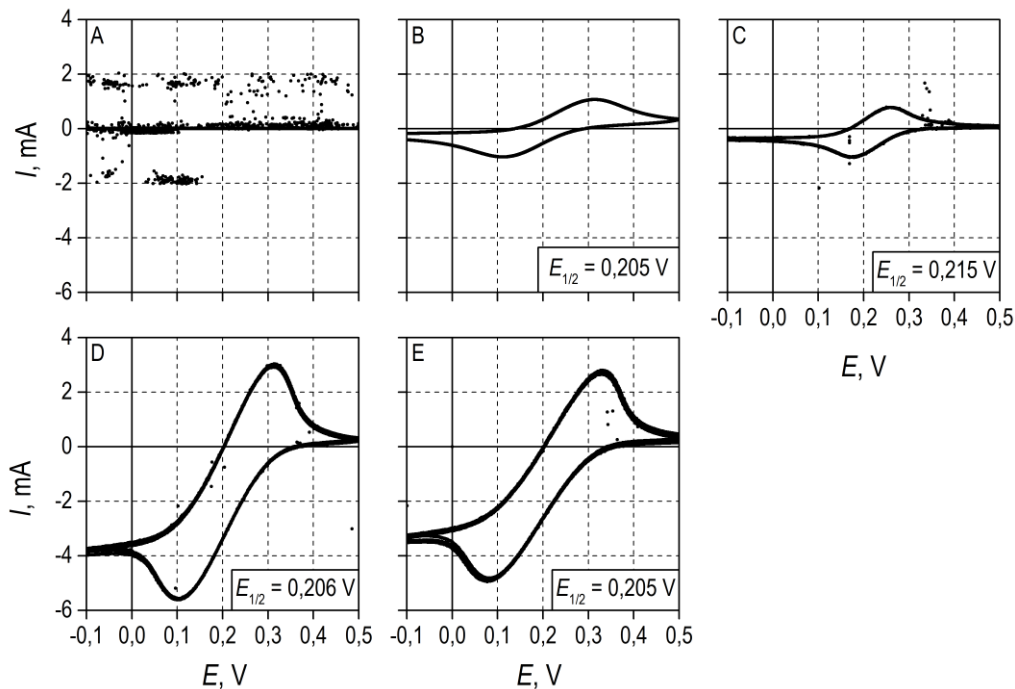


Abbildung 46 Untersuchung elektrochemischer Reaktionen und chemischer Redoxreaktionen von *p*HBA mittels zyklischer Voltammetrie. (A) M9-Medium mit 30 mg *p*HBA + 0 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; (B) M9-Medium mit 0 mg *p*HBA + 1 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; (C) M9-Medium mit 30 mg *p*HBA + 1 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; (D) M9-Medium mit 30 mg *p*HBA + 10 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; (E) M9-Medium mit 30 mg *p*HBA + 10 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  nach Oxidation bei +0,500 V für 24 h. Vorschubgeschwindigkeit  $1 \text{ mV s}^{-1}$ . Arbeitselektrodenpotential  $E$  versus Ag/AgCl.

Um zu untersuchen ob es zu vor- oder nachgelagerten Reaktionen zwischen *p*HBA und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  beziehungsweise  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  kommt, wurde dem Medium im Anschluss  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zugegeben und Konzentrationen von 1 mM (Abbildung 46 C) und 10 mM (Abbildung 46 D) eingestellt. Die Aufnahme der zyklischen Voltammogramme erfolgte wie zuvor mit einer Vorschubgeschwindigkeit von  $1 \text{ mV s}^{-1}$ . Es wurden jeweils fünf Zyklen aufgenommen. In beiden Fällen konnten anodische und kathodische Spitzenströme bestimmt werden, die sich im Verlauf der fünf Zyklen nicht verminderten. Die Halbstufenpotentiale lagen bei +0,215 V (1 mM) und +0,206 V (10 mM). Um zu überprüfen ob eine längere Polarisation auf das während der Satzprozesse mit Anodenatmung eingestellte Elektrodenpotential von +0,500 V zur Umsetzung von *p*HBA führt, wurde für 24 h eine Spannung von +0,500 V angelegt. Nach dem das Medium für 24 h bei einem Elektrodenpotential von +0,500 V inkubiert wurde, wurden erneut fünf CVs aufgenommen (Abbildung 46 E). Auch hier konnten die Ausbildung eines anodischen und eines kathodischen Spitzenstroms beobachtet werden, die sich ebenfalls nicht verminderten. Das Halbstufenpotential lag bei +0,205 V. Zusätzlich wurde als

Referenz das Halbstufenpotential von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in M9-Medium ohne *p*HBA bestimmt (0,205 V) (Abbildung 46 B).

Nach Aufnahme jedes CVs wurde die *p*HBA-Konzentration im Medium mittels HPLC bestimmt. Durch die Erhöhung der Mediatorkonzentration kam es zu einer Verdünnung des Mediums, die durch genaue Bestimmung der zugegebenen und entnommenen Volumina bei der Berechnung der *p*HBA-Masse berücksichtigt wurde (Abbildung 47). Diese Ergebnisse zeigten, dass es zu keiner signifikanten Änderung der Masse kam - weder durch elektrochemische Reaktionen mit der Elektrode, noch durch chemische Redoxreaktionen mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  oder  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

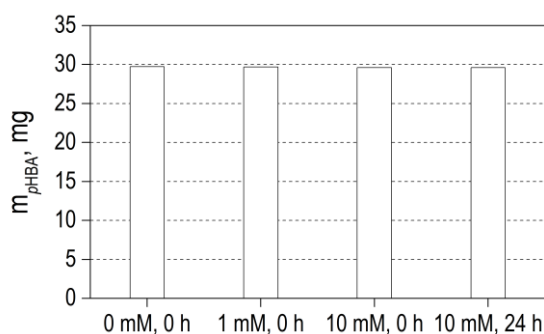


Abbildung 47 Elektrochemische Reaktionen und chemische Redoxreaktionen von *p*HBA bei Anodenatmung: Dargestellt sind die im Medium vorhandene Mengen an *p*HBA. Die durch die Erhöhung der Mediatorkonzentration verursachte Verdünnung des Mediums wurde durch genaue Bestimmung der zugegebenen und entnommenen Volumina bei der Berechnung der *p*HBA-Masse berücksichtigt.

## Diskussion

Für die CV des M9-Mediums mit *p*HBA und ohne Mediator konnte keine Ausbildung anodischer oder kathodischer Spitzenströme festgestellt werden. Dies zeigt, dass es im untersuchten Potentialbereich von -0,100 V bis +0,500 V zu keiner Oxidation oder Reduktion von *p*HBA an der Elektrode kam. Eine elektrochemische Reaktion an der Elektrodenoberfläche, die zur Verminderung von *p*HBA geführt haben könnte, kann somit ausgeschlossen werden.

Das zyklische Voltammogramm von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in M9-Medium ohne *p*HBA zeigte anodische und kathodische Spitzenströme, die der anodischen Oxidationsreaktion von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  und der kathodischen Reduktionsreaktion von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zugeordnet werden können. Gleichfalls, zeigten die CVs des Mediums mit *p*HBA und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  anodische und kathodische

Spitzenströme. Die aus den Spitzenstrompotentialen bestimmten Halbstufenpotentiale von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  im M9-Medium mit *pHBA* wichen um maximal 5% vom Halbstufenpotential von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  im M9-Medium ohne *pHBA* ab. Dies zeigt, dass es sich bei den jeweiligen Spitzenströmen im M9-Medium mit *pHBA* und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  um die anodische Oxidationsreaktion von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  und kathodische Reduktionsreaktion von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  handelt.

Da für die fünf CVs jedes Ansatzes keine Verschiebung der Halbstufenpotentiale und keine Ausbildung weiterer Spitzenströme beobachtet werden konnte, können vor- und nachgelagerte Reaktionen von *pHBA* mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  als auch  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  ausgeschlossen werden.

Die durchgeführte HPLC Analyse der *pHBA*-Konzentrationen bestätigte, dass es zu keiner Umsetzung von *pHBA* kam. Weder durch elektrochemische Reaktionen mit der Elektrode, noch durch chemische Redoxreaktionen mit  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

### **8.2.2 Umsetzung von *pHBA* mit *P. putida* KT2440 $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC***

Nachdem chemische und elektrochemische Reaktionen zwischen *pHBA*,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  und der Elektrode ausgeschlossen werden konnten, wurde die Metabolisierung von *pHBA* durch *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* untersucht. *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* wurde dazu unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben im Dreifachansatz kultiviert. Die Biomassekonzentration wurde photometrisch bestimmt, die *pHBA*-Konzentration mittels HPLC. Das definierte M9-Medium enthielt als einzige Kohlenstoffquelle *pHBA*. Die Vorkultur wurde in LB-Medium hergestellt. Vor der Inokulation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um eine Verschleppung anderer Kohlenstoffquellen aus dem Komplexmedium der Vorkultur zu vermeiden.

Wie Abbildung 48 zeigt, kam es innerhalb von 24 h zu einer Erhöhung der Biomassekonzentration um  $0,057 \text{ g L}^{-1}$ , während sich die *pHBA*-Konzentration um  $0,082 \text{ g L}^{-1}$  verminderte.



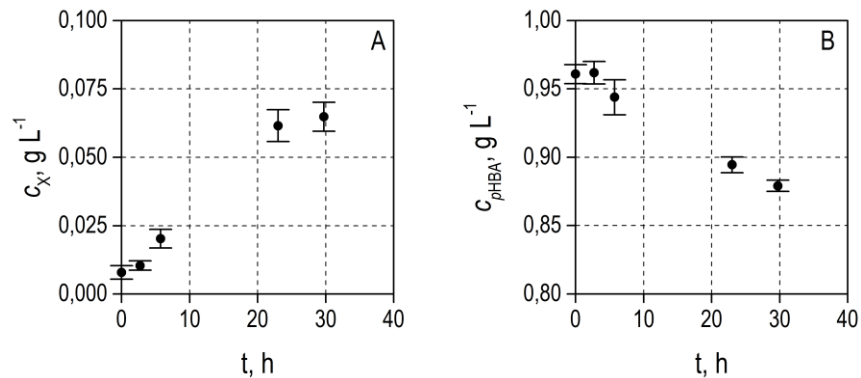


Abbildung 48 Untersuchung der Metabolisierung von *p*HBA durch *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$ . Dargestellt sind Biomassekonzentrationen (A) und *p*HBA-Konzentrationen (B) für Satzprozesse mit *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im 1 L-Schüttelkolben (Dreifachansatz) in M9-Medium mit *p*HBA als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle. Arbeitsvolumen 200 mL.

## Diskussion

Die Untersuchungen der Metabolisierung von *p*HBA durch *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  zeigten, dass dieser Stamm trotz der Deletion des Gens *pobA* zur Metabolisierung von *p*HBA in der Lage ist. Im Metabolismus von *P. putida* KT2440 kommt *p*HBA als Reaktant in drei enzymatisch katalysierten Reaktionen vor.

Bei der ersten Reaktion handelt es sich um die Synthesereaktion ausgehend von Chorismat über die Chorismat-Pyruvat-Lyase, die durch das Gen *ubiC* kodiert wird. Die Chorismat-Pyruvat-Lyase kann in *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  mittels der entsprechenden Gensequenz im Vektor pSEVA überexprimiert werden. Diese Reaktion ist reversibel und könnte so die Metabolisierung von *p*HBA ermöglichen.

Bei der zweiten Reaktion handelt es sich um die durch die Deletion von *pobA* unterbrochene Umsetzung von *p*HBA zu 3,4-Dihydroxybenzoat durch die 4-Hydroxybenzoat-5-Hydroxymonooxygenase. Ein Abbau von *p*HBA über den Ortho-Weg sollte somit ausgeschlossen sein.

Bei der dritten Reaktion werden *p*HBA und Polyprenyldiphosphat über die Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferase, die durch das Gen *ubiA* kodiert wird, zu 3-Polyprenyl-4-Hydroxybenzoat umgesetzt. 3-Polyprenyl-4-Hydroxybenzoat ist eine Zwischenstufe der Ubichinol-Synthese.

Da keine weiteren Reaktionen mit *p*HBA als Reaktant gefunden wurden, wird *p*HBA entweder über den Ubichinol-Synthese-Weg abgebaut oder über die Umsetzung mit Pyruvat zu Chorismat mittels der Chorismat-Pyruvat-Lyase.

## 9 Untersuchung der Anodenatmung in einem Rührkesselreaktor

Nachdem durch die Identifikation eines geeigneten Mediators für den externen Elektronentransfer die Grundvoraussetzung für die Anodenatmung von *P. putida* KT2440 geschaffen worden war und für die Umsetzung von Citrat der *p*HBA-Ertrag im Vergleich zum aeroben Satzprozess im Rührkesselreaktor bereits gesteigert wurde, wurden in einem zum bio-elektrochemischen System umgebauten Rührkesselreaktor (Elektro-Rührkesselreaktor) die potentiell limitierenden Prozessparameter Elektrodenoberfläche, Stofftransport und Mediatorkonzentration untersucht.

### 9.1 Einfluss der Arbeitselektrodenoberfläche

Die Arbeitselektrode stellt eine zentrale Komponente jedes bio-elektrochemischen Systems dar. Sie fungiert während der Anodenatmung als terminaler anodischer Elektronenakzeptor. In dem hier untersuchten System erfolgte der Elektronentransfer vom Mikroorganismus zur Elektrodenoberfläche mittels des Mediators  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Wie vorhergehende Untersuchungen (Kapitel 7 und 8) gezeigt haben, kam es zur partiellen Anlagerung von Zellen in Form eines Biofilms auf der Elektrodenoberfläche, während gleichzeitig Zellen in Suspension vorlagen.

Sowohl für die Zellen in Suspension als auch für die Zellen im Biofilm auf der Elektrode ist eine effiziente Oxidation des Mediators an der Elektrodenoberfläche wichtig, damit es während des Prozesses nicht zu einer vollständigen Reduktion des Mediators kommt. Eine vollständige Reduktion des Mediators würde zu einer Limitierung des mikrobiellen externen Elektronentransfers führen.

Dabei ist zu beachten, dass die Biofilmbildung auf der Elektrodenoberfläche zu einer Änderung der für den Mediator zugänglichen Oberfläche führt und sich mit steigender Biomassekonzentration nicht nur die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge an Mediator (mikrobielle Mediatorreduktionsrate) erhöht, sondern gleichzeitig auch die zur Regeneration verfügbare Elektrodenoberfläche vermindert wird. Aus diesem Grund sollte eine Elektrode identifiziert werden, die eine effiziente Oxidation des Mediators erlaubt und deren Oberflächeneigenschaften gleichzeitig die Biofilmbildung auf der Elektrode vermindert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Graphit-Stabelektrode, eine Graphit-Bürstenelektrode und eine Graphit-Vlieselektrode untersucht. Da alle aus demselben Material bestehen, weisen sie identische elektrochemische Eigenschaften auf. Das Material Graphit ist für die Oxidation von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  gut

geeignet (zyklisches Voltammogramm von  $K_3Fe(CN)_6$ , Kapitel 7.2.3). Der wesentliche Unterschied zwischen den hier untersuchten Elektroden besteht in den unterschiedlichen Elektrodengeometrien und -oberflächen (Tabelle 14).

Tabelle 14 Projizierte, geometrische und spezifische Oberflächen der Graphit-Stab-, Graphit-Bürsten- und Graphit-Vlieselektrode Die projizierten Oberflächen aller Elektroden wurden als Rechtecke angenommen. Die geometrischen Oberflächen wurden über die geometrischen Körper Zylinder (Stab- und Bürstenelektrode) und Quader (Vlieselektrode) angenähert. Spezifische Oberflächen wurden mittels Brunauer-Emmett-Teller-Methode bestimmt. Die Fotos zeigen Graphit-Stab-, Graphit-Bürsten- und Graphit-Vlieselektroden vor und nach der Anwendung zur Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ .

	Graphit-Stab	Graphit-Bürste	Graphit-Vlies
Projizierte Oberfläche, cm <sup>2</sup>	5,28	22,50	19,87
Geometrische Oberfläche, cm <sup>2</sup>	18,98	159,00	43,50
Spezifische Oberfläche, m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup>	0,750*	299	409

Vor der anodischen Anwendung



Nach der anodischen Anwendung



\*: Bestimmung basiert auf geometrischer Oberfläche und Masse.

Um die verwendeten Elektrodenmaterialien zu charakterisieren, wurden die spezifischen Elektrodenoberflächen mit der Brunauer-Emmett-Teller-Methode (BET) bestimmt. Die spezifischen Oberflächen der Bürsten- und Vlieselektroden lagen bei 299 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> und 409 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> (Tabelle 14). Die spezifische Oberfläche der Stabelektrode war zu gering, um sie mittels BET messen zu können. Sie wurde deshalb über die geometrische Oberfläche, für die ein Zylinder angenommen wurde, und die gravimetrisch bestimmte Masse abgeschätzt (0,750 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>).

Die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Elektrodenoberflächen wurde im 1 L-Rührkesselreaktor durchgeführt, der wie in Kapitel 4.8 beschrieben modifiziert wurde und so als bioelektrochemisches System betrieben werden konnte. Die Prozesse wurden bei einer Rührerdrehzahl von 400 rpm durchgeführt. Die Prozessparameter pH und Temperatur wurden auf pH 7,0 und 30 °C geregelt. Substrat-, Biomasse- und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen wurden durch Probenahmen offline mittels HPLC beziehungsweise photometrisch bei 600 nm (Biomasse) und 420 nm ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) bestimmt. Als Arbeitselektroden wurden eine Graphit-Stab-, eine Graphit-Bürsten- und eine Graphit-Vlieselektrode verwendet. Die Arbeitselektroden wurden auf ein Potential von +0,500 V (versus Ag/AgCl) polarisiert.

Mit der Inokulation wurde bei der Anodenatmung im Satzverfahren mit *P. putida* KT2440  $\Delta\text{pobA}/\text{pSEVA-ubiC}$  innerhalb der initialen 50 h eine Verminderung der Biomassekonzentrationen festgestellt. Diese betragen  $0,04 \text{ g L}^{-1}$  (Stab-Elektrode),  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  (Graphit-Bürste) und  $0,03 \text{ g L}^{-1}$  (Vlies-Elektrode). Im weiteren Prozessverlauf stiegen die Biomassekonzentrationen wieder an. Am Ende der Prozesse wurden – bezogen auf die Biomasse zum Zeitpunkt der Inokulation – in den Prozessen mit Stab- und Vlieselektrode Zunahmen von  $0,02 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt. Im Prozess mit der Bürstenelektrode wurde die Anfangsbiomassekonzentration nicht erreicht (Abbildung 49 A-C). Während der Prozesse mit der Bürsten- und Vlieselektrode konnte die Bildung von Biofilmen auf den Elektrodenoberflächen beobachtet werden. Die Biofilmbildung auf Bürsten- und Vlieselektrode war deutlich sichtbar, während auf der Stab-Elektrode makroskopisch keine Biofilmbildung zu beobachten war (Tabelle 14).

In den Prozessen wurden mit Stab-, Bürsten- und Vlieselektrode absolute Stromstärken ( $I$ ) von 2,48 mA, 2,47 mA und 6,35 mA erreicht. Die Stromdichten ( $j$ ) wurden bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche bestimmt, da dies die am häufigsten verwendete Bezugsgröße darstellt (Sharma *et al.*, 2014). Die höchste Stromdichte ( $0,47 \text{ mA cm}^{-2}$ ) wurde mit der Stabelektrode erreicht, obwohl diese Elektrode, unabhängig von der verwendeten Bezugsoberfläche, die kleinste Elektrodenoberfläche aufweist (Abbildung 49 J). Die für die Bürsten- und Vlieselektrode beobachteten maximalen Stromdichten lagen bei  $0,11 \text{ mA cm}^{-2}$  und  $0,32 \text{ mA cm}^{-2}$  (Abbildung 49 K, L).

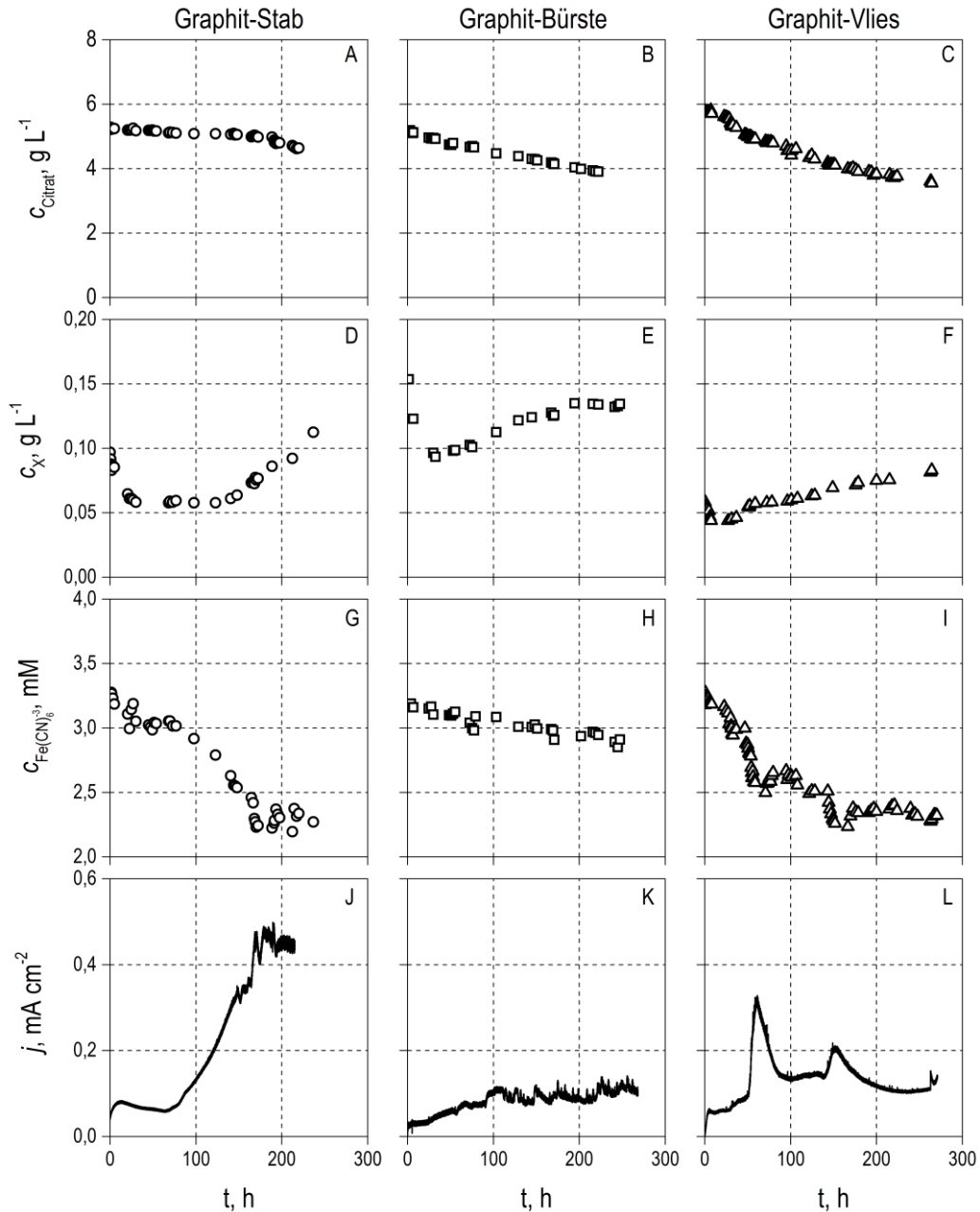


Abbildung 49 Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* im Satzverfahren: Untersuchung unterschiedlicher Elektroden. Elektroden: Graphit-Stab ( $\circ$ ), Graphit-Bürste ( $\square$ ), Graphit-Vlies ( $\Delta$ );  $c_i$ : Konzentration der Komponente  $i$ ; X: Biomasse;  $j$ : Stromdichte bezogen auf die projizierten Elektrodenoberflächen. Arbeitselektrodenpotentiale: +0,500 V (versus Ag/AgCl), Arbeitsvolumen: 1 L; Rührergeschwindigkeit 400 rpm; Temperatur 30 °C.

Für alle untersuchten Elektroden konnte keine vollständige Reduktion des Mediators ( $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ ) (Abbildung 49 G-I) beobachtet werden, sodass während der kompletten Prozesszeit ein externer Elektronentransfer von den Zellen zum Mediator stattfinden konnte. Die Verminderung der

$K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration durch die mikrobielle Reduktion zu  $K_4Fe(CN)_6$  war mit allen drei Elektroden vergleichbar. Dabei wurde Citrat unabhängig von der verwendeten Elektrode zeitlich linear umgesetzt (Abbildung 49 A-C).

### 9.1.1 Diskussion

Ziel der oben beschriebenen Untersuchungen mit unterschiedlichen Elektroden war es, eine Elektrode zu identifizieren, die eine gute Regeneration des Mediators  $K_3Fe(CN)_6$  gewährleistet und die Bildung von Biofilm vermindert. Dazu wurden drei Graphitelektroden untersucht, die sich deutlich in ihren Oberflächen unterschieden. Es handelte sich hierbei um eine massive, nicht-poröse Graphit-Stabelektrode, sowie um zwei poröse Elektroden (Bürsten- und Vlieselektrode) mit hohen spezifischen Oberflächen. Wie ein Vergleich der spezifischen Elektrodenoberflächen mit unbehandelten Graphitmaterialien aus der Literatur zeigt, liegen die mittels BET bestimmten Oberflächen in der zu erwartenden Größenordnung (Li *et al.*, 2006).

Durch die Wahl des Elektrodenmaterials wurde die Grenzfläche zwischen Medium und Elektrode, an der die Oxidation des Mediators stattfinden kann, für die Bürsten- und Vlieselektrode bezogen auf die spezifische Oberfläche der Stabelektrode um das 375-fache (Bürstenelektrode) beziehungsweise das 510-fache (Vlieselektrode) erhöht. Die maximale Stromstärke der Stabelektrode (2,48 mA) war der der Bürstenelektrode (2,47 mA) trotz der signifikant höheren Oberfläche der Bürstenelektrode nahezu identisch. Die Stromstärke der Vlieselektrode (6,35 mA) erhöhte sich im Vergleich zur Stabelektrode um 156 %. Publierte Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen der Steigerung von Stromdichten und der Erhöhung der Elektrodenoberflächen beleuchten, zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass sich die Stromdichten, trotz Erhöhungen der Elektrodenoberfläche um das bis zu 10 000-fache, nur um das 2-3-fache steigern ließen (Harrington *et al.*, 2015; Gnana-Kumar *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2011 und Logan *et al.*, 2006).

Eine Erklärung für die im Vergleich zur Oberflächenvergrößerung nur sehr geringe Steigerung der Stromstärke erlaubt die Gegenüberstellung der Transportvorgänge an heterogenen chemischen Katalysatoren: Die wesentliche Einschränkung der heterogenen Katalyse liegt in der begrenzten Zugänglichkeit der katalytisch aktiven Zentren infolge von Stofftransportlimitierungen. Edukt- und Produktmoleküle müssen zunächst Diffusionswiderstände in der Grenzschicht um die Katalysatorpartikel überwinden. Der Stofftransport der Reaktanten zu den aktiven Zentren im Inneren eines porösen Katalysatorpartikels erfolgt durch Porendiffusion (Behr *et al.*, 2010). Der mediatorvermittelte Elektronentransfer stellt eine ebensolche heterogene Reaktion dar. Werden poröse Elektroden

verwendet, kommt es neben der Diffusion in der Grenzschicht auch zur Porendiffusion. Durch die Einstellung von Porengröße (effektiver Diffusionskoeffizient in den Katalysatorporen,  $D_e$ ) und Partikeldurchmesser (charakteristische Länge,  $L$ ) in Abhängigkeit von der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ( $k$ ) und der Konzentration des Reaktanten an der Oberfläche ( $c_{OF}$ ) können Aktivitätsbeeinträchtigungen durch Porendiffusion vermindert werden (Behr *et al.*, 2010). Über den Thiele-Modul  $\Phi$  mit

$$\Phi = L \cdot \sqrt{(k \cdot c_{OF}^{n-1})/D_e} \quad 32$$

kann basierend auf diesen Parametern abgeschätzt werden, ob die Reaktionsrate ( $\Phi < 0,1$ ) oder aber die interne Diffusion ( $\Phi > 3$ ) die Reaktion limitiert (Speight und Özüim, 2001). Entsprechend Gleichung 32 ist zu erwarten, dass die Porendiffusionswiderstände proportional mit der Größe des Katalysators (hier der Elektrode)  $L$  steigen, wenn  $k$ ,  $c_{OF}$  und  $D_e$  konstant bleiben.

Auf den Oberflächen der Bürsten- und Vlies-Elektrode wurde Biofilmbildung beobachtet, die den Stofftransport des Mediators zur Elektrodenoberfläche und zurück in das Medium zusätzlich vermindert. Spätestens mit der Biofilmbildung steigen Diffusionswiderstände so stark an, dass die hohe spezifische innere Oberfläche poröser Elektroden für die Regeneration des Mediators vernachlässigt werden kann und nur die äußere (geometrische) Oberfläche zur Verfügung steht.

Dies weist darauf hin, dass eine glatte, dem Mediator gut zugängliche Elektrodenoberfläche für die Anwendung in mediatorvermittelten bio-elektrochemischen Systemen vorteilhaft sein sollte und hochporöse Elektroden mit Biofilm keine signifikanten Vorteile bieten. Anhand der Ergebnisse konnte dies bestätigt werden, da die Abnahmen der  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration durch die mikrobielle Reduktion zu  $K_4Fe(CN)_6$  sowie die maximalen Stromstärken mit allen drei Elektroden vergleichbar waren.

Durch die Biofilmbildung wurde der Stofftransport von Substrat und Stoffwechselprodukten zu den Zellen im Biofilm beziehungsweise vom Biofilm ins Medium ebenfalls beeinträchtigt. Es ist anzunehmen, dass dies eine Ursache für die lineare Umsetzung des Substrates Citrat darstellt. Allerdings wurde auch im Satzprozess mit der Stabelektrode, auf der kein sichtbarer Biofilm gebildet wurde, eine lineare Verminderung der Citrat-Konzentration beobachtet. Eine Limitierung des externen Elektronentransfers durch eine vollständige Reduktion von  $K_3Fe(CN)_6$  wurde in keinem der Prozesse

beobachtet und kann somit ausgeschlossen werden. Es bleibt somit zu vermuten, dass die Zellen im Medium ebenfalls stofftransportlimitiert waren.

Die Steigerung des Stofftransportes sollte im Folgenden durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl untersucht werden. Die Untersuchungen wurden mit der Graphit-Stabelektrode durchgeführt. Für die Wahl der Stabelektrode sprachen die folgenden Gründe:

- Keine Biofilmbildung:
  - Genaue Bestimmung der Biomassekonzentration und spezifischer Reaktionsraten, da die Biomassekonzentration im Reaktor zu jedem Prozesszeitpunkt ermittelt werden kann und keine Zellen durch Anlagerung auf der Elektrodenoberfläche unberücksichtigt bleiben.
  - Eine während des Prozesses gleichbleibende Grenzfläche zwischen Medium und Elektrodenoberfläche, an der die Oxidation des Mediators stattfinden kann.
- Keine Porendiffusion
- Eine definierte Positionierung im Reaktor



## 9.2 Einfluss eines erhöhten Stofftransportes auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC

Der Einfluss des Stofftransportes auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC wurde in zwei Satzprozessen untersucht, in denen die Rührergeschwindigkeit variiert wurde. Als Arbeitselektrode wurde in beiden Experimenten eine Graphit-Stabelektrode verwendet. Die Versuche wurden im modifizierten 1,8 L-Rührkesselreaktor durchgeführt. Biomasse- und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Citrat- und pHBA-Konzentrationen wurden mittels HPLC gemessen. Der pH wurde auf pH 7,0 geregelt.

Dabei wurde die Rührergeschwindigkeit beginnend bei einer Prozesszeit von 120 h innerhalb von 30 h schrittweise von 400 rpm (volumenspezifischer Leistungseintrag  $0,61 \text{ W L}^{-1}$ ) auf 700 rpm ( $3,27 \text{ W L}^{-1}$ ) erhöht. Im Referenzprozess wurde für die gesamte Prozesszeit eine konstante Rührergeschwindigkeit von 400 rpm eingestellt (Abbildung 50 A).

Innerhalb der ersten 120 h waren die Rührergeschwindigkeiten in beiden Prozessen auf 400 rpm eingestellt und die Verläufe von Substrat-, Biomasse-, pHBA- und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen zeigten vergleichbare Verläufe. Ebenso wurden ähnlich Stromdichten gemessen.

Für den Zeitraum zwischen 120 h und 150 h während der Rührerdrehzahlerhöhung von 400 rpm auf 700 rpm konnte eine Verdopplung der Biomassekonzentration festgestellt werden (Abbildung 50 E) Zwischen 150 h und 250 h konnte eine weitere Zunahme der Biomassekonzentration auf  $0,92 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet werden, sodass zu Prozessende ein Biomassertrag von  $0,14 \text{ molC}_X \text{ molC}^{-1}_{\text{Citrat}}$  bestimmt wurde. Im Referenzprozess bei 400 rpm erhöhte sich die Biomassekonzentration während des Prozesses von  $0,11 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,14 \text{ g L}^{-1}$ .

Während innerhalb der ersten 120 h bei 400 rpm  $1 \text{ g L}^{-1}$  Citrat von *P. putida* KT2440  $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC umgesetzt wurde, wurden bei erhöhter Rührerdrehzahl in den folgenden 120 h bis zu Prozessende die verbleibenden  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  Citrat vollständig metabolisiert (Abbildung 50 B). Im Referenzprozess wurden zu Prozessende noch  $3,27 \text{ g L}^{-1}$  ( $Y_{\text{pHBA,S}} = 0,14 \text{ mmol}_{\text{pHBA}} \text{ molC}^{-1}_{\text{Citrat}}$ ) Citrat erreicht.

Mit der Erhöhung der Rührerdrehzahl nach 120 h konnte ein Übergang von linearer zur exponentieller pHBA-Produktion beobachtet werden und die pHBA-Konzentration stieg innerhalb von 30 h um

0,8 mg L<sup>-1</sup> an während in den ersten 120 h bei 400 rpm nur 1 mg L<sup>-1</sup> gebildet worden war (Abbildung 50 B). Ab einer Prozesszeit von 170 h konnte dann eine Abnahme der pHBA-Konzentration beobachtet werden. Im Referenzprozess nahm die pHBA-Konzentration linear zu und erreichte zu Prozessende eine Konzentration von 3,27 mg L<sup>-1</sup>.

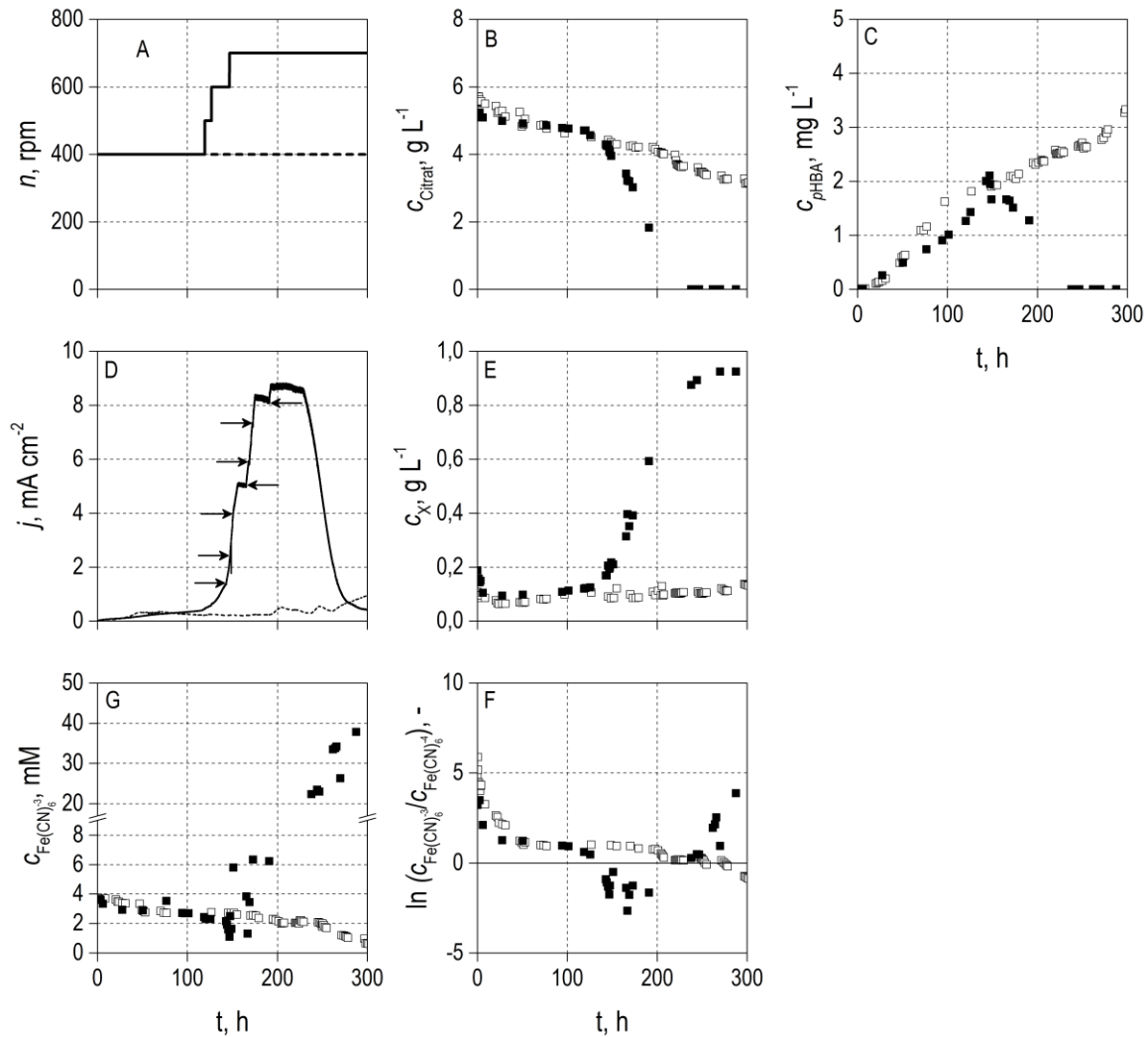


Abbildung 50 Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im Satzverfahren im Rührkesselreaktor: Einflüsse erhöhter Rührergeschwindigkeit und Mediatorkonzentrationen auf die Anodenatmung. Gestrichelte Linie und  $\square$ : Konstante Rührergeschwindigkeit ( $n = 400$  rpm); Schwarze Linie und  $\blacksquare$ : Erhöhte Rührergeschwindigkeit ( $n = 400$  rpm bis 700 rpm). Pfeile in Abbildung D zeigen manuelle Zugaben von  $K_3Fe(CN)_6$ .  $c_i$ : Konzentration der Komponente  $i$ ;  $X$ : Biomasse;  $j$ : Stromdichte bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche. Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl), Arbeitsvolumen: 1 L; Temperatur 30 °C; pH 7,0.

Nachdem bei einer Prozesszeit von 150 h die maximale Rührerdrehzahl erreicht worden war, wurde  $K_3Fe(CN)_6$  bis zu einer Prozesszeit von 250 h mehrfach manuell zugegeben, um eine vollständige Reduktion des verfügbaren Mediators zu vermeiden (Abbildung 50 D, G). Zu Prozessende wurde so eine Mediator-Konzentration von 43 mM erreicht. Im Referenzprozess war eine  $K_3Fe(CN)_6$ -Zugabe bis Prozessende nicht notwendig.

Mit der Erhöhung der Rührerdrehzahl stieg die Stromdichte steil an bis bei einer Prozesszeit von 195 h wurde eine konstante Stromdichte von  $8,57 \text{ mA cm}^{-2}$  gemessen wurde (Abbildung 50 D). Obwohl zu diesem Zeitpunkt noch Citrat vorhanden war und  $6 \text{ mM } K_3Fe(CN)_6$  vorlagen, konnte kein weiterer Stromanstieg beobachtet werden. Im Referenzprozess wurde eine maximale Stromdichte von  $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$  erreicht.

Im Vergleich zum Referenzprozess, der bei 400 rpm durchgeführt wurde, konnte der Biomasseertrag durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 700 rpm um einen Faktor von 14 von  $0,01 \text{ molC}_X \text{ molC}^{-1}_{\text{Citrat}}$  auf  $0,14 \text{ molC}_X \text{ molC}^{-1}_{\text{Citrat}}$  gesteigert werden. Die Stromdichte wurde um einen Faktor von 9,4 von  $0,91 \text{ mA cm}^{-2}$  auf  $8,57 \text{ mA cm}^{-2}$  erhöht. Die spezifische Substrataufnahmerate erhöhte sich von  $0,42 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  auf  $0,66 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$  um 57 %.

Wie oben bereits beschrieben wurde, wurde im Satzprozess mit erhöhter Rührergeschwindigkeit zu Prozessende kein *pHBA* mehr nachgewiesen (Abbildung 50 C). Die Abnahme der *pHBA*-Konzentration begann ab einer Prozesslaufzeit von 170 h. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Verhältnis  $K_3Fe(CN)_6$  zu  $K_4Fe(CN)_6$   $0,08 \text{ mM mM}^{-1}$  ( $\ln(c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}) = -2,5$ ) (Abbildung 50 F). Für den Referenzprozess wurde zu diesem Zeitpunkt ein Verhältnis von  $2,5 \text{ mM mM}^{-1}$  ( $\ln(c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}) = 0,95$ ) gemessen, das im weiteren Prozessverlauf langsam auf  $0,44 \text{ mM mM}^{-1}$  ( $\ln(c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}) = -0,82$ ) abnahm. Das Verhältnis  $c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}$  war im Referenzprozess somit immer um mindestens das 5,5-fache größer als im Prozess mit erhöhter Rührerdrehzahl.

### 9.2.1 Diskussion

Im Rahmen des oben beschriebenen Versuches sollte der Einfluss des Stofftransportes auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  im Satzverfahren untersucht werden. Die Erhöhung des Stofftransportes wurde durch eine Steigerung der Rührerdrehzahl von 400 rpm ( $0,61 \text{ W L}^{-1}$ ) auf 700 rpm ( $3,27 \text{ W L}^{-1}$ ) erreicht und konnte die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  signifikant verbessern. Es wurde eine um 57 % schnellere Citrat-Umsetzung

sowie Steigerungen des Biomasseertrags und der Stromdichte um das 14-fache und das 9,4-fache erreicht.

Allerdings kam es nach einer Prozesslaufzeit von 170 h zu einer Abnahme der *p*HBA-Konzentration, die für den Referenzprozess nicht beobachtet werden konnte. Der Vergleich der Satzprozesse zeigte, dass das Verhältnis  $c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}$  im Referenzprozess um das 5,5-fache größer war als im Prozess mit erhöhter Rührerdrehzahl. Es wurde eine gleichzeitige Verminderung der *p*HBA-Konzentration und des Verhältnisses  $c_{K_3Fe(CN)_6}/c_{K_4Fe(CN)_6}$  beobachtet, was auf einen Zusammenhang hindeutet. Eine Erklärung dieser Beobachtung ist möglich, wenn man zwischen dem Potential der Anode und dem Redoxpotential im Medium unterscheidet.

Über das Potential der Anode können Zellen beeinflusst werden, die sich in der unmittelbaren Nähe der Elektrode befinden und ihre Elektronen über direkten Kontakt zur Elektrode (Anode) abgeben können. Über das Potential der Elektrode kann somit nur für Mikroorganismen, die über einen direkten Elektronentransfermechanismus verfügen, geregelt werden, welche Redoxreaktionen an der Elektrode möglich sind. *P. putida* KT2440 benötigt jedoch einen Mediator ( $K_3Fe(CN)_6$ ), der den externen Elektronentransfer vermittelt (Kapitel 7). Über das Potential der Elektrode, das vom Potentiostaten eingestellt wird, kann demnach nur die Regeneration des Mediators nach der folgenden Reaktionsgleichung (Tabelle 15) beeinflusst werden.

Tabelle 15 Redoxreaktion an der Anode bei mediatorvermittelter Anodenatmung. Die Redoxreaktion ist nach der IUPAC-Konvention angeben.  $[M_{red}]$ : Konzentration der reduzierten Mediatorspezies;  $[M_{ox}]$ : Konzentration der oxidierten Mediatorspezies;  $E_{Anode}$ : Potential der Anode;  $K_i$ : Gleichgewichtskonstante der Redoxreaktion.

Redoxreaktion	Potential	Gleichgewichtskonstante
$M_{red} \rightarrow M_{ox} + z e^-$	$E_{Anode}$	$K_{Anode} = \frac{[M_{ox}] \cdot [e^-]^z}{[M_{red}]}$

Im Medium, also in größerer Entfernung zur Elektrode, finden zwei weitere Redoxreaktionen I und II (Tabelle 16) statt, die das Redoxpotential im Medium bestimmen. Wird Reaktion II von Reaktion I subtrahiert, ergibt sich Reaktion III. Reaktion III beschreibt die Umsetzung von Substrat zu Produkt und Biomasse durch den Mikroorganismus unter Verbrauch von oxidiertem Mediator.

Tabelle 16 Redoxreaktionen im Medium bei mediatorvermittelter Anodenatmung. Die Redoxreaktionen sind nach der IUPAC-Konvention angeben. [S]: Substratkonzentration; [P]: Produktkonzentration; [X]: Biomassekonzentration; [M<sub>red</sub>]: Konzentration der reduzierten Mediatorspezies; [M<sub>ox</sub>]: Konzentration der oxidierten Mediatorspezies; E<sub>i</sub>: Potential der Redoxreaktion; K<sub>i</sub>: Gleichgewichtskonstante der Redoxreaktionen I und II

Redoxreaktion	Potential	Gleichgewichtskonstante
I $S \rightarrow P + X + z e^-$	$E_I$	$K_I = \frac{[P] \cdot [X] \cdot [e^-]^z}{[S]}$
II $M_{red} \rightarrow M_{ox} + z e^-$	$E_{II}$	$K_{II} = \frac{[M_{ox}] \cdot [e^-]^z}{[M_{red}]}$
III $S + M_{ox} \rightarrow P + X + M_{red}$	$E_{Medium} = E_I - E_{II}$	

Jede der Halb-Reaktionen I und II besitzt ein Redoxpotential  $E_I$  und  $E_{II}$ , über die die Triebkraft des gesamten Redoxsystems berechnet werden kann. Die Triebkraft entspricht dem Redoxpotential im Medium  $E_{Medium}$  und ist die Differenz von  $E_I$  und  $E_{II}$ :

$$E_{Medium} = E_I - E_{II} \tag{33}$$

Ist  $E_I = E_{II}$ , befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht und das thermodynamische Gleichgewichtspotential im Medium ( $E_{Medium}^0 = E_I^0 - E_{II}^0$ ) kann durch Einsetzen der Nernst-Gleichung (Kapitel 3.1) wie folgt berechnet werden:

$$E_I^0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(K_I) = E_{II}^0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(K_{II}) \tag{34}$$

$$E_I^0 - E_{II}^0 = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln\left(\frac{K_{II}}{K_I}\right) \tag{35}$$

$$E_{Medium}^0 = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{[M_{ox}] \cdot [e^-]^z \cdot [S]}{[M_{red}] \cdot [P] \cdot [X] \cdot [e^-]^z}\right) = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{[M_{ox}] \cdot [S]}{[M_{red}] \cdot [P] \cdot [X]}\right) \tag{36}$$

- $E_i^0$  Redoxpotential im thermodynamischen Gleichgewicht, V
- $R$  Allgemeine Gaskonstante,  $R = 8,314 \text{ J (mol K)}^{-1}$
- $T$  Temperatur, K

$z$	Ladungszahl, -
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96\,485,34 \text{ C mol}^{-1}$
$K_i$	Gleichgewichtskonstante der Reaktionen I und II, Einheit abhängig von der Reaktionsordnung
$[M_{\text{ox}}]$	Konzentration der oxidierten Mediatorspezies, $\text{g L}^{-1}$
$[M_{\text{red}}]$	Konzentration der reduzierten Mediatorspezies, $\text{g L}^{-1}$
$[S]$	Substratkonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$[P]$	Produktkonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$[X]$	Biomassekonzentration, $\text{g L}^{-1}$

Gleichung 36 erlaubt die Berechnung des Redoxpotentials im Medium im thermodynamischen Gleichgewicht, das jedoch in lebenden Zellen nie erreicht werden kann (da „Leben“ durch die Eigenschaft charakterisiert ist, einen Zustand außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts einzunehmen und „Tot“ durch das Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichtes definiert ist (Balakireva *et al.*, 1974; Kjaergaard, 1977)). Die Gleichung zeigt dennoch, dass das Redoxpotential im Medium eine Funktion des Verhältnisses oxidiertes zur reduzierter Mediatorkonzentration und der mikrobiellen Aktivität ist.

Durch die Erhöhung des Stofftransports kam es zu einer Zunahme der Biomassekonzentration und damit zu einer erhöhten Reduktion des Mediators, sodass dieser an der Elektrode nicht mehr in ausreichender Geschwindigkeit regeneriert werden konnte. Dies führte höchstwahrscheinlich zu einer Verschiebung des Redoxpotentials im Medium, das sich mit dem Verhältnis  $c_{\text{K3Fe(CN)6}}/c_{\text{K4Fe(CN)6}}$  änderte. Durch eine Änderung des Redoxpotentials im Medium kann der mikrobielle Stoffwechsel beeinflusst werden (Peguin und Soucaille, 1996). Dies könnte zu der beobachteten Verstoffwechslung von *pHBA* (Abbildung 50 C) geführt haben.

Da schon von Peguin und Soucaille (1996) beschrieben wurde, dass Redoxpotentialänderungen im Medium in einem bio-elektrochemischen System einen deutlichen Einfluss auf das Produktspektrum von *Clostridium acetobutylicum* hatten, wurde in den weiteren Versuchen zusätzlich eine galvanisch getrennte Redox-Sonde verwendet. Diese erlaubt eine online-Messung des Redoxpotentials im Medium. Damit sollte der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis  $c_{\text{K3Fe(CN)6}}/c_{\text{K4Fe(CN)6}}$ , dem Redoxpotential im Medium und dessen Einfluss auf die Mikroorganismen untersucht werden.

### 9.3 Einfluss des Redoxpotentials im Medium auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC

Da vorhergehende Untersuchungen (Kapitel 9.2) einen Einfluss des Redoxpotentials im Medium auf die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC vermuten ließen, wurde dies in einem weiteren Experiment untersucht. Anstelle des zuvor verwendeten 1,8 L-Rührkesselreaktors wurde ein 3,6 L-Rührkesselreaktor eingesetzt. Dies war notwendig, da im 1,8 L-Rührkesselreaktor keine freie Deckeldurchführung für die zusätzliche Redox-Sonde mehr verfügbar war. Die Redox-Sonde erlaubte eine genaue Bestimmung des Redoxpotentials im Medium. Dieses kann zusätzlich zum Mediator auch durch die Zellen, den pH und die Bildung von Nebenprodukten beeinflusst werden. Das Potential des Mediums ( $E_{\text{Medium}}$ ) wird bezogen auf das Potential der Ag/AgCl-Referenz angegeben. Der Reaktor wurde mit einer Rührerdrehzahl von 400 rpm betrieben. Die Prozessparameter pH und Temperatur wurden auf pH 7,0 und 30 °C geregelt. Das Arbeitsvolumen betrug 2,5 L. Substrat-, Biomasse- und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentrationen wurden durch Probenahmen offline mittels HPLC beziehungsweise photometrisch bei 600 nm (Biomasse) und 420 nm ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) bestimmt. Als Arbeitselektroden wurde eine Graphit-Stabelektrode verwendet, die auf +0,500 V (versus Ag/AgCl) polarisiert wurde.

Der im Medium enthaltene Mediator ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 3 mM) wurde vor der Inokulation über Nacht oxidiert. Zu Prozessbeginn wurde im Medium ein Potential von +375 mV gemessen (Abbildung 51 A). Dieser Wert ist um 22 % geringer als das über die Nernst-Gleichung unter alleiniger Berücksichtigung des Mediatorverhältnisses abgeschätzte Potential von +459 mV.

Der im Folgenden dargestellte Prozess lässt sich in vier Phasen aufteilen (Abbildung 51).

#### Phase I

Während Phase I, die mit der Inokulation beginnt, befanden sich die Zellen in einem Zustand, der eine schnelle Umsetzung von Citrat ermöglichte (Abbildung 51 B). Die Stromdichte stieg schnell an (Abbildung 51 D) und das Redoxpotential des Mediums sank um etwa 75 mV auf +300 mV (Abbildung 51 A). Nach einer Prozesszeit von 6 h kam es zur Bildung von *p*HBA (Abbildung 51 C). Die Nebenproduktbildung (Malat, Fumarat und ein nicht identifizierter Metabolit) begann direkt mit der einsetzenden Umsetzung von Citrat (Abbildung 51 F, I, J).

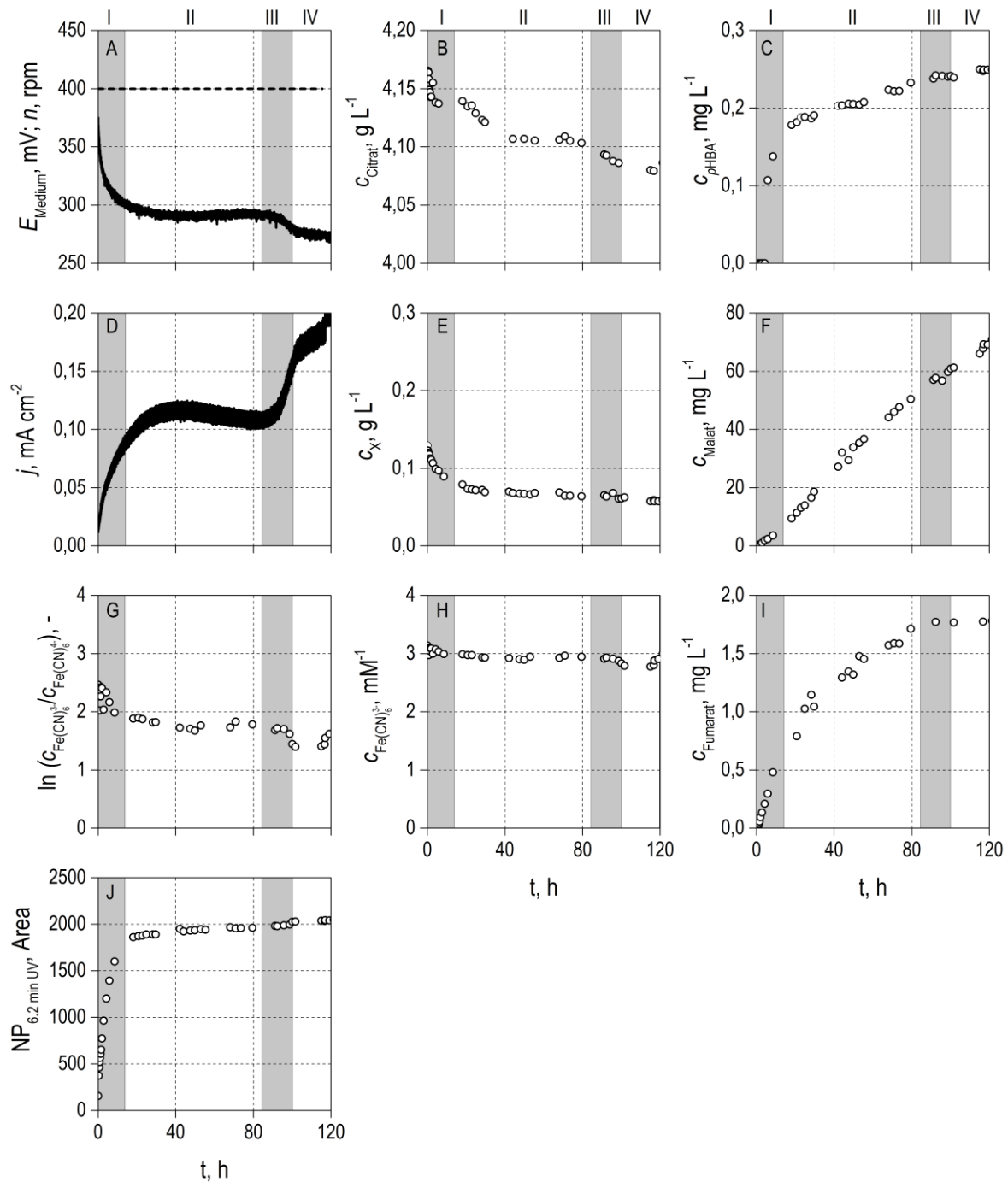


Abbildung 51 Umsetzung von Citrat mit *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im anaeroben Satzverfahren mit Anodenatmung: Einfluss des Redoxpotentials des Mediums auf die Anodenatmung. (A) Rührergeschwindigkeit ( $n$ ; gestrichelte Linie) und Redoxpotential im Medium ( $E_{\text{Medium}}$ ; durchgezogene Linie, versus Ag/AgCl);  $c_i$ : Konzentrationen der Komponente  $i$ ;  $X$ : Biomasse  $j$ : Stromdichte bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche. Grau hinterlegte Flächen zeigen Phasen unterschiedlicher metabolischer Aktivität. Arbeitselektrode: Graphit-Stab; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl), Arbeitsvolumen: 2,5 L; Temperatur 30 °C; pH 7,0.



### Phase II

Am Anfang von Phase II (14 h) kam es zu einem plötzlichen Abbruch der Bildung des nicht identifizierten Metaboliten (Abbildung 51 J). Des Weiteren konnte eine Abnahme der Citrat-Aufnahme sowie der *p*HBA- und Fumarat-Bildung beobachtet werden. Die Malat-Konzentration stieg weiterhin stetig an. Die Biomassekonzentration näherte sich während Phase II einem Wert von  $0,07 \text{ g L}^{-1}$  an, der nach 44 h konstant blieb (Abbildung 51 B, C, E, F, I). Nach 40 h erreichten die Zellen einen zweiten metabolischen Zustand. Dieser zeichnete sich durch eine Verminderung der Citrat-Aufnahme und einer stetigen Abnahme der Fumarat-Bildung aus. Während Phase II blieb das Redoxpotential im Medium unverändert bei +300 mV.

### Phase III

Zu Beginn von Phase III (82 h) stagnierte die Fumarat-Bildung bei  $1,75 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 51 B, I). Im weiteren Verlauf erreichten die Zellen einen dritten metabolischen Zustand, in dem eine Steigerung der Citrat-Aufnahme (Abbildung 51 B) und eine Zunahme der Stromdichte (Abbildung 51 D) beobachtet wurden. Diese führte zu einer Verminderung der Redoxpotentials im Medium um etwa 30 mV auf +270 mV (Abbildung 51 A).

### Phase IV

Am Ende von Phase III kam es zu einer erneuten Abnahme der Citrat-Aufnahme (Abbildung 51 B), sodass ein weiterer Übergang der Zellen in einen vierten Zustand festzustellen war.

## 9.3.1 Diskussion

Das Ziel des oben gezeigten Versuchs war es, den Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Konzentrationen von oxidiertes und reduziertes Mediatorspezies  $\text{C}_{\text{K3Fe(CN)}_6}/\text{C}_{\text{K4Fe(CN)}_6}$ , dem Redoxpotential im Medium und dessen Einfluss auf den Mikroorganismus zu untersuchen. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass sich das mittels Redox-Sonde experimentell bestimmte Redoxpotential im Medium vor der Inokulation (+375 mV, Abbildung 51 A) von dem nach der Nernst-Gleichung unter alleiniger Berücksichtigung des Mediators abgeschätzten Potentials (+459 mV, Kapitel 9.3) um 22 % unterschied. Dies zeigt, dass im verwendeten M9-Medium weitere redoxaktive Komponenten vorhanden sind und das Redoxpotential im Medium beeinflussen.

Mit der Inokulation kam es innerhalb von 120 h zu einer Verminderung des Redoxpotentials von +375 mV auf +270 mV. Mit der Abnahme des Redoxpotentials konnte gleichzeitig die Verminderung

der  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Konzentration beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die Redoxpotentialänderungen, wie zuvor vermutet tatsächlich durch die Verschiebung des Verhältnisses  $\text{C}_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6}/\text{C}_{\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6}$  hervorgerufen werden.

Während des Satzverfahrens konnten vier Phasen unterschiedlicher metabolischer Aktivität identifiziert werden. Dabei reichte eine Änderung des Redoxpotentials im Medium um etwa 30 mV in Phase III aus, um den Metabolismus zu beeinflussen. Für *C. acetobutylicum* führte eine Änderung des Redoxpotentials im Medium um 22 mV zu drastischen Änderungen des Metabolismus (Peguín und Soucaille, 1996). Verglichen mit dieser Beobachtung von Peguín und Soucaille (1996) könnten die geringen Potentialänderungen im Medium durchaus ausreichend sein, um zu Änderungen der metabolischen Aktivität zu führen.

Da über das Redoxpotential im Medium die Verteilung der Stoffwechselprodukte im Medium beeinflusst wird, sollte es möglich sein, dies für die Verbesserung der *p*HBA-Produktion in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung zu nutzen. Dazu ist die Identifikation eines Redoxpotentials im Medium notwendig, das die *p*HBA-Bildung begünstigt. Ein solches Redoxpotential sollte im Folgenden identifiziert werden.

## 9.4 Identifikation verbesserter Prozessbedingungen für die *p*HBA-Bildung bei Anodenatmung

Wie in Kapitel 9.3 gezeigt werden konnte, beeinflusst das Redoxpotential im Medium die Verteilung der Stoffwechselprodukte. Dies sollte genutzt werden, um die *p*HBA-Produktion im anaeroben Satzprozess mit Anodenatmung zu verbessern. Gleichzeitig konnte in Kapitel 9.2 gezeigt werden, dass eine Verbesserung des Stofftransportes durch Erhöhung der Rührerdrehzahl zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität führt. Im Rahmen des im Folgenden dargestellten Versuches sollten deshalb beide Prozessvariablen betrachtet werden. Dazu wurde das Redoxpotential im Medium mit einer Redox-Sonde gemessen und die Rührergeschwindigkeit variiert. Es sollten Bedingungen identifiziert werden, die Phasen mit hoher metabolischer Aktivität bezüglich der *p*HBA-Bildung ermöglichen. Bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen handelt es sich um den Prozesszeitraum von 120 h – 580 h des in Kapitel 9.3 beschriebenen Prozesses.

Wie aus Abbildung 52 ersichtlich, wurde die höchste metabolische Aktivität für eine Rührergeschwindigkeit von 700 rpm ( $2,93 \text{ W L}^{-1}$ ) und einem Redoxpotentialbereich zwischen +180 mV und +270 mV (versus Ag/AgCl) bestimmt (Abbildung 52 A). Diese äußerte sich in einem steilen Anstieg der Stromdichte, der Zunahme von Biomasse-, Malat-, und *p*HBA-Bildung sowie der Citrat-Aufnahme und einer deutlichen Verminderung von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  durch die mikrobielle Reduktion zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Abbildung 52 B-H). Außerdem wurde das zuvor gebildete Fumarat verstoffwechselt (Abbildung 52 I).

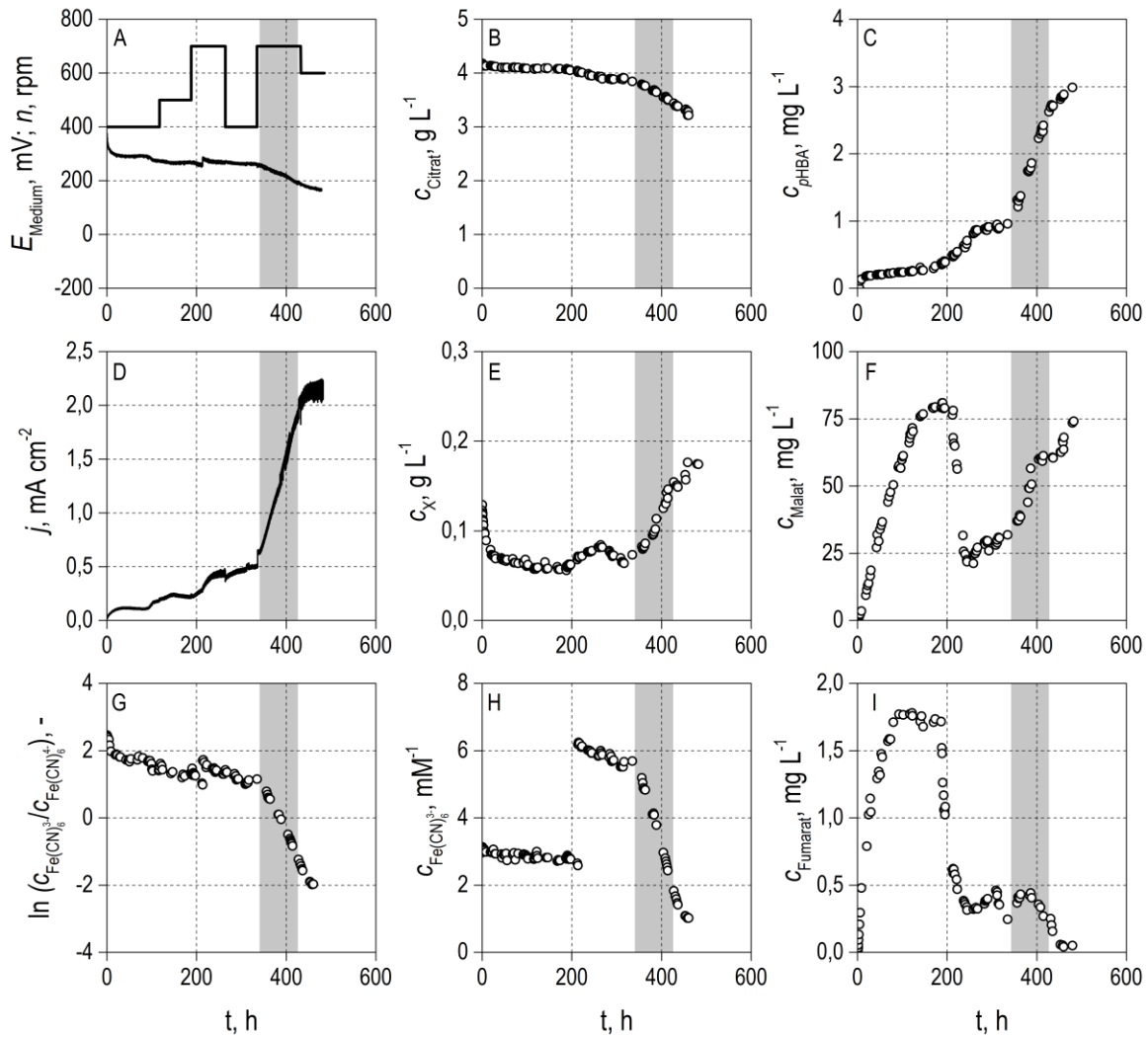


Abbildung 52 Anodenatmung im Satzverfahren mit *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im Rührkesselreaktor: Messung des Redoxpotentials im Medium bei unterschiedlichen Rührergeschwindigkeiten während der Produktion von pHBA. (A) Rührergeschwindigkeit ( $n$ ; gestrichelte Linie) und Redoxpotential im Medium ( $E_{\text{Medium}}$ ; durchgezogene Linie, versus Ag/AgCl).  $c_i$ : Konzentrationen der Komponente  $i$ ; X: Biomasse;  $j$ : Stromdichte bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche. Grauer Hintergrund: Reaktionsbedingungen, bei denen eine schnelle und stetige pHBA-Bildung beobachtet wurde. Arbeitselektrode: Graphit-Stab; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl), Arbeitsvolumen: 2,5 L; Temperatur 30 °C; pH 7,0.

### 9.4.1 Diskussion

Das Ziel des dargestellten Versuchs war die Identifikation von Prozessbedingungen (Redoxpotential im Medium und Rührergeschwindigkeit), die die *p*HBA-Bildung im Elektro-Rührkesselreaktor begünstigen. Es wurde ein für die *p*HBA-Bildung vorteilhafter Redoxpotentialbereich identifiziert. Dieser lag zwischen +180 mV und +270 mV (versus Ag/AgCl) bei einer Rührergeschwindigkeit von 700 rpm.

Verglichen mit dem Redoxpotential von Sauerstoff, das bei +623 mV (versus Ag/AgCl) liegt, erscheint die untere Grenze des Potentialbereichs von +180 mV (versus Ag/AgCl) gering. Dieses Potential ist jedoch größer als alle Redoxpotentiale der in Mikroorganismen vorkommenden Cytochrome (Kapitel 3.3.1). Somit könnte angenommen werden, dass innerhalb des identifizierten Potentialfensters die Oxidation aller Cytochrome möglich ist. Wie von Kracke *et al.* (2015) beschrieben, kann es jedoch durch der Veränderung intra- oder extrazellulären Bedingungen zu Verschiebungen der Redoxpotentiale der Cytochrome um bis zu 700 mV kommen. Aus diesem Grund kann nicht endgültig geklärt werden, ob in dem angegebenen Potentialfenster tatsächlich alle Cytochrome, die *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* besitzt, oxidiert werden können.

## 9.5 pHBA-Bildung bei Anodenatmung im Rührkesselreaktor unter verbesserten Prozessbedingungen

Im vorhergehenden Versuch wurden Prozessbedingungen (Rührergeschwindigkeit und Redoxpotential im Medium) identifiziert, die eine Verbesserung der pHBA-Bildung im Elektro-Rührkesselreaktor ermöglichen sollten. Der Potentialbereich für das Redoxpotential im Medium lag zwischen +180 mV und +270 mV (versus Ag/AgCl) bei einer Rührerdrehzahl von 700 rpm. Es wurde deshalb entschieden, das Redoxpotential auf den Mittelwert dieses Potentialbereichs (+225 mV, versus Ag/AgCl) zu regeln. Da vorhergehende Versuche gezeigt haben, dass der Mediator mittels der Graphit-Stabelektrode bei erhöhter metabolischer Aktivität der Zellen nicht mehr schnell genug regenerieren kann, wurde das Redoxpotential durch eine geregelte Zugabe einer 1 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Lösung kontrolliert.

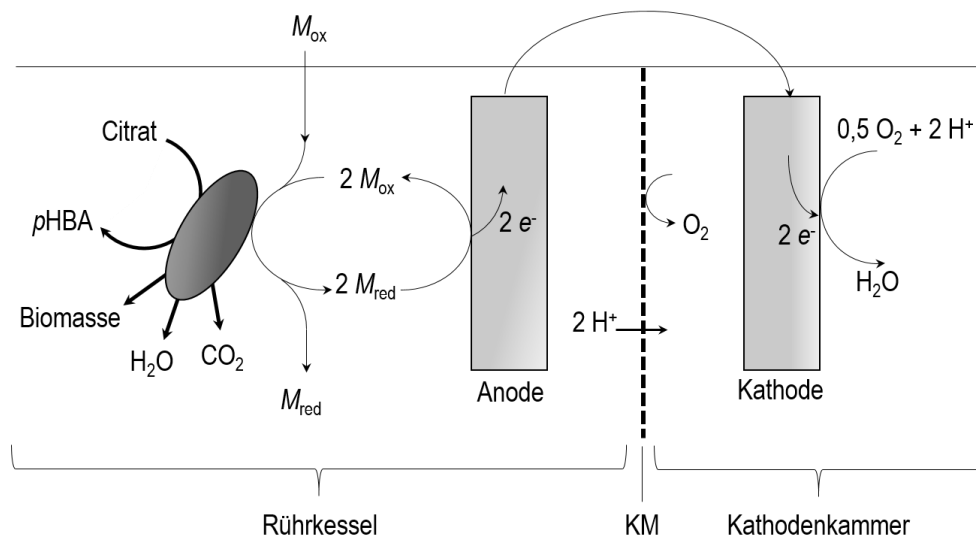


Abbildung 53 Schematische Darstellung der Anodenatmung und pHBA-Herstellung mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  im Rührkesselreaktor. KM: Kationenaustauschermembran; M: Mediator; ox: Oxidiert; red: reduziert.

Abbildung 53 zeigt eine schematische Darstellung des Prozesses mit Redoxpotentialkontrolle. Die Umsetzung des Substrates Citrat zu pHBA,  $\text{CO}_2$  und Biomasse wird durch den Mikroorganismus katalysiert. Um das Konzentrationsverhältnis der oxidierten und reduzierten Mediatorspezies während des Satzprozesses zu kontrollieren, wurde  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (oxidierte Form des Mediators) geregelt zugegeben.  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  wurde vom Mikroorganismus zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  reduziert und an der Anode wieder oxidiert. Die an die Anode abgegebenen Elektronen wurden an der Kathode auf den kathodischen

terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Um die Diffusion von Sauerstoff aus der Kathodenkammer in die anaerobe Anodenkammer zu vermeiden, wurde eine Kationenaustauschermembran verwendet. Diese ist für Protonen und Kationen permeabel. Protonen und Sauerstoff werden dann an der Kathode zu Wasser reduziert. Die Anodenatmung fand im Rührkessel statt, die Kathodenreaktion in der aus Glas angefertigten Kathodenkammer.

Der 3,6 L-Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 2,5 L wurde bei 700 rpm betrieben. Mit Ausnahme der Redoxpotentialregelung entsprach der Versuchsaufbau dem in Kapitel 9.3 und 9.4 beschriebenen Versuchsaufbau. Zu Prozessbeginn betrug die Mediatorkonzentration 0 mM (Abbildung 54 H). Das Redoxpotential im Medium wurde erst nach der Inokulation durch automatische Zugabe einer 1 M  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung auf +225 mV (versus Ag/AgCl) geregelt (Abbildung 54 A). Bis zu einer Prozesszeit von 300 h stieg die Stromdichte von  $0,01 \text{ mA cm}^{-2}$  auf  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  (Abbildung 54 D). Während dieser Zeit nahm die Citratkonzentration von  $5,4 \text{ g L}^{-1}$  auf  $3,1 \text{ g L}^{-1}$  ab (Abbildung 54 B), die pHBA-Konzentration stieg von  $0 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $2,7 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 54 C) und die Biomassekonzentration erhöhte sich von  $0,17 \text{ g L}^{-1}$  um  $0,03 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,20 \text{ g L}^{-1}$  (Abbildung 54 E). Die Fumaratkonzentration stieg von  $0 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $15 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 54 I) an und die Malatkonzentration von  $0 \text{ g L}^{-1}$  auf  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  (Abbildung 54 F). Der zu diesem Zeitpunkt bestimmte substratspezifische Malatertrag lag bei  $0,84 \text{ molC}_{\text{Malat}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  und zeigt, dass Citrat innerhalb der ersten 300 h hauptsächlich zu Malat umgesetzt wurde.

Im Folgenden konnte eine Abnahme der Malatbildung beobachtet werden. Diese korrelierte mit einem Anstieg der Stromstärke und der  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration und einer Abnahme der Fumaratkonzentration. Bei einer Prozesszeit von 420 h wurde die maximale Malatkonzentration von  $3,1 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Stromdichte das erste Maximum ( $7,55 \text{ mA cm}^{-2}$ ). Bis zu einer Prozesszeit von 420 h betrug die spezifische Citrataufnahmerate  $0,30 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ . Diese verminderte sich im Folgenden auf  $0,15 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ , was mit einer Abnahme der Stromstärke um  $0,6 \text{ mA cm}^{-2}$  korrelierte. Ab einer Prozesszeit von 470 h wurde eine Co-Metabolisierung von Citrat und Malat beobachtet. Die Fumaratkonzentration nahm ab diesem Zeitpunkt wieder zu. Während dieser Phase, die bis zu einer Prozesszeit von 600 h dauerte, erhöhte sich die spezifische Citrataufnahmerate wieder bis auf  $0,30 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$ . Die Stromdichte sowie die Biomasse- und pHBA-Konzentration stiegen ebenfalls an. Die Stromdichte erhöhte sich um  $5,6 \text{ mA cm}^{-2}$  von  $6,91 \text{ mA cm}^{-2}$  auf  $12,51 \text{ mA cm}^{-2}$ , die Biomassekonzentration stieg um  $0,24 \text{ g L}^{-1}$  von  $0,27 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,52 \text{ g L}^{-1}$  und die pHBA-Konzentration erhöhte sich um  $27,75 \text{ mg L}^{-1}$  von  $8,05 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $31,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

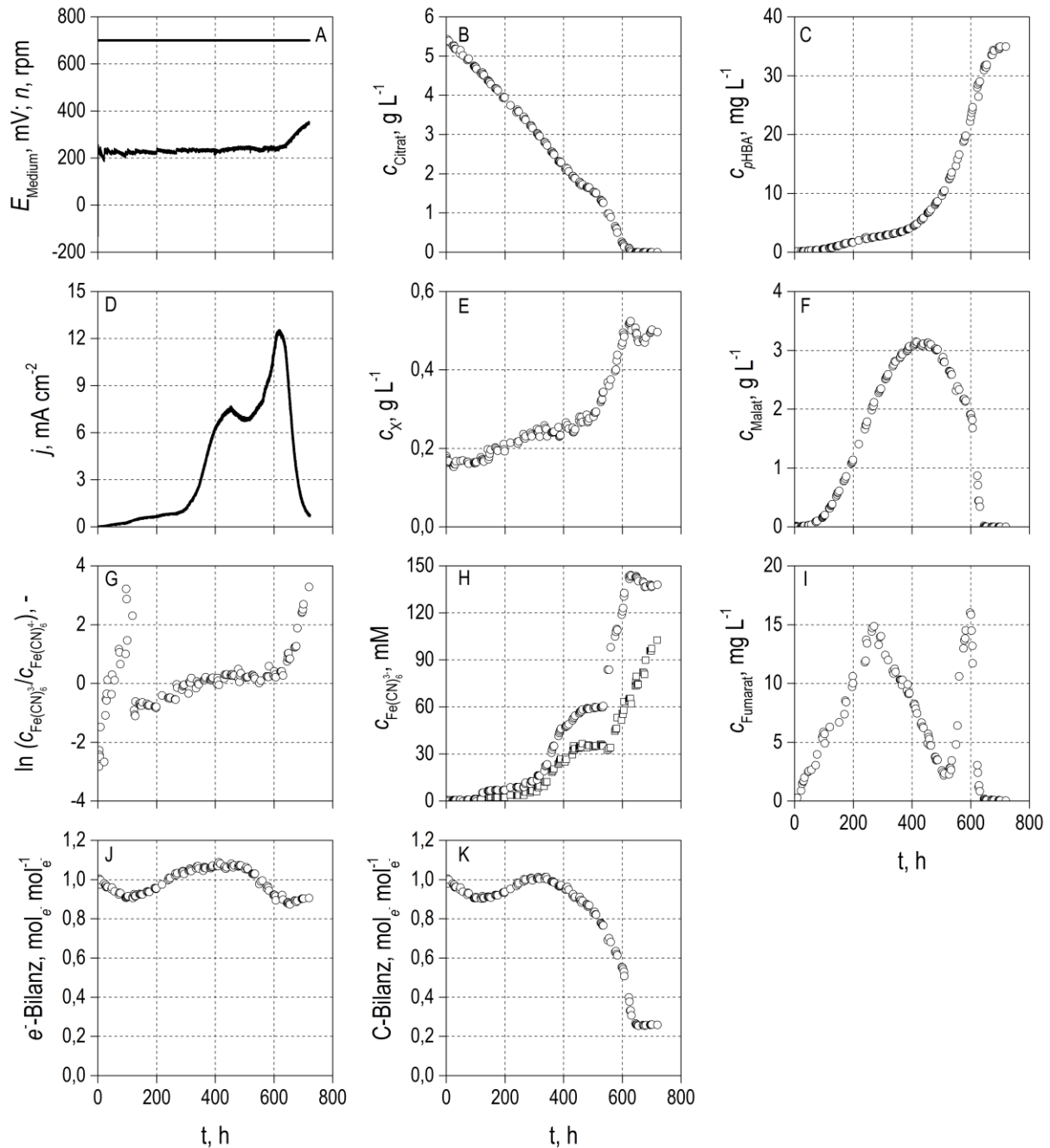


Abbildung 54: Verbesserte Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta pobA/pSEVA-ubiC$  im Rührkesselreaktor: Satzprozess bei einer Rührergeschwindigkeit von 700 rpm und einer Redoxpotentialregelung im Medium auf +225 mV (versus Ag/AgCl). (A) Rührergeschwindigkeit ( $n$ ; gestrichelte Linie) und Redoxpotential im Medium ( $E_{\text{Medium}}$ , durchgezogene Linie). (H) Gesamte Menge an Mediator im Reaktor ( $\circ$ ) und Menge des Mediators, die in oxidiertem Zustand vorlag ( $\square$ ).  $c_i$ : Konzentrationen der Komponente  $i$ ;  $X$ : Biomasse;  $j$ : Stromdichte bezogen auf die projizierte Elektrodenoberfläche. Arbeitselektrode: Graphit-Stab; Arbeitselektrodenpotential: +0,500 V (versus Ag/AgCl); Arbeitsvolumen: 2,5 L; Temperatur 30 °C; pH 7,0.



Nach der vollständigen Umsetzung von Citrat zu einer Prozesszeit von 600 h wurde eine Co-Metabolisierung von Malat und Fumarat beobachtet. Malat und Fumarat waren nach 640 h vollständig umgesetzt. Bis zu einer Prozesszeit von 675 h wurde ein weiterer Anstieg der *p*HBA-Konzentration von 31,5 mg L<sup>-1</sup> auf 36,1 mg L<sup>-1</sup> beobachtet. Dies korrelierte mit einer Abnahme der Biomassekonzentration von 0,51 g L<sup>-1</sup> auf 0,49 g L<sup>-1</sup>. Die Freisetzung von Kohlenstoffquellen durch die Lyse von Zellen könnte die weitere Erhöhung der *p*HBA-Konzentration ermöglicht haben. Allerdings lag die Wiederfindung der Elektronen in diesem Zeitraum nur bei 91 % (Abbildung 54 J) was darauf hinweisen kann, dass es zur Bildung weiterer Nebenprodukte gekommen war, die nicht identifiziert wurden. Zu Prozessende lagen die integralen substratspezifischen Biomasse- und *p*HBA-Erträge bei 0,07 molC<sub>x</sub> molC<sub>Citrat</sub><sup>-1</sup> und 9,91 mmolC<sub>*p*HBA} molC<sub>Citrat</sub><sup>-1</sup>. Die maximale spezifische Wachstumsrate lag bei 0,01 h<sup>-1</sup> und die maximale spezifische *p*HBA-Bildungsrate bei 0,003 mmol (g<sub>x</sub> h)<sup>-1</sup>.</sub>

Für die vollständige Oxidation von 1 mol Citrat zu 6 mol CO<sub>2</sub> werden 18 mol Elektronen benötigt (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> → 6 CO<sub>2</sub> + 18 H<sup>+</sup> + 18 e<sup>-</sup>). Zu Prozessbeginn lagen im Medium 0,07 mol Citrat vor. Wird Citrat vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert, könnten theoretisch 1,32 mol Elektronen an die Anode abgegeben werden. Wird die Menge an Citrat berücksichtigt, die durch Probenahme aus dem Reaktor entfernt wurde, standen während des Satzprozesses insgesamt 1,18 mol Elektronen zur Verfügung.

Anhand Gleichung 1 kann aus der Menge der Elektronen die theoretisch maximale Ladung abgeschätzt werden. Diese liegt unter Berücksichtigung der Entnahme von Citrat durch Probenahmen aus dem Reaktor bei 113 586 C. Experimentell wurden 1,27 mol Elektronen wiedergefunden, was einer Ladung von 122 152 C entspricht. Die Abweichung zwischen der theoretisch maximalen Ladung und der experimentell bestimmten Ladung betrug nach 700 h Prozesszeit 8 %. Die coulombsche Effizienz, die angibt, welcher Anteil der durch das Substrat zur Verfügung gestellten Elektronen an die Elektrode abgegeben wurde, lag bei 72 %. 1,3 % der Elektronen wurden für die Bildung von *p*HBA verwendet und 16 % für die Bildung von Biomasse.

Bis zum Zeitpunkt des vollständigen Substratverbrauchs nach 640 h wurde eine Ladung von 44 748 C gemessen, die an die Elektrode abgegeben wurde. Aus Gleichung 1 ergibt sich, dass auf diese Weise während des Prozesses 463 mmol K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> an der Elektrode oxidiert wurden. 81 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> – beziehungsweise 161 mmol K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> bei dem Mediumvolumen von 2 L zu diesem Zeitpunkt – lagen zu einer Prozesszeit von 640 h noch als K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> vor, sodass insgesamt 624 mmol K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> während des Prozesses reduziert wurden. Insgesamt betrug die K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-Konzentration zu

Prozessende im Reaktor 140 mM, was bei dem Mediumvolumen von 2 L zu diesem Zeitpunkt 280 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  entspricht (Abbildung 54 H).

Anhand der maximalen Stromstärke ( $I_{\text{max}} = 66,28 \text{ mA}$ ), die ebenfalls nach 640 h erreicht wurde, lässt sich die maximale Oxidationsrate von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  nach Gleichung 5 (Kapitel 3.1.3) berechnen, die bei  $0,041 \text{ mmol h}^{-1}$  liegt. Die Stromstärke nahm nicht wie in vorherigen Prozessen einen konstanten Wert an. Daher kann angenommen werden, dass die Oxidationsrate von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  der mikrobiellen Reduktionsrate von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  entspricht. Bezogen auf die gesamte Biomasse im Reaktor ( $1,03 \text{ g}_X$ ) zum Zeitpunkt der maximalen Oxidationsrate von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  nach 640 h lag die maximale spezifische mikrobielle Reduktionsrate von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  bei  $0,040 \text{ mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$ .

### 9.5.1 Diskussion

Durch die Regelung des Redoxpotentials im Medium war es in dem oben dargestellten Versuch möglich, den *p*HBA-Ertrag im Vergleich zum Satzprozess bei 400 rpm ohne Redoxpotentialregelung ( $0,14 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$ ) um das 70-fache zu steigern. Außerdem konnte die Metabolisierung von *p*HBA vermieden werden (Abbildung 54 C), die bei dem Satzprozess mit 700 rpm ohne Redoxpotentialregelung beobachtet worden war (Kapitel 9.2, Abbildung 50 C). Im Vergleich zu dem im aeroben Satzprozess (Kapitel 6.1) erreichten *p*HBA-Ertrag ( $5,87 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$ ) wurde der *p*HBA-Ertrag bei 700 rpm und Redoxpotentialregelung um 69 % gesteigert. Durch die Redoxpotentialregelung war es möglich, eine exponentielle *p*HBA-Produktion zu erreichen. Der so verbesserte *p*HBA-Ertrag ist damit mit den in der Literatur beschriebenen Erträgen aus aeroben Satzprozessen mit *Saccharomyces cerevisiae* ( $9,13 \text{ mmol}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$ , Substrat Glucose, Krömer *et al.*, 2013) und *Klebsiella pneumonia* ( $10,15 \text{ mmol}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_S^{-1}$ , Substrat Glucose, Müller *et al.*, 1995) vergleichbar.

Die Wiederfindung der Elektronen variierte während des Prozesses zwischen 91 % und 107 %. Dies kann durch Messungenauigkeiten bei der Bestimmung der Mediatorkonzentration bei sehr geringen Konzentrationen zu Prozessbeginn und sehr hohen Konzentrationen zu Prozessende, durch Fehler bei der Bestimmung des Probenvolumens und durch eine ungenaue gravimetrische Bestimmung der Masse des Mediums in der Anodenkammer aufgrund unterschiedliche Verdunstungseffekte in Anoden- und Kathodenkammer erklärt werden. Die Abweichung zwischen der theoretisch abgeschätzten maximal möglichen Menge an Elektronen, die bei vollständiger Oxidation von Citrat zu  $\text{CO}_2$  zur Verfügung stehen würden und der experimentell ermittelten Wiederfindung der Elektronen

betrug nach 700 h Prozesszeit 8 % und kann durch dieselben Messungenauigkeiten erklärt werden. Während des Satzprozesses wurden 1,3 % der Elektronen zur Bildung von *p*HBA verwendet und 16 % zu Bildung von Biomasse. Der größte Anteil (73 %) wurde extrazellulär an die Anode abgegeben. Dieser Anteil entspricht der coulombschen Effizienz des Prozesses und ist gut mit publizierten coulombschen Effizienzen anodischer Prozesse mit definierten Medien vergleichbar, für die Werte zwischen 70 % und 100 % angegeben werden (Aelterman *et al.*, 2008).

Zu Prozessende lagen im Medium 280 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  vor. Bis zu einer Prozesszeit von 640 h wurden insgesamt 624 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  reduziert, wovon 463 mmol  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  an der Anode regeneriert wurden. Im Prinzip kann der dargestellte Satzprozess mit Redoxpotentialregelung auch ohne Regeneration des Mediators an der Elektrode durchgeführt werden. In diesem Fall hätten etwa 620 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zugegeben werden müssen, damit *P. putida* KT2440  $\Delta\text{pobA}/\text{pSEVA-ubiC}$  alle Elektronen hätte abgeben können. Für die Einstellung des Redoxpotentials hätten weitere 620 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zugegeben werden müssen, um ein Verhältnis von  $c_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6}/c_{\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6} \approx 1$  einzustellen, was in etwa der Redoxpotentialregelung auf +225 mV entspricht. Dieser Vergleich zeigt, dass durch die Verwendung einer Elektrode als Elektronensenke zur Regeneration des Mediators statt den theoretisch abgeschätzten 1240 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  nur 280 mmol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  notwendig waren, was einer Einsparung von 77 % entspricht. Mit einer verbesserten Arbeitselektrode sollten hier weitere Verbesserungen möglich sein.

Durch die Co-Metabolisierung der Kohlenstoffquellen Citrat und Malat wurde zu Prozessende eine maximale Stromdichte von  $12,5 \text{ mA cm}^{-2}$  erreicht (Abbildung 54 D). Dies ist die höchste Stromdichte, die in Systemen mit nicht-porösen Arbeitselektroden bisher beschrieben wurde. Stromdichten für nicht-poröse Materialien wie Glaskohlenstoff und Graphitstäbe werden in der Literatur mit Werten von maximal  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  angegeben (Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Ketep *et al.*, 2014). Die Stromdichte von  $12,5 \text{ mA cm}^{-2}$ , die in diesem Versuch erreicht wurde, ist somit um das 12,5-fache größer. Die für hochporöse Elektroden beschriebenen Stromdichten liegen trotz der deutlich größeren Elektrodenoberflächen in derselben Größenordnung ( $12,87 \text{ mA cm}^{-2}$ , Massazza *et al.* (2015) und  $39 \text{ mA cm}^{-2}$ , Chen *et al.* (2012)). Dies bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 9.1 und 9.2, dass durch eine Verminderung der Stofftransportlimitierung unter Einsatz eines Mediators eine signifikante Erhöhung der Stromdichten möglich ist und dass die alleinige Vergrößerung von Elektrodenoberflächen durch Erhöhung der Porosität nicht zielführend ist.

Um die Anodenatmung weiter zu verbessern, ist die Verminderung der Prozesszeit notwendig. Eine einfache Möglichkeit stellt die Erhöhung der Biomassekonzentration dar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass mit der Erhöhung der Biomassekonzentration die (nicht-spezifische) mikrobielle Reduktionsrate steigt, während sich die elektrochemische Oxidationsrate an der Elektrode unter identischen Prozessbedingungen nicht ändern würde. Um eine Erhöhung der Mediatorkonzentration zu vermeiden, ist demnach die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche notwendig. Dabei sollten die in Kapitel 9.1 dargestellten Zusammenhänge – Vermeidung der Biofilmbildung und der Porendiffusion – berücksichtigt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die elektrochemische Oxidationsreaktion zu beschleunigen, wäre die Erhöhung des Elektrodenpotentials. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einem Anodenpotential von +0,500 V (versus Ag/AgCl) gearbeitet. Von einer weiteren Erhöhung des Anodenpotentials zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der anodischen Oxidationsreaktion des reduzierten Mediators an der Elektrode wurde abgesehen, um Sauerstoffbildung durch Wasserelektrolyse an der Anode sicher zu vermeiden. Des Weiteren könnte durch die Wahl eines anderen Redoxpotentials im Medium die Prozesszeit verkürzt werden.

Mit der Co-Metabolisierung von Citrat und Malat wurde eine signifikante Verbesserung der *p*HBA-Produktion und einer Erhöhung der metabolischen Aktivität beobachtet. Bei Beibehaltung der bereits untersuchten Bedingungen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass durch die Verwendung eines Substratgemisches (Citrat/Malat) eine Verbesserung der *p*HBA-Produktion erreicht werden könnte.

## 9.6 Vergleich zwischen Sauerstoffatmung und mediatorvermittelter Anodenatmung

Der im Folgenden dargestellte Vergleich zwischen Sauerstoff- und Anodenatmung wurde durchgeführt, um weitere Limitierungen der Anodenatmung zu identifizieren. Er sollte auch dazu dienen, Vor- und Nachteile der Sauerstoff- und Anodenatmung beurteilen zu können. Dazu wurden die Satzprozesse mit Sauerstoffatmung (Kapitel 6.1) und verbesserter Anodenatmung (Kapitel 9.5) mit *P. putida* KT24400  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* zur Umsetzung von Citrat zu *p*HBA verglichen.

Wie die vergleichende Darstellung der Satzprozesse mit Sauerstoff- und Anodenatmung zeigt, unterschieden sich die Substrat-, Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationsverläufe deutlich (Abbildung 55 A-F). Bei Sauerstoffatmung wurde direkt mit der Inokulation eine exponentielle Abnahme der Substratkonzentration sowie eine exponentielle Zunahme der Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen beobachtet. Nach einer Prozesszeit von 6 h war das Substrat Citrat vollständig metabolisiert (Abbildung 55 A, C, E). Die Biomasse- und *p*HBA-Erträge lagen zu Prozessende bei  $0,44 \text{ molC}_X \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  und  $5,84 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  (Tabelle 17). Bei Anodenatmung nahm die Citratkonzentration während des gesamten Prozesses linear ab und erst ab einer Prozesszeit von 300 h wurde eine exponentielle Zunahme der Biomasse- und *p*HBA-Konzentrationen beobachtet (Abbildung 55 B, D, F). Die Prozessdauer bis zur vollständigen Metabolisierung von Citrat betrug 600 h. Zu Prozessende wurden Biomasse- und *p*HBA-Erträge von  $0,07 \text{ molC}_X \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  und  $9,91 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  bestimmt (Tabelle 17). Damit war die Prozesszeit bei Anodenatmung um einen Faktor 100 länger als bei Sauerstoffatmung, die Biomasseerträge um einen Faktor von 6,3 geringer und die *p*HBA-Erträge um 69 % höher.

Die maximalen spezifischen Citrataufnahme-, *p*HBA-Bildungs- und Wachstumsraten waren bei Anodenatmung um eine Zehnerpotenz geringer als bei Sauerstoffatmung (Tabelle 17). Die anhand der maximalen elektrochemischen Oxidationsrate von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  ermittelte maximale mikrobielle Reduktionsrate ( $q_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6}$ ) lag im Satzprozess mit Anodenatmung bei  $0,040 \text{ mmol} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$  (Tabelle 17). Diese Rate stellt die Geschwindigkeit der Übertragung der Elektronen auf den terminalen Elektronenakzeptor dar und kann somit analog zur spezifischen Sauerstoffaufnahmerate ( $q_{\text{O}_2}$ ) betrachtet werden.  $q_{\text{O}_2}$  lag bei Sauerstoffatmung in der exponentiellen Phase zwischen  $9,19 \text{ mmol} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$  und  $21,16 \text{ mmol} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$  (Tabelle 17). Damit unterschieden sich  $q_{\text{O}_2}$  und  $q_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6}$  um einen Faktor von 100.

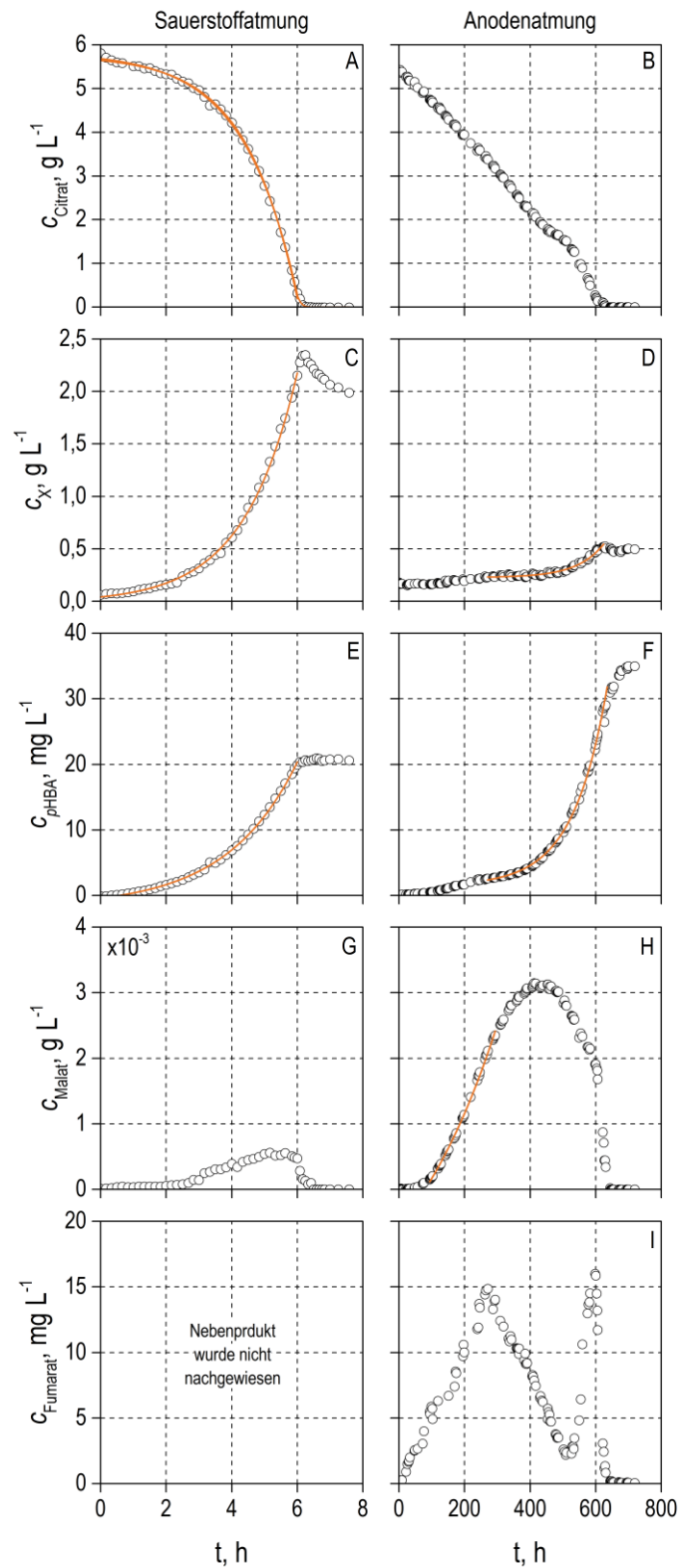


Abbildung 55 Vergleich von Sauerstoff- und Anodenatmung in Satzprozessen mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ . Orange Linie: Exponentielle Ausgleichsfunktionen.

Tabelle 17 Vergleich wichtiger Kenngrößen der Sauerstoff- und Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* zur Umsetzung von Citrat zu *pHBA*. Die Tabelle zeigt die maximalen Biomasse-, *pHBA*-, und  $\text{CO}_2$ -Erträge ( $Y_{X,\text{Citrat}}$ ,  $Y_{p\text{HBA,Citrat}}$  und  $Y_{\text{CO}_2,\text{Citrat}}$ ), die maximale spezifische Citrataufnahme-, Wachstums-, *pHBA*-Bildungs-,  $\text{CO}_2$ -Bildungs-,  $\text{O}_2$ -Aufnahme- und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Reduktionsrate ( $q_{\text{Citrat,max}}$ ,  $\mu_{\text{max}}$ ,  $q_{p\text{HBA,max}}$ ,  $q_{\text{CO}_2,\text{max}}$ ,  $q_{\text{O}_2,\text{max}}$  und  $q_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6,\text{max}}$ ), die molare Menge an  $\text{O}_2$  und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  die bis zum Erreichen der stationären Phase benötigt wurden ( $n_{\text{Elektronenakzeptor}}$ ) sowie die Prozesszeit bis zum vollständigen Substratverbrauch.  $c_i$ : Konzentration der Komponente  $i$ ; X: Biomasse; -: Wert wurde nicht bestimmt.

	Sauerstoffatmung	Anodenatmung
$Y_{X,\text{Citrat}}$ , $\text{molC}_X \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$	0,44	0,07
$Y_{p\text{HBA,Citrat}}$ , $\text{molC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$	5,84	9,91
$Y_{\text{CO}_2,\text{Citrat}}$ , $\text{molC}_{\text{CO}_2} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$	0,56	-
$-q_{\text{Citrat,max}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	8,38	0,30
$\mu_{\text{max}}$ , $\text{h}^{-1}$	0,65	0,01
$q_{p\text{HBA,max}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	0,05	0,003
$q_{\text{CO}_2,\text{max}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	42,56	-
$-q_{\text{O}_2,\text{max}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	21,16	-
$-q_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6,\text{max}}$ , $\text{mmol (g}_X \text{ h)}^{-1}$	-	0,04
$n_{\text{Elektronenakzeptor}}$ , mol	3,25	0,28
$c_{X, t=0}$ , $\text{g L}^{-1}$	0,10	0,18
$c_{\text{Citrat}, t=0}$ , $\text{g L}^{-1}$	5,80	5,43
$c_{p\text{HBA,max}}$ , $\text{g L}^{-1}$	20	35
$c_{\text{Malat,max}}$ , $\text{g L}^{-1}$	0,0006	3,12
$c_{\text{Fumarat,max}}$ , $\text{mg L}^{-1}$	0,00	15,86
Prozesszeit, h	6	640

Da im Prozess mit Anodenatmung aufgrund des sehr geringen Stickstoffvolumenstroms keine Messung des  $\text{CO}_2$  im Abgas durchgeführt werden konnte, ist kein Vergleich der substratspezifischen  $\text{CO}_2$ -Erträge möglich (Tabelle 17). Allerdings zeigt die Kohlenstoffbilanz des Prozesses mit Anodenatmung, dass zu Prozessende nur noch 25 % des Kohlenstoffs wiedergefunden werden konnten (Abbildung 54 K). Da zu Prozessende keine Nebenprodukte nachgewiesen wurden, müsste der  $\text{CO}_2$ -

Ertrag bei Anodenatmung bei etwa  $0,75 \text{ mol C}_{\text{CO}_2} \text{ mol C}_{\text{Citrat}}^{-1}$  gelegen haben und wäre damit um 32 % größer als bei Sauerstoffatmung.

Die Menge an Sauerstoff und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , die bis zur vollständigen Umsetzung von Citrat eingesetzt wurde, betrug bei Sauerstoffatmung 3,25 mol  $\text{O}_2$  und bei mediatorvermittelter Anodenatmung 0,28 mol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Von den 3,25 mol  $\text{O}_2$ , mit denen der Reaktor bis zum Prozessende bei einer Prozesszeit von 6 h begast wurde, wurden nur 0,03 mol  $\text{O}_2$  als Elektronenakzeptor benötigt, die verbleibenden 3,22 mol  $\text{O}_2$  wurden mit dem Abgasstrom wieder ausgetragen. Werden die substratspezifischen *p*HBA-Erträge auf die molare Menge des benötigten Elektronenakzeptors bezogen, ergibt sich, dass bei Sauerstoffatmung  $1,54 \text{ mmol}_{\text{pHBA}} (\text{mol}_{\text{Citrat}} \text{ mol}_{\text{O}_2})^{-1}$  und bei Anodenatmung  $30,34 \text{ mmol}_{\text{pHBA}} (\text{mol}_{\text{Citrat}} \text{ mol}_{\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6})^{-1}$  gebildet wurden.

Deutliche Unterschiede zwischen Sauerstoff- und Anodenatmung konnten auch bei der Nebenproduktbildung festgestellt werden (Tabelle 17 und Abbildung 55 G-I). Die maximalen Malatkonzentrationen lagen bei  $0,56 \text{ mg L}^{-1}$  (Sauerstoffatmung) und  $3,12 \text{ g L}^{-1}$  (Anodenatmung) und unterschieden sich damit um einen Faktor von etwa 5 600. Bei Anodenatmung wurde eine lineare Bildung und Metabolisierung des Nebenproduktes Fumarat beobachtet. Das Nebenprodukt Fumarat wurde bei Sauerstoffatmung nicht gebildet.

### 9.6.1 Diskussion

Anhand der Gegenüberstellung von Sauerstoff- und Anodenatmung wird deutlich, dass die Anodenatmung deutlich langsamer abläuft. Dies äußert sich in den maximalen Citrataufnahme-, *p*HBA-Bildungs- und Wachstumsraten, die bei Anodenatmung um eine Zehnerpotenz geringer waren als bei Sauerstoffatmung. Dabei wurde festgestellt, dass die Citratkonzentration bei Anodenatmung linear abnimmt, während bei Sauerstoffatmung eine exponentielle Abnahme der Citratkonzentration beobachtet wurde.

Citrat ist bei pH 7 dreifach negativ geladen ( $\text{pK}_1 = 3,14$ ;  $\text{pK}_2 = 4,77$  und  $\text{pK}_3 = 5,40$ ) und kann Ionen wie Magnesium oder Natrium komplexieren. Effekte von pH und komplexierenden Ionen sollten in den Prozessen mit Sauerstoff- und Anodenatmung vergleichbar sein, da in beiden Fällen das definierte M9-Medium verwendet wurde und der pH auf pH 7 geregelt wurde. Die Aufnahme von Citrat kann durch einen Symport von Magnesium, Natrium oder Protonen erfolgen (van der Rest *et al.*, 1991). Für *P. putida* KT2440 konnten keine Angaben bezüglich der für den Symport verwendeten Ionen



gefunden werden. Wird jedoch angenommen, dass die Citrataufnahme an einen Protonen-Symport gekoppelt ist, wie es beispielsweise für *Klebsiella pneumoniae* beschrieben ist (van der Rest *et al.*, 1991), könnte dies eine Erklärung für die lineare Citrataufnahme bieten. Dies soll im Folgenden erläutert werden.

Wie von Kracke *et al.* (2015) beschrieben, kann es durch Konzentrationsänderungen redoxaktiver Proteine zu Verschiebungen des Redoxpotentials um bis zu 700 mV kommen. In einem solchen Fall wäre das im Satzprozess mit Anodenatmung eingestellte Redoxpotential im Medium von +225 mV (versus Ag/AgCl) unter Umständen nicht mehr ausreichend, um alle redoxaktiven Proteine der Atmungskette zu oxidieren. In einem solchen Fall würde die Menge an Protonen verringert, die über die innere Membran gepumpt werden können. Dies hätte zur Folge, dass weniger Protonen für den Symport von Citrat zur Verfügung stehen.

Eine Verminderung der über die innere Membran transportierten Protonen würde außerdem zu einer Verminderung der ATP-Bildung führen, was bereits von Kracke *et al.* (2015) anhand von *in silico* Berechnungen für die Anodenatmung von *E. coli* postuliert wurde. Ein ATP-Mangel würde die geringeren Biomasseerträge und Wachstumsraten bei Anodenatmung sowie die daraus resultierenden längeren Prozesszeiten erklären. Da die Bildung von *p*HBA ebenfalls ATP-abhängig ist (Abbildung 16), könnte ein ATP-Mangel auch die geringeren maximalen spezifischen *p*HBA-Bildungsraten bei Anodenatmung erklären.

Des Weiteren wurde ein großer Unterschied von einem Faktor von 100 zwischen spezifischer mikrobieller Reduktionsrate und Sauerstoffaufnahmerate festgestellt. Diese beiden Raten geben die Geschwindigkeiten des externen Elektronentransfers bei Sauerstoff- und Anodenatmung an. Da im Prozess mit Anodenatmung und Kontrolle des Redoxpotentials im Medium keine konstanten Ströme gemessen wurden, wie es in vorherigen Prozessen mit Anodenatmung der Fall war, kann daraus abgeleitet werden, dass der externe Elektronentransfer zu keinem Zeitpunkt der limitierende Faktor war. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Jordan *et al.* (2010). Es wurde beschrieben, dass die Zeit zur Messung des biologischen Sauerstoffbedarfs mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  als Elektronenakzeptor verglichen mit Sauerstoff deutlich verkürzt werden konnte. Dies wird von Jordan *et al.* (2010) auf die bessere Löslichkeit von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zurück geführt, die mit etwa  $450 \text{ g L}^{-1}$  um einen Faktor von 10 000 größer ist als die Löslichkeit von  $\text{O}_2$  (etwa  $8 \text{ mg L}^{-1}$  bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Eine Limitierung des externen Elektronentransfers durch eine langsame Diffusion von  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  über die äußere Membran ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  mit einer molaren Masse von  $212 \text{ g mol}^{-1}$  klein genug

ist, um über Porine zu diffundieren, deren Ausschlussgrenze bei etwa 600 Da liegt (Dersch und Munk, 2008). Auch dies weist darauf hin, dass der externe Elektronentransfer bei Anodenatmung durch den mikrobiellen Metabolismus limitiert war, nicht aber durch die Elektronentransferreaktion.

Um festzustellen, wie hoch die Menge an *p*HBA pro Mol eingesetztem Elektronenakzeptor und Mol Citrat war, wurden die substratspezifischen *p*HBA-Erträge auf die molare Menge an O<sub>2</sub> und K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> bezogen. Diese Kenngröße zeigt, ob der *p*HBA-Ertrag durch die Wahl eines alternativen Elektronenakzeptors gesteigert werden kann. Die gebildete Menge an *p*HBA pro Mol K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und Mol Citrat war mit 30,34 mmol<sub>*p*HBA</sub> (mol<sub>Citrat</sub> mol<sub>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub></sub>)<sup>-1</sup> um das 20-fache größer als die Menge an *p*HBA, die pro Mol O<sub>2</sub> und Mol Citrat bei Sauerstoffatmung erreicht wurde (1,54 mmol<sub>*p*HBA</sub> (mol<sub>Citrat</sub> mol<sub>O<sub>2</sub></sub>)<sup>-1</sup>). Dies zeigt, dass durch mediatorvermittelte Anodenatmung eine deutlich Steigerung des *p*HBA-Ertrags unter Einsparung des Elektronenakzeptors möglich ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl bei Sauerstoff- als auch bei Anodenatmung nur geringe *p*HBA-Erträge erreicht werden konnten. Dies zeigt, dass zunächst mittels gentechnischer Methoden weitere Modifikationen notwendig sind um höhere *p*HBA-Erträge zu erreichen. Der Vergleich zwischen Sauerstoff- und Anodenatmung zeigt, dass es durch die Verwendung eines alternativen Elektronenakzeptors möglich ist, Produktausbeuten signifikant zu steigern. Die Anodenatmung hat zudem den Vorteil, dass die Menge des eingesetzten Elektronenakzeptors deutlich verringert werden kann. Dies beruht auf der im Vergleich zu O<sub>2</sub> deutlich besseren Löslichkeit von K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> sowie auf der Möglichkeit der Regenerierung von K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> an der Anode. Das geringere Biomassewachstum bei Anodenatmung hat den Vorteil, dass mehr Substrat zur Produktbildung zur Verfügung steht, resultiert aber in langen Prozesszeiten.

## 10 Zusammenfassung

Bereits vor über 100 Jahren wurde von Potter (1911) entdeckt, dass der Abbau organischer Verbindungen durch Mikroorganismen von der Übertragung elektrischer Energie begleitet wird. Diese Entdeckung führte von der Entwicklung mikrobieller Brennstoffzellen bis zur mediatorvermittelten elektrochemischen Regenerierung enzymatischer Co-Faktoren, an der bereits in den 1980er Jahren am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München geforscht wurde (Egerer *et al.*, 1982).

Im Laufe der Zeit wurde im Rahmen verschiedener Forschungsvorhaben eine große Zahl unterschiedlicher Reaktoren für diverse Anwendungen entwickelt. Dies führte dazu, dass eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowie eine vollständige Erfassung und Aufzeichnung wichtiger Prozessvariablen bis heute nicht gegeben ist. In der Bioverfahrenstechnik werden in der Regel zur reaktionstechnischen Charakterisierung von Prozessen Rührkesselreaktoren verwendet. Diese verfügen über Mess- und Regelungstechnik zur Erfassung und Regelung relevanter Prozessvariablen. Rührkesselreaktoren sind verfahrenstechnisch sehr gut charakterisiert und ermöglichen die stabile und homogene Einstellung der Reaktionsbedingungen. Ein Ziel dieser Forschungsarbeit war es deshalb, mittels reversibler Modifikationen eines Rührkesselreaktors ein bio-elektrochemisches System zu entwickeln, das die Vorteile des Rührkessels für die Elektrodenatmung nutzbar macht.

Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Bauteile entworfen, die einen einfachen, reversiblen und kostengünstigen Umbau eines kommerziell verfügbaren Laborrührkesselreaktors zu einem elektrochemischen System ermöglichen (Abbildung 56). In dem neu gestalteten Elektro-Rührkesselreaktor sind on-line Messung und Regelung von pH, Temperatur, Begasung, Rührergeschwindigkeit und Redoxpotential im Medium möglich.

Der Elektro-Rührkesselreaktor wurde anschließend für die reaktionstechnische Charakterisierung und prozesstechnische Verbesserung der Produktion von *para*-Hydroxybenzoesäure (*p*HBA) mit dem vom Projektpartner (Dr. Jens Krömer, University of Queensland, Australien) bereitgestellten Stamm *Pseudomonas putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* genutzt.

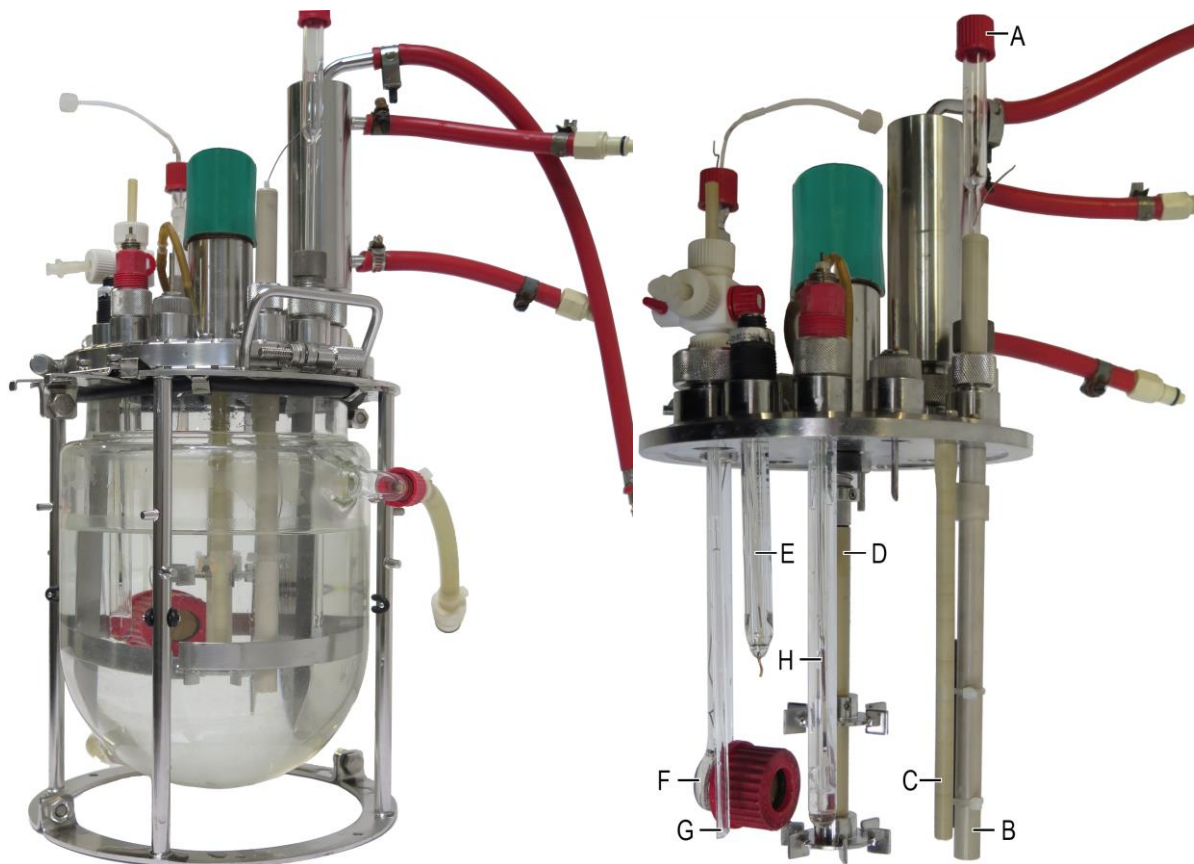


Abbildung 56 Im Rahmen dieser Arbeit gestalteter Elektro-Rührkesselreaktor im Litermaßstab. A: Glasbrücke für Referenzelektrode, B: Halterung für Arbeitselektrode (PEEK), C: Tauchrohr für Temperatursonde (PEEK), D: Rührerachse (PEEK), E: Redox-Sonde, F: Kathodenkammer (Glas), G: Probenahme- und Begasungsrohr (Glas), H: pH-Sonde.

*Pseudomonas putida* ist dafür bekannt, eine große Anzahl an Kohlenstoffquellen umsetzen zu können (Dos Santos *et al.*, 2004). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels eines genomweiten Modells abgeschätzt, welche Substrate sich für die *pHBA*-Bildung bei Sauerstoff- und Anodenatmung am Besten eignen.

Basierend auf einem genomweiten Modell des Stoffwechsels von *P. putida* KT2440 wurde mittels Flussbilanzanalyse die Verwertbarkeit unterschiedlicher Substrate für die *pHBA*-Produktion mit Sauerstoff- und Anodenatmung abgeschätzt. Das genomweite Modell iJP815 (Puchalka *et al.*, 2008) wurde dazu an die von van Duuren *et al.* (2013) ermittelten Werte für den wachstumsabhängigen (*growth-associated maintenance*,  $GAM = 85 \text{ mmol}_{ATP} \text{ g}_X^{-1}$ ) und den wachstumsunabhängigen (*non-growth-associated maintenance*,  $NGAM = 3,96 \text{ mmol}_{ATP} (\text{g}_X \text{ h})^{-1}$ ) Erhaltungsstoffwechsel angepasst. Für 57 verschiedene Substrate wurden die Biomasserträge mit diesem verbesserten

Modell  $iJP815_{\text{mod}}$  geschätzt und experimentell anhand ausgewählter Substrate (Acetat, Citrat, Glycerin, Malat, Pyruvat und Succinat) in einem Rührkesselreaktor im 3 L-Maßstab überprüft. Die Abweichung zwischen geschätzten und experimentell ermittelten Biomasseerträgen betrug weniger als 20 %. Das Modell  $iJP815_{\text{mod}}$  wurde im Anschluss weiter modifiziert ( $iJP815_{\text{mod},p\text{HBA}}$ ), um eine qualitative Abschätzung der  $p\text{HBA}$ -Produktion mit den 57 Substraten bei Sauerstoff- und Anodenatmung durchzuführen. Basierend auf den geschätzten  $p\text{HBA}$ -Erträgen und dem Reduktionsgrad des Substrates bezüglich des Produktes  $p\text{HBA}$  wurden fünf Substrate ausgewählt, die für die  $p\text{HBA}$ -Produktion in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung geeignet erschienen. Diese umfassten Glycerin, Glucose, Citrat, Succinat und Malat.

Um zu untersuchen, ob die Anodenatmung gegenüber der klassischen Sauerstoffatmung Vorteile wie beispielsweise höhere Produkterträge bietet, wurde in aeroben Satzprozessen mit den fünf ausgewählten Substraten in einem 1 L-Rührkesselreaktor die  $p\text{HBA}$ -Produktion von *P. putida* KT24440 bei Sauerstoffatmung reaktionstechnisch charakterisiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass alle ausgewählten Substrate unter aeroben Bedingungen zur  $p\text{HBA}$ -Produktion verwendet werden können. Die im Satzverfahren erreichten  $p\text{HBA}$ -Erträge variierten zwischen den eingesetzten Ausgangssubstraten um bis zu 55 %. Der mit dem Substrat Glucose im Satzverfahren erreichte maximale  $p\text{HBA}$ -Ertrag ( $9,05 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Glucose}}^{-1}$ ) ist mit publizierten Erträgen aus Satzprozessen mit *Saccharomyces cerevisiae* ( $9,10 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Glucose}}^{-1}$ , Krömer *et al.*, 2013) sowie *Klebsiella pneumonia* ( $10,15 \text{ mmolC}_{p\text{HBA}} \text{ molC}_{\text{Glucose}}^{-1}$ , Müller *et al.*, 1995) vergleichbar. Es wurde festgestellt, dass die Überexpression des für die Chorismat-Pyruvat-Lyase kodierenden Gens *ubiC* – verglichen mit der Basalexpression des Gens *ubiC* vor der Induktion – die  $p\text{HBA}$ -Produktion nicht verbesserte.

Mit Ausnahme von Glycerin wurde bei allen Substraten die Bildung von Nebenprodukten festgestellt. Ein Vergleich zwischen *P. putida* KT2440  $\Delta p\text{obA}/p\text{SEVA-ubiC}$  und *P. putida* KT2440 (Wildtyp-Stamm) zeigte, dass es in aeroben Satzprozessen mit dem Wildtyp-Stamm nicht zu Nebenproduktbildung kam. Die Deletion des für die 4-Hydroxybenzoat-3-Hydroxymonooxygenase kodierenden Gens *pobA* verhindert in *P. putida* KT2440  $\Delta p\text{obA}/p\text{SEVA-ubiC}$  den Abbau von  $p\text{HBA}$  über den Ortho-Weg. Dies erhöhte den Fluss in den Ubichinol-Synthese-Weg, dessen Ausgangsmetabolit  $p\text{HBA}$  ist. Ubichinol ist ein zentrales Redoxäquivalent im mikrobiellen Metabolismus. Basierend auf dem Vergleich der beiden Stämme wird angenommen, dass es durch die gentechnischen Modifikationen zu einem zeitweisen Ubichinol-Überschuss kam. Dieser führte wahrscheinlich zur

vermehrten Bildung und Sekretion der Nebenprodukte Malat und Fumarat, die im weiteren Prozessverlauf wieder metabolisiert wurden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Erforschung der Anodenatmung zur *pHBA*-Produktion. Dazu war es zunächst notwendig zu klären, über welchen Mechanismus *P. putida* KT2440 Elektronen über die äußere Membran transportiert. Die experimentellen Untersuchungen zeigten, dass *P. putida* KT2440 auf die Verfügbarkeit redoxaktiver Verbindungen (Mediatoren) im Medium angewiesen ist, die den externen Elektronentransfer zwischen Mikroorganismus und Elektrode vermitteln. Bei der experimentellen Evaluierung verschiedener Redoxmediatoren (Eisen(III)chlorid, Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3Fe(CN)_6$ ) und Riboflavin) wurde  $K_3Fe(CN)_6$  als geeigneter Mediator für die Anodenatmung von *P. putida* KT2440 identifiziert.

Die zuvor bereits unter aeroben Bedingungen evaluierten Substrate Glycerin, Glucose, Citrat, Succinat und Malat wurden in anaeroben Satzprozessen mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  bei Anodenatmung als Ausgangsstoffe für die *pHBA*-Produktion eingesetzt. Mit dem Mediator  $K_3Fe(CN)_6$  war es möglich, alle Substrate umzusetzen, *pHBA* wurde jedoch nur unter Verwendung der Substrate Citrat, Succinat und Malat gebildet. Dabei wurde für das Substrat Citrat der *pHBA*-Ertrag im Satzprozess mit Anodenatmung im Vergleich zum aeroben Prozess von  $5,84 \text{ mmolC}_{pHBA} \text{ molC}_{Citrat}^{-1}$  um 43 % auf  $8,36 \text{ mmolC}_{pHBA} \text{ molC}_{Citrat}^{-1}$  gesteigert. Mit Succinat und Malat verringerte sich der *pHBA*-Ertrag im Vergleich zum aeroben Prozess um 15 % beziehungsweise 10 %. Mit Glucose und Glycerin wurde in den Prozessen mit Anodenatmung keine *pHBA*-Bildung beobachtet.

Bio-elektrochemische Reaktionen laufen in der Regel langsam ab, was sich in langen Prozesszeiten sowie geringen Stromstärken und Umsatzraten äußert (Xie *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Limitierungen bio-elektrochemischer Reaktionen anhand des Modellprozesses der *pHBA*-Produktion mit *P. putida* KT2440  $\Delta poba/pSEVA-ubiC$  untersucht. Die bio-elektrochemische Reaktion wurde unter stabilen und homogenen Reaktionsbedingungen im neu gestalteten Elektro-Rührkesselreaktor mit Citrat als Substrat durchgeführt. Untersucht wurden die Einflüsse der Oberfläche der Arbeitselektrode, des Stofftransportes und des externen Elektronentransfers.

Zur Evaluierung des Einflusses der Elektrodenoberfläche auf die *pHBA*-Produktion im anaeroben Satzprozess mit Anodenatmung wurden drei unbehandelte Graphitelektroden – eine Graphit-Stabelektrode, eine Graphit-Bürstenelektrode und eine Graphit-Vlieselektrode – verwendet. Diese Elektroden unterschieden sich in ihren spezifischen Oberflächen, die mittels der Brunauer-Emmett-

Teller Methode bestimmt wurden. Für die Stab-, Bürsten- und Vlieselektrode wurden spezifische Oberflächen von  $0,75 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ ,  $299 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$  und  $409 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$  ermittelt. Im Vergleich zur Stabelektrode waren die spezifischen Oberflächen der Bürsten- und Vlieselektrode somit um etwa das 375-fache und 510-fache größer. Unter identischen Prozessbedingungen wurde festgestellt, dass die maximalen Stromstärken mit Stab- und Bürstenelektrode mit 2,48 mA und 2,47 mA identisch waren, während die maximale Stromstärke im Prozess mit der Vlieselektrode mit 6,35 mA um nur 57 % größer war, obwohl Bürsten- und Vlieselektrode deutlich größere spezifische Oberflächen aufwiesen. Mit der projizierten Elektrodenoberfläche als Bezugsgröße für die Stromstärke – eine in der Literatur häufig verwendete Normierungsmethode – ergab sich für die Graphit-Stabelektrode die höchste Stromdichte (Stabelektrode:  $0,47 \text{ mA cm}^{-2}$ ; Bürstenelektrode:  $0,11 \text{ mA cm}^{-2}$ ; Vlieselektrode  $0,32 \text{ mA cm}^{-2}$ ).

Die hohe Porosität und die Biofilmbildung führten bei der Bürsten- und der Vlieselektrode zu hohen Porendiffusions- und Stofftransportwiderständen. Außerdem verringerte sich durch die Biofilmbildung die für die Oxidation des Mediators zugängliche Elektrodenoberfläche. Die Gründe für die vergleichsweise hohe Stromstärke und Stromdichte, die mit der Stabelektrode erreicht wurden, liegen in der Verminderung des Porendiffusionswiderstands durch die glatte Oberfläche des Graphit-Stabs und in der Verminderung des Stofftransportwiderstands durch ein Ausbleiben der Biofilmbildung auf der Elektrodenoberfläche. In der Literatur wird oft zur Erhöhung der Stromdichte in bioelektrochemischen Systemen die Elektrodenoberfläche vergrößert, beispielsweise durch Aufbringung von Carbon Nanotubes (Qiao *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verminderung von Porendiffusions- und Stofftransportwiderständen eine kostengünstige Alternative darstellt, mit der ebenfalls hohe Stromdichten erreicht werden können.

Die Vorteile der Graphit-Stabelektrode für die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA*/pSEVA-*ubiC* unter Verwendung des Mediators  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  lassen sich für mediatorvermittelte bioelektrochemische Systeme verallgemeinernd zusammenfassen:

- Keine Biofilmbildung
  - Genaue Bestimmung spezifischer Reaktionsraten, da durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspension die gesamte Biomassekonzentration im Reaktor zu jedem Prozesszeitpunkt ermittelt werden kann und keine Zellen aufgrund Anlagerung auf der Elektrodenoberfläche unberücksichtigt bleiben.
  - Eine während des Prozesses gleichbleibende Grenzfläche zwischen Medium und Elektrodenoberfläche, an der die Oxidation des Mediators stattfinden kann
- Definierte Positionierung im Reaktor

- Glatte Oberfläche zur Vermeidung von Porendiffusion

Nachdem die Graphit-Stabelektrode als geeignete Arbeitselektrode für die Anodenatmung von *P. putida* KT2440  $\Delta$ *pobA/pSEVA-ubiC* identifiziert worden war, wurden die Effekte einer Erhöhung des Stofftransports auf die Anodenatmung untersucht. Durch Erhöhung des volumenspezifischen Leistungseintrages im 1,8 L-Rührkesselreaktor von  $0,61 \text{ W L}^{-1}$  (Rührergeschwindigkeit 400 rpm) auf  $3,27 \text{ W L}^{-1}$  (700 rpm) wurde eine signifikante Steigerung des Substratumsatzes um 57 % von  $0,42 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  auf  $0,66 \text{ mmol (g}_x \text{ h)}^{-1}$  erreicht. Gleichzeitig wurde die Stromdichte um 9,5-fache von  $0,91 \text{ mA cm}^{-2}$  auf  $8,57 \text{ mA cm}^{-2}$  gesteigert und der Biomassertrag um das 14-fache von  $0,01 \text{ molC}_x \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  auf  $0,14 \text{ molC}_x \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$ . Die Biomassezunahme führte zu einer Erhöhung der (nicht-spezifischen) mikrobiellen Reduktionsrate des Mediators. Mit steigendem Verhältnis von reduzierter zu oxidiertes Mediatorspezies kam es zu einer Metabolisierung des zuvor gebildeten *p*HBA, sodass bei Prozessende kein *p*HBA mehr nachgewiesen werden konnte.

Durch Messung des Redoxpotentials des Mediums über eine Redox-Sonde wurde in weiteren Versuchen bestätigt, dass es zu Wechselwirkungen zwischen der metabolischen Aktivität des Mikroorganismus und dem Redoxpotential im Medium kommt, die sich in einer Beeinflussung der *p*HBA- und Nebenproduktbildung äußerten. Es wurde gezeigt, dass das Redoxpotential im Medium vom Konzentrationsverhältnis der oxidierten und reduzierten Mediatorspezies abhängig ist. Da über das Redoxpotential im Medium die Verteilung der Stoffwechselprodukte beeinflusst wird, konnte dies zur Beeinflussung der *p*HBA-Produktion im Satzprozess mit Anodenatmung genutzt werden. Dazu wurde das Redoxpotential im Medium geregelt. Dies wurde durch Messung des Redoxpotentials mittels einer Redox-Sonde und geregelter Zugabe des Mediators im Satzverfahren realisiert. Es wurde ein für die *p*HBA-Produktion geeignetes Redoxpotential im Medium identifiziert (225 mV versus Ag/AgCl).

Bei einem volumenspezifischen Leistungseintrag von  $2,93 \text{ W L}^{-1}$  (700 rpm) und Regelung des Redoxpotentials im Medium auf +225 mV (versus Ag/AgCl) im 3,6 L-Rührkesselreaktor war es möglich, den *p*HBA-Ertrag auf  $9,91 \text{ mmolC}_{\text{pHBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$  zu steigern. Der *p*HBA-Ertrag wurde somit im Vergleich zu dem bei 400 rpm durchgeführten Satzprozess, bei dem das im Medium vorherrschende Redoxpotentials nicht geregelt wurde ( $0,14 \text{ mmolC}_{\text{pHBA}} \text{ molC}_{\text{Citrat}}^{-1}$ ), um einen Faktor von 70 erhöht. Durch die Redoxpotentialregelung war es außerdem möglich, die Metabolisierung von *p*HBA zu vermeiden. Im Vergleich zum bei Sauerstoffatmung mit Citrat erreichten *p*HBA-Ertrag



(5,87 mmolC<sub>pHBA</sub> molC<sub>Citrat</sub><sup>-1</sup>) wurde der pHBA-Ertrag im Satzprozess mit Anodenatmung bei 700 rpm und Regelung des Redoxpotentials im Medium um 69 % gesteigert.

Durch die Regeneration des Mediators an der Elektrode konnte die für den externen Elektronentransfer und die Redoxpotentialregelung notwendige Menge von 1280 mmol K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> um 77 % auf 240 mmol K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> vermindert werden. Während des Prozesses wurden Stromstärken von bis zu 66,3 mA erreicht, was einer auf die projizierte Elektrodenoberfläche bezogenen Stromdichte von 12,5 mA cm<sup>-2</sup> entspricht. In der Literatur werden Stromdichten für Graphit-Stabelektroden mit Werten von maximal 1 mA cm<sup>-2</sup> angegeben, sodass im Rahmen dieser Arbeit eine Steigerung der Stromdichte um das 12,5-fache erreicht wurde.

Die wichtigste Erkenntnis, die aus der Untersuchung der mediatorvermittelten Anodenatmung im Rahmen dieser Arbeit hervorzuheben ist, ist die Notwendigkeit der Regelung des im Medium vorherrschenden Redoxpotentials. Der Elektro-Rührkesselreaktor bietet die Möglichkeit, den verwendeten Mediator kontinuierlich zu regenerieren, sodass auch bei niedriger absoluter Mediatorkonzentration stets ein ausgewogenes Verhältnis von reduzierter und oxidiertem Mediatorspezies vorliegt. Entscheidend ist dabei die Verwendung einer geeigneten Elektrode. Glatte nicht-poröse Materialien erwiesen sich als überlegen, poröse Materialien mit großen Oberflächen wiesen hingegen keine Vorteile für den Prozessbetrieb auf. Der Grund für das vorteilhafte Prozessverhalten der glatten, nicht-porösen Elektrode ist die Vermeidung von Stofftransportlimitierungen, die auf porösen Oberflächen durch die Entstehung von Biofilmen auftreten. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Auswahlkriterien für zentrale Komponenten bio-elektrochemischer Systeme, in denen mediatorvermittelte Anodenatmung durchgeführt werden soll.

Der in dieser Arbeit entwickelte Elektro-Rührkesselreaktor sowie die identifizierten prozesstechnisch wichtigen Parameter und Zusammenhänge werden es in Zukunft ermöglichen, die Entkopplung der Erhaltung von Masse und Ladung – ein wesentliches Alleinstellungsmerkmal bio-elektrochemischer Systeme – über den in dieser Arbeit untersuchten Modellprozess zur Herstellung von pHBA mit *Pseudomonas putida* hinaus für biotechnologische Produktionsprozesse nutzbar zu machen. Aufgrund der stabil und homogen einstellbaren Reaktionsbedingungen im Elektro-Rührkesselreaktor ist dieser – analog zu klassischen Rührkesselreaktoren – besonders geeignet zur verlässlichen reaktionstechnischen Charakterisierung neuartiger bio-elektrochemischer Prozesse.

Tabelle 18 Funktionen und Eigenschaften der zentralen Komponenten bio-elektrochemischer Prozesse.

Komponente	Funktion	Hat Einfluss auf	Wird beeinflusst von
Mikro-organismus	Mikrobieller Katalysator zur Oxidation von kohlenstoffhaltigen Substraten	Produktbildung Biomassebildung Reduktion des Mediators Biofilmbildung	Verfügbarkeit des oxidierten Mediators pH, Temperatur, Redoxpotential im Medium Substrat Intrazelluläre Stoffwechselwege Permeabilität des Separators für O <sub>2</sub>
Biofilmbildung	Keine Funktion	Grenzfläche Anode/Elektrolyt für Elektronenübertragung Massentransfer v. Substrat, Produkt, Mediator	Elektrodenoberfläche Mikroorganismus Leistungseintrag
Anode	Oxidation von Substanzen	Regeneration des Mediators	Elektrodenmaterial und - oberfläche Biofilm
Kathode	Reduktion von Substanzen	Elektronenübertragung auf terminalen kathodischen Elektronenakzeptor	Elektrodenmaterial und - oberfläche Verfügbarkeit des terminalen kathodischen Elektronenakzeptors
Medium	Transport von ionischen Ladungsträgern (Anionen und Kationen) Ort vor- und nachgelagerter mikrobieller oder chemischer Reaktionen	Elektrolytische Leitfähigkeit Mikroorganismus Löslichkeit von Substrat, Produkt, Mediator	Medienkomponenten Mikroorganismus
Separator	Trennung von Anoden und Kathodenkammer	Maximale Ionenaustauschrate zwischen Kathoden- und Anodenkammer Permeation von O <sub>2</sub> in die Anodenkammer	Membranoberfläche Selektivität (Anion/Kation) Permeabilität Biofilm
Bioreaktor	Aufnahme der Elektroden und des Mediums Stabile Einstellung homogener Reaktionsbedingungen Durchführung elektrochemischer und mikrobieller Reaktionen	Leistungseintrag Temperatur, pH und Redoxpotential Messung/Regelung	Mikroorganismus Anoden- und Kathodenreaktion

## 11 Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges bio-elektrochemisches System auf Basis eines Rührkesselreaktors gestaltet und die *p*HBA-Herstellung mit *Pseudomonas putida* in anaeroben Satzprozessen mit Anodenatmung reaktionstechnisch charakterisiert.

Die erzielten Erkenntnisse sind nicht nur spezifisch für den untersuchten Mikroorganismus und das Zielprodukt *p*HBA gültig, sondern können allgemeine Anwendung für die Erforschung einer großen Bandbreite bio-elektrochemischer Prozesse finden. Darunter könnten Prozesse mit Redoxenzymen oder Ganzzellbiokatalysatoren fallen, deren Co-Faktorregeneration über das Redoxpotential im Medium gesteuert werden kann. Dies würde die Durchführung potentialgesteuerter Kaskadenreaktionen ermöglichen. Da bei Anodenatmung keine Begasung des Systems notwendig ist, könnten solche Prozesse zur Herstellung von Produkten genutzt werden, die zum Schäumen neigen oder mit Sauerstoff unerwünschte Reaktionen eingehen.

Da sowohl bei Sauerstoff- als auch bei Anodenatmung nur geringe *p*HBA-Erträge erreicht wurden, ist es notwendig, die *p*HBA-Produktion mit *Pseudomonas putida* durch Einführung anderer gentechnischer Modifikationen zu verbessern. Geeignete Ansatzpunkte könnten eine Verminderung der Limitierung des Metabolismus bei Anodenatmung durch den ATP-Mangel sowie Modifikationen im Aromaten-Syntheseweg darstellen. Das in dieser Arbeit validierte genomweite Modell ermöglicht eine Abschätzung der Auswirkungen solcher Modifikationen vor der eigentlichen Transformation des Mikroorganismus, um den Einsatz aufwendiger gentechnischer Experimente gering zu halten.

In weiteren Arbeiten könnten intrazelluläre Konzentrationsänderungen der Redoxäquivalente bei Verwendung unterschiedlicher Substrate oder unterschiedlicher Redoxpotentiale im Medium untersucht werden. Auf diese Weise könnten für die *p*HBA-Produktion besser geeignete Substrate oder Kombinationen von Substraten identifiziert und Prozessbedingungen weiter optimiert werden.

Zur Verbesserung der Anodenatmung sind die Verminderung der Prozesszeit sowie der eingesetzten Mediatormenge notwendig. Ersteres könnte durch den Einsatz höherer Biomassekonzentrationen erreicht werden, Zweiteres durch den Einsatz größerer oder mehrerer Elektroden. Interessant wäre außerdem die Entwicklung eines kontinuierlich betriebenen Prozesses mit Anodenatmung. Hierzu müsste jedoch dafür gesorgt werden, dass der Mediator nicht ausgetragen wird oder aber effizient zurückgewonnen werden kann.

## 12 Literaturverzeichnis

- Acker L, Bressau G, Brubacher GB und Bürger KM (1967): Analytik der Lebensmittel Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen. *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg.
- Aelterman P, Freguia S, Keller J, Verstraete W und Rabaey K (2008): The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(3):409–418.
- Alagarsamy V (2013): Textbook of medicinal chemistry. *Elsevier Health Sciences APAC*.
- Allen RM und Bennetto HP (1993): Microbial fuel-cells. *Appl Biochem Biotechnol* 39-40(1):27–40.
- Anraku Y (1988): Bacterial electron transport chains. *Annual review of biochemistry* 57:101–132.
- Appleby CA und Morton RK (1959): Lactic dehydrogenase and cytochrome b<sub>2</sub> of baker's yeast. Purification and crystallization. *Biochemical Journal* 71(3):492–499.
- Balakireva LM, Kantere VM und Rabotnova IL (1974): The redox potential in microbiological media. *Biotechnology and bioengineering symposium* 0(4-2):769–780.
- Bargel H, Hilbrans H und Schulze G (2008): Werkstoffkunde. *Springer*, Berlin.
- Barker JL und Frost JW (2001): Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol. Bioeng.* 76(4):376–390.
- Baron S (1996): Medical microbiology. *University of Texas Medical Branch at Galveston*, Galveston, Tex.
- Behr A, Agar DW und Jörissen J (2010): Einführung in die technische Chemie. *Spektrum, Akad. Verl.*, Heidelberg.
- Blank LM, Ebert BE, Buehler K und Bühler B (2010): Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis. *Antioxidants & redox signaling* 13(3):349–394.
- Blank LM, Ionidis G, Ebert BE, Bühler B und Schmid A (2008): Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS Journal* 275(20):5173–5190.

- Blumenthal G, Linke D und Vieth S (2006): Chemie - Grundwissen für Ingenieure. *B.G. Teubner Verlag/ GWV Fachverlage GmbH*, Wiesbaden.
- Bond DR, Strycharz-Glaven SM, Tender LM und Torres CI (2012): On electron transport through *Geobacter* biofilms. *ChemSusChem* 5(6):1099–1105.
- Bors W, Saran M, Tait D (editors) (1983): Oxygen radicals in chemistry and biology - Proceedings, 3. Internat. Conference, Neuherberg, Federal Republic of Germany, July 10-15, 1983, Berlin. *De Gruyter*.
- Canstein H von, Ogawa J, Shimizu S und Lloyd JR (2008): Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3):615–623.
- Cao X, Huang X, Liang P, Xiao K, Zhou Y, Zhang X und Logan BE (2009): A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environ. Sci. Technol.* 43(18):7148–7152.
- Castelle C, Guiral M, Malarte G, Ledgham F, Leroy G, Brugna M und Giudici-Ortoni M (2008): A new iron-oxidizing/O<sub>2</sub>-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *The Journal of biological chemistry* 283(38):25803–25811.
- Cavill GWK und Vincent JM (1947): The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Part II. Relationships between the fungistatic activity, and physical and chemical properties of the esters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 66(6):175–182.
- Chae KJ, Choi M, Ajayi FF, Park W, Chang IS und Kim IS (2008): Mass transport through a proton exchange membrane (Nafion) in microbial fuel cells. *Energy Fuels* 22(1):169–176.
- Chen S, He G, Liu Q, Harnisch F, Zhou Y, Chen Y, Hanif M, Wang S, Peng X, Hou H und Schröder U (2012): Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5(12):9769.
- Chen S, Hou H, Harnisch F, Patil SA, Carmona-Martinez AA, Agarwal S, Zhang Y, Sinha-Ray S, Yarin AL, Greiner A und Schröder U (2011): Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4(4):1417.

- Cheng S und Logan BE (2007): Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications* 9(3):492–496.
- Chmiel H (2011): Bioprozesstechnik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Collado S, Rosas I, González C und Diaz M (2015): Biodegradation of *p*-hydroxybenzoic acid by *Pseudomonas putida*. *Desalination and Water Treatment*:1–11.
- Cramer GM, Ford RA und Hall RL (1976): Estimation of toxic hazard - A decision tree approach. *Food and Cosmetics Toxicology* 16(3):255–276.
- Davis JB und Yarbrough HF (1962): Preliminary experiments on a microbial fuel cell. *Science* 137(3530):615–616.
- del Castillo T, Ramos JL, Rodriguez-Herva JJ, Fuhrer T, Sauer U und Duque E (2007): Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *Journal of bacteriology* 189(14):5142–5152.
- Dersch P und Munk K (2008): Mikrobiologie - 43 Tabellen. *Thieme*, Stuttgart.
- Dhar BR und Lee H (2013): Membranes for bioelectrochemical systems: challenges and research advances. *Environmental technology* 34(13-16):1751–1764.
- Doran PM (2013): Bioprocess engineering principles (second edition). *Academic Press*.
- Dos Santos VM, Heim S, Moore ER, Strätz M und Timmis KN (2004): Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 6(12):1264–1286.
- Duboc P, Schill N, Menoud L, van Gulik W und Stockar U von (1995): Measurements of sulfur, phosphorus and other ions in microbial biomass - Influence on correct determination of elemental composition and degree of reduction. *Journal of Biotechnology* 43(2):145–158.
- Dudek RW (2006): High-yield lung. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia.
- Dudek RW (2007): High-yield kidney. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia.
- Dworkin M (2006): The Prokaryotes - a handbook on the biology of bacteria. *Springer*, New York.

- Ebert BE, Kurth F, Grund M, Blank LM und Schmid A (2011): Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Increased NADH and ATP Demand. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18):6597–6605.
- Egerer P, Bühler M und Simon H (1982): Rhein as an electron acceptor for various flavoproteins and for electron transport particles. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 363(6):627–633.
- Entner N und Doudoroff M (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *The Journal of biological chemistry* 196(2):853–862.
- Fan Y, Sharbrough E und Liu H (2008): Quantification of the internal resistance distribution of microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 42(21):8101–8107.
- Follonier S, Escapa IF, Fonseca PM, Henes B, Panke S, Zinn M und Prieto MA (2013): New insights on the reorganization of gene transcription in *Pseudomonas putida* KT2440 at elevated pressure. *Microbial cell factories* 12:30.
- Follonier S, Panke S und Zinn M (2011): A reduction in growth rate of *Pseudomonas putida* KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate. *Microb Cell Fact* 10(1):25.
- Franck HG und Stadelhofer JW (2012): Industrial aromatic chemistry: raw materials · processes · products. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Franks AE, Nevin KP, Jia H, Izallalen M, Woodard TL und Lovley DR (2009): Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities - Monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm. *Energy Environ. Sci.* 2(1):113–119.
- Ghafari S, Hasan M und Aroua MK (2008): Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater-a review. *Bioresource Technology* 99(10):3965–3974.
- Gnana-Kumar G, Sarathi Sathiyaa, V G und Nahm KS (2013): Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosensors & bioelectronics* 43:461–475.

- Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Neals KH und Fredrickson JK (2006): Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(30):11358–11363.
- Gracia-Angel MdG (2006): Aufnahme und Interpretation der zyklischen Voltammogramme substituierter *p*-Phenylendiamine in organischen Lösungsmitteln unter Erfassung der Protonenübertragungsreaktionen mittels Pyridin. *Dissertation Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg*, Nürnberg.
- Guerrero R, Rodriguez JA, Garza-Garc Y, Rios-Gonza LJ, Sosa-Santi GJ, Garza-Rodr, I.M. de la, Martinez-A SY, Rodriguez MM und Rodriguez J (2010): Comparative study of three cathodic electron acceptors on the performance of mediatorless microbial fuel cell. *International J. of Electrical and Power Engineering* 4(1):27–31.
- Hall EAH und Hummel G (1995): Biosensoren. *Springer*, Berlin.
- Han A, Hou H, Li L, Kim HS und Figueiredo P de (2013): Microfabricated devices in microbial bioenergy sciences. *Trends in Biotechnology* 31(4):225–232.
- Harnisch F, Aulenta F und Schröder U (2011): Microbial fuel cells and bioelectrochemical systems. *Elsevier*:643–659.
- Harnisch F, Rosa, Luis F M, Kracke F, Viridis B und Krömer JO (2015): Electrifying white biotechnology: engineering and economic potential of electricity-driven bio-production. *ChemSusChem* 8(5):758–766.
- Harrington TD, Babauta JT, Davenport EK, Renslow RS und Beyenal H (2015): Excess surface area in bioelectrochemical systems causes ion transport limitations. *Biotechnol. Bioeng.* 112(5):858–866.
- Harris DC, Werner G und Werner T (2014): Lehrbuch der Quantitativen Analyse. *Imprint: Springer Spektrum*, Berlin, Heidelberg.



- Harwood C, Fosnaugh K und Dispensa M (1989): Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *Journal of bacteriology* 7(171):4063–4066.
- Häuslein I, Manske C, Goebel W, Eisenreich W und Hilbi H (2016): Pathway analysis using (13) C-glycerol and other carbon tracers reveals a bipartite metabolism of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 100(2):229–246.
- He Z und Angenent LT (2006): Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis* 18(19-20):2009–2015.
- Hickling A (1942): Studies in electrode polarisation. Part IV - The automatic control of the potential of a working electrode. *Trans. Faraday Soc.* 38:27.
- Hiltner W (1935): Ausführung potentiometrischer Analysen nebst vollständigen Analysenvorschriften für technische Produkte. *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg.
- Hirozawa ST, O'Brien EF, Wilson JC (1980): Hydroxybenzoic acid as pH buffer and corrosion inhibitor for antifreeze containing organosilicone-silicate polymers. *US 06/000,349*.
- Holze R (1998): Leitfaden der Elektrochemie. *Vieweg+Teubner Verlag*, Wiesbaden.
- Jang JK, Chang IS und Kim BH (2004): Improvement of cathode reaction of a mediatorless microbial fuel cell. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14(2):324–329.
- Janicek A, Fan Y und Liu H (2014): Design of microbial fuel cells for practical application: a review and analysis of scale-up studies. *Biofuels* 5(1):79–92.
- Johnson BF, Amaratunga M, Lobos JH (2000): Method for increasing total production of 4-hydroxybenzoic acid by biofermentation. *US 09/161,129*.
- Jordan MA, Welsh DT, Teasdale PR, Catterall K und John R (2010): A ferricyanide-mediated activated sludge bioassay for fast determination of the biochemical oxygen demand of wastewaters. *Water Research* 44(20):5981–5988.
- Kato S (2015): Biotechnological aspects of microbial extracellular electron transfer. *Microbes and environments/ JSME* 30(2):133–139.

- Katuri K, Ferrer ML, Gutiérrez MC, Jiménez R, del Monte F und Leech D (2011): Three-dimensional microchannelled electrodes in flow-through configuration for bioanode formation and current generation. *Energy Environ. Sci.* 4(10):4201.
- Ketep SF, Bergel A, Calmet A und Erable B (2014): Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7(5):1633.
- Kickelbick G (2008): Chemie für Ingenieure. *Pearson*, München.
- Kim JR, Cheng S, Oh S und Logan BE (2007): Power generation using different cation, anion, and ultrafiltration membranes in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 41(3):1004–1009.
- Kim TS und Kim BH (1988): Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. *Biotechnol Lett* 10(2):123–128.
- Kipf E, Koch J, Geiger B, Erben J, Richter K, Gescher J, Zengerle R und Kerzenmacher S (2013): Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresource Technology* 146:386–392.
- Kjaergaard L (1977): The redox potential: Its use and control in biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering* 7:131–150.
- Köhler KAK, Rückert C, Schatschneider S, Vorhölder F, Szczepanowski R, Blank LM, Niehaus K, Goesmann A, Pühler A, Kalinowski J und Schmid A (2013): Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain VLB120 a solvent tolerant, styrene degrading bacterium, isolated from forest soil. *J. Biotechnol.* 168(4):729–730.
- Kolbe H (1860): Ueber die Synthese der Salicylsäure. *Ann. Chem. Pharm.* 113(1):125–127.
- Koryta J (2013): Lehrbuch der Elektrochemie. *Springer-Verlag*, Wien, New York.
- Kotz JC, Treichel P und Weaver GC (2006): Chemistry & chemical reactivity. *Thomson Brooks/Cole*, Belmont, CA.
- Kracke F und Krömer JO (2014): Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC bioinformatics* 15:410.

- Kracke F, Vassilev I und Krömer JO (2015): Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Front. Microbiol.* 6(20141117):101.
- Krieg T, Hüttmann S, Mangold K, Schrader J und Holtmann D (2011): Gas diffusion electrode as novel reaction system for an electro-enzymatic process with chloroperoxidase. *Green Chem.* 13(10):2686.
- Krieg T, Sydow A, Schröder U, Schrader J und Holtmann D (2014): Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends in Biotechnology* 32(12):645–655.
- Krömer JO, Nunez-Bernal D, Aversch NJH, Hampe J, Varela J und Varela C (2013): Production of aromatics in *Saccharomyces cerevisiae* - A feasibility study. *From Gene to Product* 163(2):184–193.
- Kunz B (2016): Lebensmittelbiotechnologie - Mikrobiologie – Enzyme – Bioprozesstechnik – biotechnologische Prozesse. *Behr's Verlag*, Hamburg.
- Kunz P (2013): Umwelt-Bioverfahrenstechnik. *Vieweg+Teubner Verlag*, Braunschweig, Wiesbaden.
- Kurzweil P und Dietlmeier OK (2015): Elektrochemische Speicher - Superkondensatoren, Batterien, Elektrolyse-Wasserstoff, Rechtliche Grundlagen. *Springer Vieweg*, Wiesbaden.
- Kurzweil P und Scheipers P (2012): Chemie - Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente. *Vieweg+Teubner Verlag /Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH*, Wiesbaden.
- Kwong H (2001): Potassium ferricyanide. *John Wiley & Sons, Ltd.* Chichester.
- Lai B, Yu S, Bernhardt PV, Rabaey K, Virdis B und Krömer JO (2016): Anoxic metabolism and biochemical production in *Pseudomonas putida* F1 driven by a bioelectrochemical system. *Biotechnology for Biofuels* 9:39.
- Lengeler JW, Drews G und Schlegel HG (1999): Biology of the prokaryotes. *Thieme; Distributed in the USA by Blackwell Science*, Stuttgart, New York, Malden, MA.
- Leong JX, Daud, Wan Ramli Wan, Ghasemi M, Liew KB und Ismail M (2013): Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 28:575–587.

- Li P, Li T, Zhou J, Sui Z, Dai Y, Yuan W und Chen D (2006): Synthesis of carbon nanofiber/graphite-felt composite as a catalyst. *Microporous and Mesoporous Materials* 95(1–3):1–7.
- Liu H und Logan BE (2004): Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol.* 38(14):4040–4046.
- Liu H, Ramnarayanan R und Logan BE (2004): Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38(7):2281–2285.
- Liu W, Wang A, Ren N, Zhao X, Liu L, Yu Z und Lee D (2008): Electrochemically assisted biohydrogen production from acetate. *Energy Fuels* 22(1):159–163.
- Logan BE (2008): Microbial fuel cells. *Wiley-Interscience*, Hoboken, N.J.
- Logan BE (2010): Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(6):1665–1671.
- Logan BE, Call D, Cheng S, Hamelers HVM, Sleutels, THJA, Jeremiasse AW und Rozendal RA (2008): Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 42(23):8630–8640.
- Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W und Rabaey K (2006): Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40(17):5181–5192.
- Lovley DR (2006): Bug juice - Harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Micro* 4(7):497–508.
- Lück E (1986): Chemische Lebensmittelkonservierung - Stoffe Wirkungen Methoden. *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg.
- Madigan MT, Martinko JM und Brock TD (2006): Brock Mikrobiologie. *Pearson Studium*, München.
- Makdoui K, Bäckman A, Mortensen J und Crafoord S (2010): Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA). *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 248(2):207–212.

- Marshall CW, Ross DE, Fichot EB, Norman RS und May HD (2012): Electrosynthesis of commodity chemicals by an autotrophic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 78(23):8412–8420.
- Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA und Bond DR (2008): *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(10):3968–3973.
- Massazza D, Parra R, Busalmen JP und Romeo HE (2015): New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8(9):2707–2712.
- McCreery RL (2008): Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical reviews* 108(7):2646–2687.
- McQualter RB, Chong BF, Meyer K, van Dyk DE, O'Shea MG, Walton NJ, Viitanen PV und Brumbley SM (2005): Initial evaluation of sugarcane as a production platform for *p*-hydroxybenzoic acid. *Plant biotechnology journal* 3(1):29–41.
- Meijnen J, Verhoef S, Briedjlal AA, Winde JH und Ruijssenaars HJ (2011): Improved *p*-hydroxybenzoate production by engineered *Pseudomonas putida* S12 by using a mixed-substrate feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(3):885–893.
- Miller JH (1972): Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Monod J (1949): The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3(1):371–394.
- Morales G, Ugidos A und Rojo F (2006): Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environmental Microbiology* 8(10):1764–1774.
- Müller R, Wagner A, Schmidt K und Leistner E (1995): Microbial production of specifically ring-<sup>13</sup>C-labelled 4-hydroxybenzoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*(43):985–988.
- Munk K (2008): 7.1 Wachstumsansprüche von Mikroorganismen. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart:257.

- Nakazawa T (2002): Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* 4(12):782–786.
- Nelson DL, Cox MM und Lehninger AL (2009): Lehninger Biochemie. *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Nevin KP, Woodard TL, Franks AE, Summers ZM und Lovley DR (2010): Microbial electrosynthesis - feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio* 1(2):e00103-10-e00103-10.
- Newman JS und Thomas-Alyea KE (2004): Electrochemical systems. *J. Wiley*, Hoboken, N.J.
- Nikel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U und Lorenzo V de (2015): *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *The Journal of biological chemistry* 290(43):25920–25932.
- Nikel PI, Kim J und Lorenzo V de (2014): Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 16(1):239–254.
- Nikel PI und Lorenzo V de (2013): Engineering an anaerobic metabolic regime in *Pseudomonas putida* KT2440 for the anoxic biodegradation of 1,3-dichloroprop-1-ene. *Metabolic Engineering* 15:98–112.
- Palleroni NJ und Moore ERB (2004): Taxonomy of *Pseudomonads*: eperimental aproaches. *Springer US*. Boston, MA:3–44.
- Palmqvist E, Grage H, Meinander NQ und Hahn-Hagerdal B (1999): Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and bioengineering* 63(1):46–55.
- Pandit AV und Mahadevan R (2011): In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals. *Microbial cell factories* 10:76.
- Pandurangachar M, Kumara Swamy BE, Chandrashekar BN, Gilbert O, Reddy S und Sherigara BS (2010): Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by 1-butyl-4-

- methylpyridinium tetrafluoro borate modified carbon paste electrode: a cyclic voltammetric study. *Int. J. Electrochem. Sci.* 5:1187–1202.
- Parija SC (2009): Textbook of microbiology & immunology. *Elsevier India Pvt. Limited.*
- Park DH und Zeikus JG (1999): Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *Journal of bacteriology* 181(8):2403–2410.
- Park DH und Zeikus JG (2002): Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(1):58–61.
- Park DH und Zeikus JG (2003): Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 81(3):348–355.
- Patil SA, Hägerhäll C und Lo Gorton (2012): Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. *Bioanal Rev* 4(2-4):159–192.
- Peguin S und Soucaille P (1996): Modulation of metabolism of *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture in a three-electrode potentiostatic system with methyl viologen as electron carrier. *Biotechnology and bioengineering* 51(3):342–348.
- Pirbadian S, Barchinger SE, Leung KM, Byun HS, Jangir Y, Bouhenni RA, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Shi L, Gorby YA, Golbeck JH und El-Naggar MY (2014): *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(35):12883–12888.
- Poblete-Castro I, Binger D, Oehlert R und Rohde M (2014): Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol - Citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. *BMC Biotechnol* 14(1):21.
- Potter MC (1911): Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds - Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a biological character. *P R Soc Lond B Conta* 84(571):260–276.

- Puchałka J, Oberhardt MA, Godinho M, Bielecka A, Regenhardt D, Timmis KN, Papin JA, Martins dos Santos, VAP und Miyano S (2008): Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput Biol* 4(10):e1000210.
- Qiao Y, Li CM, Bao S und Bao Q (2007): Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 170(1):79–84.
- Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, Verhaege M und Verstraete W (2004): Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9):5373–5382.
- Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P und Verstraete W (2005): Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol.* 39(20):8077–8082.
- Rabaey K und Rozendal RA (2010): Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Micro* 8(10):706–716.
- Raber DJ und Rodriguez W (1985): Conformational properties of oxidation-reduction cofactors. *J. Am. Chem. Soc.* 107(14):4146–4147.
- Rahimnejad M, Adhami A, Darvari S, Zirepour A und Oh S (2015): Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation - A review. *Alexandria Engineering Journal* 54(3):745–756.
- Rahimnejad M, Ghasemi M, Najafpour GD, Ismail M, Mohammad AW, Ghoreyshi AA und Hassan SH (2012): Synthesis, characterization and application studies of self-made Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PES nanocomposite membranes in microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 85:700–706.
- Ramos-Gonzalez M, Ben-Bassat A, Campos M und Ramos JL (2003): Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to *p*-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9):5120–5127.
- Ramos-González MI und Molin S (1998): Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of bacteriology* 180(13):3421–3431.



- Rawson FJ, Downard AJ und Baronian KH (2014): Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports* 4:5216.
- Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strompl C, Moore ERB und Timmis KN (2002): Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* 4(12):912–915.
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT und Lovley DR (2005): Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435(7045):1098–1101.
- Reisch MS (2009): Chemicals from biorefineries. *Chem. Eng. News* 87(41):28–29.
- Ritzer E und Sundermann R (2000): Hydroxycarboxylic acids, aomatic. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. Weinheim, Germany.
- Rosenbaum M, Zhao F, Schröder U und Scholz F (2006): Interfacing electrocatalysis and biocatalysis with tungsten carbide - A high-performance, noble-metal-free microbial fuel cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45(40):6658–6661.
- Rosenbaum MA und Franks AE (2014): Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(2):509–518.
- Rozendal RA, Hamelers HV, Rabaey K, Keller J und Buisman CJ (2008): Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology* 26(8):450–459.
- Rozendal RA, Hamelers HVM und Buisman, Cees J. N. (2006): Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol.* 40(17):5206–5211.
- Rozendal RA, Hamelers, Hubertus V M, Molenkamp RJ und Buisman, Cees J N (2007): Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Research* 41(9):1984–1994.
- Sahm H, Antranikian G, Stahmann K und Takors R (2013): Industrielle Mikrobiologie. *Springer Spektrum*, Berlin, Heidelberg.
- Sambrook J (2001): Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

- Sasaki D, Sasaki K, Watanabe A, Morita M, Matsumoto N, Igarashi Y und Ohmura N (2013): Operation of a cylindrical bioelectrochemical reactor containing carbon fiber fabric for efficient methane fermentation from thickened sewage sludge. *Bioresource Technology* 129:366–373.
- Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR und Palsson BØ (2011): Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models - The COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc* 6(9):1290–1307.
- Schmidt VM (2012): Elektrochemische Verfahrenstechnik - Grundlagen, Reaktionstechnik, Prozessoptimierung. *Wiley, Somerset*.
- Schmitt R (1886): Manufacture of salicylic-acid compounds. *US338365 A*.
- Schmitz S, Nies S, Wierckx N, Blank LM und Rosenbaum MA (2015): Engineering mediator-based electroactivity in the obligate aerobic bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology* 6(284).
- Scholz F (2010): Electroanalytical methods. *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg.
- Schüler J (2016): Die Biotechnologie-Industrie: Ein Einführungs-, Übersichts- und Nachschlagewerk. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Seber GAF, Wild CJ (editors) (1989): Nonlinear regression, Hoboken, NJ, USA. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Sharma M, Bajracharya S, Gildemyn S, Patil SA, Alvarez-Gallego Y, Pant D, Rabaey K und Dominguez-Benetton X (2014): A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems. *Electrochimica Acta*.
- Sharpe AG (1976): The chemistry of cyano complexes of the transition metals. *Academic Press*, London, New York.
- Shi L, Squier TC, Zachara JM und Fredrickson JK (2007): Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme c-type cytochromes. *Molecular Microbiology* 65(1):12–20.

- Shin HS, Zeikus JG und Jain MK (2002): Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(4):476–481.
- Siebert M, Sommer S, Li SM, Wang ZX, Severin K und Heide L (1996): Genetic engineering of plant secondary metabolism. Accumulation of 4-hydroxybenzoate glucosides as a result of the expression of the bacterial *ubiC* gene in tobacco. *Plant Physiology* 112(2):811–819.
- Sikkema J, de Bont, J A und Poolman B (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2):201–222.
- Singh A, Cher Soh K, Hatzimanikatis V und Gill RT (2011): Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. *Metabolic Engineering* 13(1):76–81.
- Speight JG und Özüm B (2001): Petroleum refining processes. *Marcel Dekker; CRC Press*, New York, Boca Raton, Fla.
- Stahmann K, Revuelta JL und Seulberger H (2000): Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(5):509–516.
- Steen A, Utkür FÖ, Borrero-de Acuña JM, Bunk B, Roselius L, Bühler B, Jahn D und Schobert M (2013): Construction and characterization of nitrate and nitrite respiring *Pseudomonas putida* KT2440 strains for anoxic biotechnical applications. *Journal of Biotechnology* 163(2):155–165.
- Steinbusch KJJ, Hamelers HVM, Schaap JD, Kampman C und Buisman, Cees J. N. (2010): Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. *Environmental science & technology* 44(1):513–517.
- Stewart PS (2003): Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology* 185(5):1485–1491.
- Stolten D und Emonts B (2012): Fuel cells science and engineering - Materials, systems, processes and technology. *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Straub, Benz und Schink (2001): Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS microbiology ecology* 34(3):181–186.

- Sturm-Richter K, Golitsch F, Sturm G, Kipf E, Dittrich A, Beblawy S, Kerzenmacher S und Gescher J (2015): Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology* 186:89–96.
- Thormann KM, Saville RM, Shukla S, Pelletier DA und Spormann AM (2004): Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of bacteriology* 186(23):8096–8104.
- Tlemçani LL, Corroler D, Barillier D und Mosrati R (2008): Physiological states and energetic adaptation during growth of *Pseudomonas putida* mt-2 on glucose. *Arch Microbiol* 190(2):141–150.
- Torres CI, Krajmalnik-Brown R, Parameswaran P, Marcus AK, Wanger G, Gorby YA und Rittmann BE (2009): Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential - phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization. *Environ. Sci. Technol.* 43(24):9519–9524.
- Torres CI, Marcus AK, Parameswaran P und Rittmann BE (2008): Kinetic experiments for evaluating the Nernst–Monod model for anode-respiring bacteria (ARB) in a biofilm anode. *Environ. Sci. Technol.* 42(17):6593–6597.
- Ugidos A, Morales G, Rial E, Williams HD und Rojo F (2008): The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology* 10(7):1690–1702.
- Ulber R und Sell D (2007): White biotechnology. *Springer*, Berlin, New York.
- Umweltbundesamt (2014): <http://www.umweltbundesamt.de/themen/wirtschaft-konsum/innovative-produktionsverfahren/biotechnik> (zuletzt geprüft am: 24 Februar 2016).
- van der Rest ME, Abee T, Molenaar D und Konings WN (1991): Mechanism and energetics of a citrate-transport system of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Biochem* 195(1):71–77.
- van Duuren J, Puchalka J, Mars AE, Bückler R, Eggink G, Wittmann C und dos Santos, Vítor AP (2013): Reconciling in vivo and in silico key biological parameters of *Pseudomonas putida* KT2440 during growth on glucose under carbon-limited condition. *BMC Biotechnol* 13(1):93.

- Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris EL und Lovley DR (1998): Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395(6697):65–67.
- Verhoef S, Ballerstedt H, Volkers RJM, Winde JH und Ruijssenaars HJ (2010): Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: novel responses and implications for strain improvement. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):679–690.
- Walsh F (1993): A first course in electrochemical engineering. *Electrochemical Consultancy*, Romsey.
- Wang H und Ren ZJ (2013): A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances* 31(8):1796–1807.
- Wang J, Zheng T, Wang Q, Xu B und Wang L (2015): A bibliometric review of research trends on bioelectrochemical systems. *Current Science* 109(12):2204.
- Wang RJ und Nixon BT (1978): Identification of hydrogen peroxide as a photoproduct toxic to human cells in tissue-culture medium irradiated with “daylight” fluorescent light. *In Vitro* 14(8):715–722.
- Watanabe K (2008): Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(6):528–536.
- Weber KA, Achenbach LA und Coates JD (2006): Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature reviews. Microbiology* 4(10):752–764.
- Wei J, Liang P und Huang X (2011): Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 102(20):9335–9344.
- Weusthuis RA, Lamot I, van der Oost J und Sanders JPM (2011): Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends in Biotechnology* 29(4):153–158.
- Wiberg E und Wiberg N (2007): Lehrbuch der anorganischen Chemie. *Walter de Gruyter*, Berlin.
- Williams PM (1974): Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol. Journal of bacteriology* 120(1):416–423.

- Winsor GL, Lam DKW, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock REW und Brinkman FSL (2011): *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research* 39(Database issue):D596-600.
- Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Syldatk C, Rosenau F und Blank LM (2011): Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* 10:80.
- Wood WB, Wood ML und Baldwin IL (1935): The relation of oxidation-reduction potential to the growth of an aerobic microorganism. *Journal of bacteriology* 30(6):593–602.
- Xie X, Criddle C und Cui Y (2015): Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8(12):3418–3441.
- Xu J, Sheng G, Luo H, Li W, Wang L und Yu H (2012): Fouling of proton exchange membrane (PEM) deteriorates the performance of microbial fuel cell. *Water Research* 46(6):1817–1824.
- Yan J (2015): Handbook of clean energy systems. *Wiley*, Chichester, West Sussex.
- Yuan Y und Kim S (2008): Polypyrrole-coated reticulated vitreous carbon as anode in microbial fuel cell for higher energy output. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 29(1):168–172.
- Zhang T, Cui C, Chen S, Ai X, Yang H, Shen P und Peng Z (2006): A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of *Escherichia coli*. *Chem. Commun.*(21):2257.
- Zhang X, Cheng S, Wang X, Huang X und Logan BE (2009): Separator characteristics for increasing performance of microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 43(21):8456–8461.
- Zhou M, Chi M, Luo J, He H und Jin T (2011): An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 196(10):4427–4435.

## 13 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
$a$	Obere horizontale Asymptote der Richards-Funktion
$A^-$	Anion
ABC	ATP-bindende Kasette (engl.: <i>ATP binding cassette</i> )
AE	Arbeits Elektrode
Ag/AgCl	Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode
$a_x$	Korrelationsfaktor, $g_x L^{-1}$
$b$	Abszisse des Wendepunktes der Richards-Funktion
BES	Bio-elektrochemisches System
BET	Brunauer-Emmet-Teller
$c_i$	Konzentration der Komponente $i$ , $g L^{-1}$
$c_{ox}$	Konzentration des oxidierten Stoffes, $mol L^{-1}$
$c_{pHBA,max}$	Maximale pHBA-Konzentration, $g L^{-1}$
$c_{red}$	Konzentration des reduzierten Stoffes, $mol L^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration, $g L^{-1}$
CV	Zyklische Voltammogramme (engl. <i>cyclic voltammogramm</i> )
$c_{X,0}$	Biomassekonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ , $g L^{-1}$
$c_X$	Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
$\bar{c}_X$	Mittlere Biomassekonzentration, $g L^{-1}$
$d$	Asymmetrieparameter der Richards-Funktion
$d$	Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, m
$D_e$	Effektiver Diffusionskoeffizient, $cm^2 s^{-1}$
DSMZ	Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
$E$	Potential, V
$e_0$	Elementarladung $e_0 = 1,6021 \cdot 10^{-19}$
$E_0$	Standardpotential, V

---

$E_0$	Elektrodenspannung im Gleichgewicht, V
$E^{0'}$	Standard-Redoxpotential bei pH 7, V
$E_1$ und $E_2$	Umkehrpotentiale, V
$E_{1/2}$	Halbstufenpotential, V
$E_{420}$	Extinktion bei 420 nm, -
$E_{AE}$	Potential der Arbeitselektrode, V
ED	Entner-Doudoroff-Weg
$E_{EL,i,0}$	Einzelpotential $E_{EL}$ der Elektroden i stromlosen Zustand, V
$E_{EL,i}$	Einzelpotential $E_{EL}$ der Elektroden i im unter Stromfluss, V
EET	Externer Elektronentransfer
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
$E_{p,a}$	Anodisches Spitzenstrompotential, V
$E_{p,k}$	Kathodisches Spitzenstrompotential, V
$E_{RE,0}$	Potential der Referenzelektrode im Gleichgewicht, V
$E_Z$	Zellspannung unter Stromfluss, V
$E_{Z,0}$	Zellspannung im stromlosen Zustand (thermodynamische Gleichgewichtsspannung), V
$F$	Faraday-Konstante, $F = 96\,485\text{ C mol}^{-1}$
FBA	Flussbilanz-Analyse (engl. <i>flux balance analysis</i> )
GAM	wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie (engl. <i>growth associated maintenance</i> ), $\text{mmol}_{ATP}\text{ g}_X^{-1}$
GE	Gegenelektrode
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
$I$	Stromstärke, A
$I_d$	Diffusionsstrom, A
$I_p$	Grenzstrom, A
$I_{p,a}$	Anodischer Spitzenstrom, A
$I_{p,k}$	Kathodischer Spitzenstrom, A
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside



---

$k$	Dehnungsparameter der Richards-Funktion
$k$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
$K^+$	Kation
$K_{eq}$	Gleichgewichtskonstante der Reaktion
$K_i$	Gleichgewichtskonstant der Reaktion $i$
$K_S$	Halbsättigungskonstante des Substrats, $g L^{-1}$
$L$	Charakteristische Länge, m
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
M9-Medium	Definiertes M9-Medium
Me:	Metallelektrode
$Me^{z+}$	Wässrige Metallionenlösung
$m_{leer}$	Masse der 2 mL Reaktionsgefäß nach der ersten Trocknung, g
$n$	Stoffmenge, mol
$n$	Rührergeschwindigkeit, rpm
$N_A$	Avogadro-Zahl $N_A = 6,023 \cdot 10^{23} g$
NGAM	nicht-wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie (engl. <i>non-growth associated maintenance</i> ), $mmol_{ATP} (g_X h)^{-1}$
NP	Nicht identifiziertes Nebenprodukt
$n_t(C_{total})$	Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ , mol
$n_t(C_{Reaktor})$	Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ im Reaktor, mol
OD	Optische Dichte
Ox	Verbindung im oxidierten Zustand
$p$	Druck, bar
$p \%$	Prozentuale Abweichung, %
PEEK	Polyetheretherketon
pKs	Dekadische Logarithmus der Säurekonstanten
PP-Weg	Pentosephosphat-Weg
PTFE	Polytetrafluorethylen

---

PVC	Polyvinylchlorid
$Q$	Ladung, C
$q_{CO_2}$	Spezifische Kohlenstoffdioxidaufnahmerate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$q_i$	Spezifische Bildungs- oder Aufnahmerate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$q_{O_2}$	Spezifische Sauerstoffaufnahmerate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$q_{pHBA}$	Spezifische pHBA-Bildungsrate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$q_{pHBA}$	Spezifische pHBA-Bildungsrate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$q_s$	Spezifische Substrataufnahmerate, mmol (g <sub>x</sub> h) <sup>-1</sup>
$R$	Allgemeine Gaskonstante: 8,31447 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
RE	Referenzelektrode
Red	Verbindung im reduzierten Zustand
RI-Detektor	Brechungsindexdetektor (engl. <i>refractive index</i> )
$RQ$	Respirationskoeffizient
$r_x$	Wachstumsrate, g (L h) <sup>-1</sup>
$t$	Zeit, h
$T$ :	Temperatur, K
$v$	Potentialvorschubgeschwindigkeit, V s <sup>-1</sup>
$V$	Volumen, L
VE-H <sub>2</sub> O	Vollentsalztes Wasser
$V_{Evaporation,t}$	Verdunstetes Reaktorvolumen, L
$V_{gas}^{in}$	Zuluftstrom, L h <sup>-1</sup>
$V_{mol}$	Molares Volumen eines idealen Gases, 22,414 L mol <sup>-1</sup>
$V_{pH,t}$	Volumen von Säure und/oder Base, L
$V_R$	Reaktorvolumen, m <sup>3</sup>
$V_{Reaktor,t}$	Reaktorvolumen zum Zeitpunkt $t$ , L
$V_{Reaktor,t0}$	Reaktorvolumen zu Zeitpunkt $t = 0$ , L
wt	Wildtyp, <i>P. putida</i> KT2440
$Y_{ij}$ :	Ertragskoeffizient der Komponente $i$ bezüglich der Komponente $j$ , g <sub>i</sub> g <sub>j</sub> <sup>-1</sup>

$Y_{p\text{HBA},S}$	$p\text{HBA}$ -Ertrag, $\text{mmolC}_{p\text{HBA}} \text{molC}^{-1}\text{s}$
$x_i^{\text{in}}$	Molanteil des Stoffes $i$ in der Zuluft, -
$x_i^{\text{out}}$	Molanteil des Stoffes $i$ in der Abluft, -
$z$	Ladungszahl, -
$\Delta_R G^0$	Freie Reaktionsenthalpie im thermodynamischen Gleichgewicht, J
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\sum_0^t n_t(\text{C}_{\text{CO}_2})$	Aufsummierte Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ aus $\text{CO}_2$ , mol
$\sum_0^t V_{\text{Probe},t}$	Aufsummiertes Probenahmen-Volumen, L
$\sum_0^t n_t(\text{C}_{\text{Probe}})$	Aufsummierte Kohlenstoffmenge zum Zeitpunkt $t$ aus Proben, mol
$\kappa_{P,i}$	Reduktionsgrad des Produktes $i$ ;
$\kappa_{S,i}$	Reduktionsgrad der Substrate $i$
$\kappa_X$	Reduktiongrad der Biomasse
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$
$\mu_{\text{max}}$	Maximale spezifische Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$
$[M_{\text{ox}}]$	Konzentration der oxidierten Mediatorspezies
$[M_{\text{red}}]$	Konzentration der reduzierten Mediatorspezies
$[P]$	Produktkonzentration
$[S]$	Substratkonzentration
$[X]$	Biomassekonzentration

**Metabolite**

2KG	2-Ketogluconat
6P2KG	6-Phospho-2-Ketogluconat
6PG	6-Phosphogluconat
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat

CHOR	Chorismat
CIT	Citrat
DAHP	3-Deoxy-D-arabion-heptulosonat-7-phosphat
DHQ	3-Dehydroquinat
DHS	3-Dehydroshikimat
E4P	Erythrose-4-phosphat
EPSP	5-Enolpyruvoylshikimat-3-phosphat
F6P	Fruktose-6-phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
FMN	Flavinmononukleotid (oxidiert)
FMNH <sub>2</sub>	Flavinmononukleotid (reduziert)
FUM	Fumarat
G6P	Glucose-6-phosphat
GAP	Glyceraldehyd-3-phosphat
GLC	Gluconat
GLU	Glucose
GLX	Glyoxylat
ICIT	Isocitrat
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat
MAL	Malat
MQ	Menachinon
MQH <sub>2</sub>	Menachinol
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
OAA	Oxalacetat

---

PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>p</i> HBA	<i>para</i> -Hydroxybenzoesäure
PHE	Phenylalanin
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
PQQH <sub>2</sub>	Pyrrolochinolinchinol
PYR	Pyruvat
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
S3P	Shikimat-3-phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SHIK	Shikimat
SUC	Succinat
SUC-CoA	Succinyl-CoA
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRP	Tryptophan
TYR	Tyrosin
UQ	Ubichinon
UQH <sub>2</sub>	Ubichinol
X5P	Xylulose-5-phosphat
$\alpha$ KG	$\alpha$ -Ketoglutarat

**Enzyme**

6pgdh	Phosphogluconat-Dehydrogenase
acc	Pyruvat-Carboxylase
acn	Aconitase
cs	Citrat-Synthase
eda	Phospho-2-keto-3-deoxy-gluconat-Aldorase
edd	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase

fbp	Fruktose-1,6-bisphosphatase
fum	Fumarat-Hydratase
gkn	Glucokinase
icdh	Isocitrat-Dehydrogenase
icl	Isocitrat-Lyase
mae	Malatenzym
mals	Malat-Synthase
mdh	Malat-Dehydrogenase
mgo	Malatchinon-Oxidoreduktase
oad	Oxalacetat-Decarboxylase
pdh	Pyruvat-Dehydrogenase
ppc	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
rpe	Ribose-phosphat-3-Epimerase
rpi	Ribose-5-phosphat-Isomerase
scs	Succinyl-CoA-Synthase
sdh	Succinat-Dehydrogenase
tal	Transaldolase
tkl	Transketolase

## 14 Anhang

### 14.1 Chemikalienliste

Tabelle 19 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Acetat	49199	Fluka
Aceton	650501-1L-D	Sigma Aldrich
Agar	5210.1	Carl Roth
Ammoniak, 25 %	A3128,9025	AppliChem
Ammoniumchlorid	LC-7318.2	neoLab
Aspartat, 99%ig	B21184	Alfa Aesar
Bernsteinsäure, 99 %	A12084	Alfa Aesar
Borsäure	1.00165.0500	Merck
Brenztraubensäure-Natriumsalz	8793.1	Carl Roth
Butanol	19422-5ML	Sigma Aldrich
Butyrat	L13189	Alfa Aesar
Calciumchlorid-Dihydrat	1.02382.0500	Merck
Chorismat	C1761	Sigma-Aldrich
Cobaltchlorid-Hexahydrat	1.02539.0250	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	LC-4526.2	neoLab
EDTA	8040.3	Carl Roth
Eisenchlorid-Hexahydrat	1038141000	Merck
Ethanol, 99 %	9065.1	Carl Roth
Fumarat, 99 %	A10976	Alfa Aesar
Glucose-Monohydrat	6887.1	Carl Roth
Glycerin, 99,5 %	3783.2	Carl Roth
Glyoxylat, 50 %	B25149	Alfa Aesar
Hefeextrakt	2363.3	Carl Roth

---

Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid	CN08.4	Carl Roth
Kaliumchlorid	7681-11-0	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.3	Carl Roth
Kaliumhexacyanoferrat	A16946	Alfa Aesar
Kaliumiodid	105043	Merck
Kanamycinsulfat	T832.3	Carl Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat	P024	Carl Roth
L-Malat, 99 %	J63221	Alfa Aesar
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	T888.2	Carl Roth
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	95034-292	VWR
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth
Natriumhydroxid	P031.2	Carl Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	1065210250	Merck
Nikel(II)chlorid-Hexahydrat	7791-20-0	Merck
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	A0989,2500	AppliChem
Oxalacetat	A12739	Alfa Aesar
Para-Hydroxybenzoesäure	3872.1	Carl Roth
Pepton (aus Casein)	403898.1210	AppliChem
Propanol	96566-5ML-F	Sigma Aldrich
Propionat	L04210	Alfa Aesar
Salzsäure rauchend (37 %)	4625.2	Carl Roth
Shikimat	L04848	Alfa Aesar
Struktol (Antischaum)	J647	Schill & Seilacher
Wasserstoffperoxid	349887-500ML-D	Sigma Aldrich
Zinksulfat-Heptahydrat	1.08883.0500	Merck
$\alpha$ -Ketoglutarat	A10256	Alfa Aesar

---



## 14.2 Materialienliste

### 14.2.1 Reaktoren

Tabelle 20 Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors im aeroben Betrieb

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
1,8 L-Glaskessel	Labfors 2	Infors GmbH
7,5 L-Glaskessel	Labfors 2	Infors GmbH
Labforssteuerungseinheit	Labfors, 103746	Infors GmbH
Prozesssteuerungssoftware	Iris V5.2	Infors GmbH
pH-Elektrode	405 DPAS-SC-K85/425 400-DASP-SC-K85/200	Mettler-Toledo GmbH
Gelöstsauerstoff-Sonden	InPro 6800 405-DPAS-SC-K8S/200	Mettler-Toledo GmbH
Reaktorwaage	QC35EDE-S	Sartorius AG
Schlauchpumpe	BVP	Ismatec, Wertheim
Abgasanalytik	Easy Line + Advance SCC-F	ABB Germany

Tabelle 21 Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors für die Anodenatmung.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
1,8 L-Glaskessel	Labfors 2	Infors GmbH
3,6 L-Glaskessel	Labfors 2	Infors GmbH
Labforssteuerungseinheit	Labfors, 103746	Infors GmbH
Prozesssteuerungssoftware	Iris V5.2	Infors GmbH
pH-Elektrode	400-DASP-SC-K8S/200	Mettler-Toledo GmbH
Reaktorwaage	QC35EDE-S	Sartorius AG
Potentiostat	SP-150/Z,	Bio-Logic
Software	EC-Lab V10.40	Bio-Logic

Referenzelektrode	Ag/Ag-Cl	IJ Cambria Scientific
Kationenaustauschermembran	CMI-7000S	Membranes International
Titangeflecht	43794	Alfa Aesar
Isolierband	Coroplast	Fritz Müller
Kupferfolie	542611 - 62	Conrad
Redox-Sonde	Redox-Gold OPS32-0NBO2GSA	Eurotronic Umwelttechnik
Graphit-Stabelektrode	140.502.02	MBM
Graphitvlies	CG PSF-10	CGC Klein
Graphitbürste	313240	The Mill-Rose Company

Tabelle 22      Komponenten des 1 L Systems für Anodenatmung im Satzverfahren

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Reaktor	688-1	QVF-Corning
Rührverschluss	22SVL	SciLabware
Rührachse	588-33SVL	SciLabware
Rührwerk	RW 20 DZM	IKA
Schlauchpumpe	BVP	Ismatec
Wasserbad	Susanne	GLF
Graphitgewebe	WOS1002	FuellCellStore
Titandraht	Grade 2, Durchmesser 0,6 mm	ANKURO
Membran	CMI-7000 S	Membranes International
Rotameter	KFR	Kobold
Titangeflecht	43794	Alfa Aesar
Titandraht	Grade 2, Durchmesser 0,6 mm	ANKURO
Referenzelektrode	Ag/AgCl	IJ Cambria Scientific
Potentiostat	MLab	Bank Elektronik

Software	SCI für MS-Windows	Bank Elektronik
Dichtung	PTFE-Stulpe mit zentrischer Bohrung	Duran Group

Tabelle 23 Komponenten des 0,1 L Parallelsystems

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Potentiostat	VSP	Bio-Logic
Referenzelektrode	Ag/AgCl	IJ Cambria Scientific
Salzbrücke	R-AL100	Bio-Logic
Magnetrührer	LAB-400.100.011	Labco
Graphitgewebe	WOS1002	FuellCellStore
Membran	CMI-7000 S	Membranes International

### 14.2.2 Allgemeine Geräte

Tabelle 24 Allgemeine Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analytische Waage	Explorer E121245	Ohaus
Analytische Waage	Explorer E1N213	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
pH-Elektrode	BlueLine 14 pH	Schott

Einstrahlphotospektrometer	Spectronic Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
Schüttelinkubator	AJ 119	Infors
Brutschrank/Inkubator	INB 200	Memmert
Trockenschrank	Serie E 28 L	Binder
Pipetten	Transferpette S	Brand

### 14.2.3 Flüssigkeitschromatographie

Tabelle 25 Bauteile und Software der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Glucose und organischen Säuren.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser und Manager	1100 Series	Agilent Technologies
Pumpe	1100 Series	Agilent Technologies
Probengeber	1100 Series	Agilent Technologies
Säulenofen	Mistral	Spark-Holland
RI-Detektor	1200 Series	Agilent Technologies
UV/VIS-Detektor	S3300	Sykam
Software	ChemStation	Agilent Technologies
Säule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad

### 14.3 IRIS-Sequenz zur Redoxpotentialregelung

```
#0,    initial_settings,  
       stirrer.sp = 700  
       temp.sp = 30  
       pH.sp = 7  
       mass flow.sp = 0.1  
       feed pump.sp = 0  
       seq=1  
  
#1,    Check_potential  
       if(redox.v<225) {seq=2} else {seq=1}  
  
#2,    Adjust_potential,  
  
       feed pump.sp=10  
       seq=3  
  
#3,    wait, 250  
       seq =0
```

#### 14.4 Reduktionszustände ausgewählter Substrate bezüglich *p*HBA

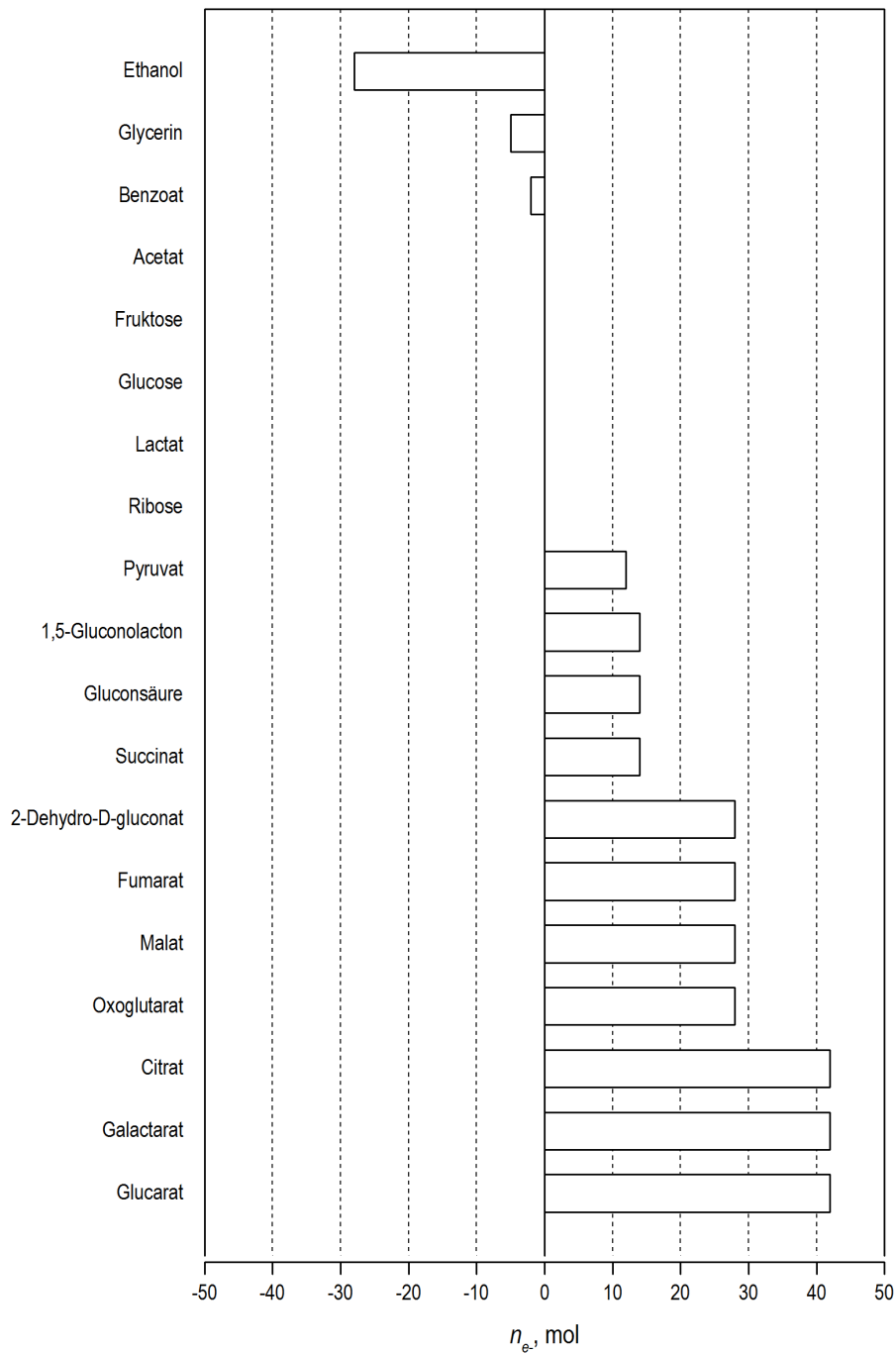


Abbildung 57 Redoxzustände ausgewählter Substrate bezüglich *p*HBA.  $n_e$ : Anzahl an Elektronen, die für die vollständige Umsetzung des Substrates zu *p*HBA benötigt (positives Vorzeichen) beziehungsweise abgegeben (negatives Vorzeichen) werden.

Tabelle 26 Redox-Halbreaktionen für die Umsetzungen unterschiedlicher Substrate zu *para*-Hydroxybenzoessäure (*p*HBA).

Substrat	Redoxreaktion
Glycerin	$7 \text{ C}_3\text{H}_8\text{O}_3 \rightarrow 3 \text{ C}_7\text{H}_6\text{O}_3 + 24 \text{ H}_2\text{O} + 5 \text{ H}^+ + 5 \text{ e}^-$
Glucose	$7 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 6 \text{ C}_7\text{H}_6\text{O}_3 + 24 \text{ H}_2\text{O}$
Citrat	$7 \text{ C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + 42 \text{ H}^+ + 42 \text{ e}^- \rightarrow 6 \text{ C}_7\text{H}_6\text{O}_3 + 31 \text{ H}_2\text{O}$
Succinat	$7 \text{ C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + 14 \text{ H}^+ + 14 \text{ e}^- \rightarrow 4 \text{ C}_7\text{H}_6\text{O}_3 + 16 \text{ H}_2\text{O}$
Malat	$7 \text{ C}_4\text{H}_6\text{O}_5 + 28 \text{ H}^+ + 28 \text{ e}^- \rightarrow 4 \text{ C}_7\text{H}_6\text{O}_3 + 23 \text{ H}_2\text{O}$

## 14.5 Modifikationen des Modells iJP815

### 14.5.1 iJP815<sub>mod</sub>

```

model = removeRxnns(model,'IR09886');
model = addReaction(model,'IR09886',{'C0001','C0002','C9324','C0008','C0009','C0065',
    'EC9324'}, [-1133135 -1133135 -10000 1133135 1133135 1133135
    10000],false,0,1000,0,"");
model = changeRxnBounds(model,'IR08984',3.96,'l');
model = changeRxnBounds(model,'IR08984',1000,'u');

```

### 14.5.2 iJP815<sub>mod,pHBA</sub>

Darstellung der Deletion des für die 4-Hydroxybenzoat-3-Hydroxymonooxygenase codierenden Gens *pobA* durch einen Nullfluss:

```

model = changeRxnBounds (model, 'IR03632', 0, 'b')

```

Darstellung des *p*HBA-Exports:

```

model = addReaction(model, 'EX_EC0133', 'EC0133 <=>');
model = changeRxnBounds(model,'EX_EC0133',1000,'u');
model = changeRxnBounds(model,'EX_EC0133',0,'l');
model = addReaction(model, 'Formation', 'C0133 -> EC0133');

```

### 14.5.3 pHBA-Produktion

Maximierung der Zielfunktion 'EX\_EC0133' zur Abschätzung der *in silico* pHBA-Erträge:

```
model = changeObjective(model, 'EX_EC0133')
```

### 14.5.4 Anaerobe Bedingungen

Darstellung anaerober Bedingungen:

```
model = changeRxnBounds(model, 'EX_EC0007', 0, 'b');
```

### 14.5.5 Anodenatmung

Darstellung der Anoden Reaktion:

```
model = addReaction(model, 'Anode', ' Anode <=> ');  
model = changeRxnBounds(model, 'Anode', 1000, 'u');  
model = changeRxnBounds(model, 'Anode', 0, 'l');  
model = addReaction(model, 'Transfer_Anode', ' EC_e -> Anode ');  
model = addReaction(model, 'Mediator', ' shuttle_red -> shuttle_ox + EC_e ');
```

Regeneration von Cytochrom c durch externen Elektronentransfer:

```
model = addReaction(model, 'bc1', ' shuttle_ox + C9315 -> C9314 + shuttle_red ');
```

Regeneration von NADH durch externen Elektronentransfer:

```
model = addReaction(model, 'NADHPool', ' shuttle_ox + C0004 -> C0003 + shuttle_red ');
```

Regeneration von UQH2 durch externen Elektronentransfer:

```
model = addReaction(model, 'UQH2Pool', ' shuttle_ox + C9315 -> C9314 + shuttle_red ');
```



## 14.6 OD-Biomassekorrelationsfaktor

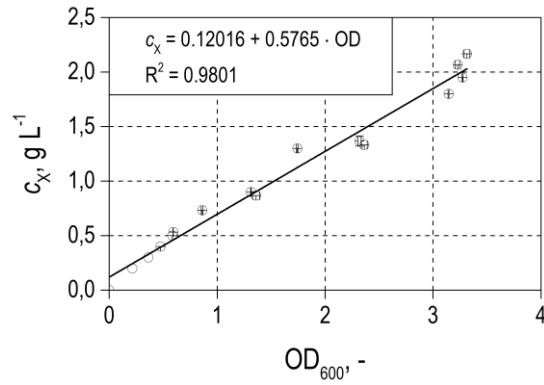


Abbildung 58 Bestimmung des OD-Biomassekorrelationsfaktors  $a_X$  zur Berechnung der Biomassekonzentration.

## 14.7 HPLC-Retentionszeiten

Tabelle 27 HPLC Retentionszeiten. Eluent: 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Temperatur 60 °C, Flussrate 0.7 mL min<sup>-1</sup>  
Säule: Aminex-87-HP-X.

Verbindung	UV	RI
Oxalsäure	5,8	6,1
Citrat	6,9	7,1
<i>2-Oxoglutarat</i>	7,4	7,6
<i>Oxalacetat</i>	8,2	8,4
<i>Malat</i>	8,2	8,5
<i>Glyoxylat</i>	8,2	8,5
Pyruvat	8,6	8,8
Shikimat	9,7	10,2
Succinat	9,9	10,1
IPTG	10,3	-
Lactat	10,8	11,1
Fumarat	11,0	11,6
<i>Aspartat</i>	11,5	11,8
Acetat	12,8	13,0
Chorismat	13,3	13,6
Propionat	15,0	14,7
Butyrat	17,6	17,9
Aceton	18,3	18,6
Ethanol	-	19,0
Propanol	-	23,4
Butanol	-	31,1
<i>p</i> HBA	42,3	-

## 14.8 Identifikation von Nebenprodukten

### 14.8.1 Malat

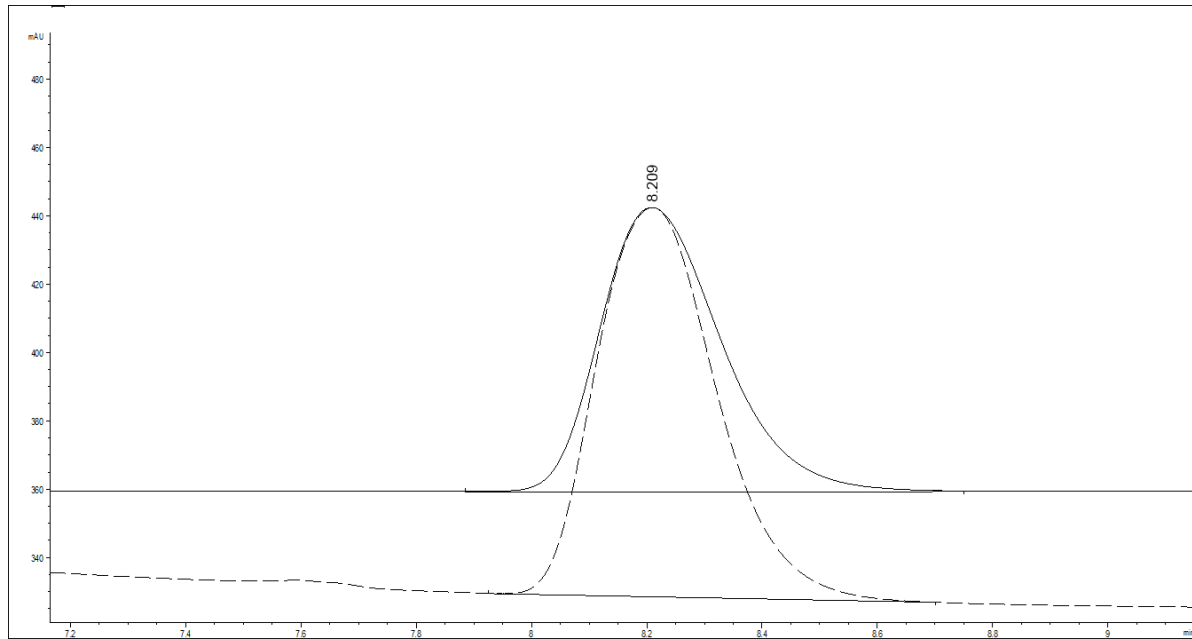


Abbildung 59 HPLC-Chromatogramm von Malat. UV-Detektor. Durchgezogene Linie: Standard; Gestrichelte Linie: Probe.

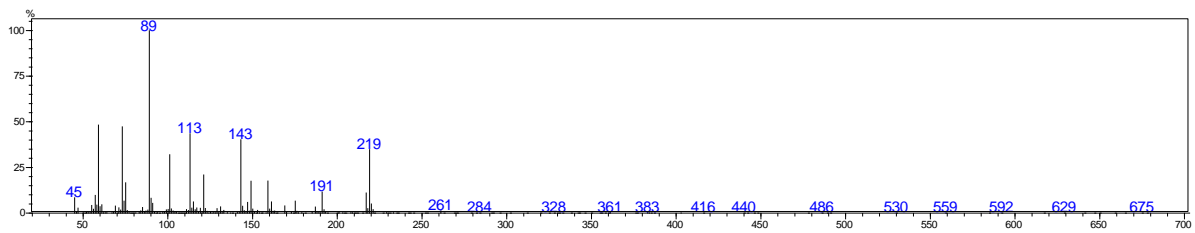


Abbildung 60 Massenspektrum von Citrat. Fraktionierte Probe: 8,3 min Fraktion. Retentionszeit: 17,9 min; MW 276 g mol<sup>-1</sup>; Identifizierte Verbindung: 2-Hydroxysuccinatdimethylester (1 Tert-Butyldimethylsilyl-Ether) = Malatdimethylester.

### 14.8.2 Fumarat

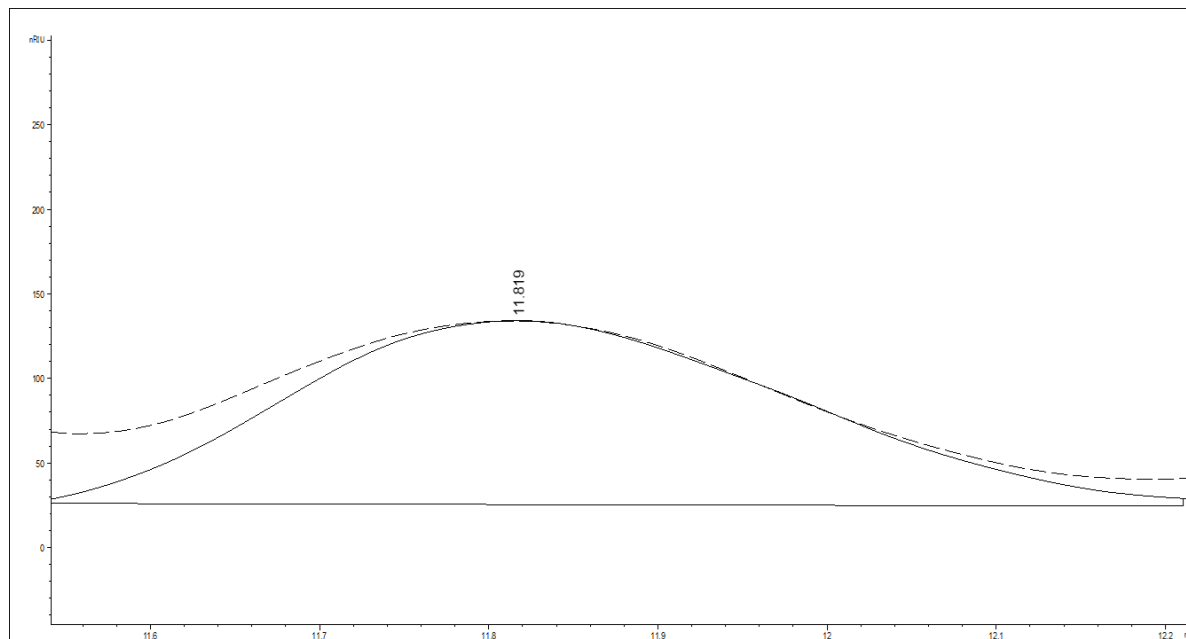


Abbildung 61 HPLC-Chromatogramm von Fumarat. RI-Detektor. Durchgezogene Linie: Standard; Gestrichelte Linie: Probe.

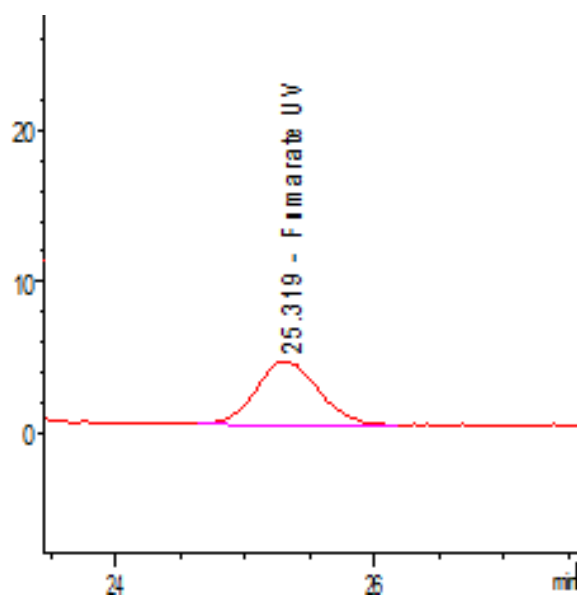


Abbildung 62 Nachweis von Fumarat mittels HPLC einer ausgewählten Probe, die an der University of Queensland bezüglich Nebenprodukte untersucht wurde.

## 14.9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Funktionen und Anforderungen der zentralen Komponenten elektrochemischer Zellen oder Reaktoren .....	8
Tabelle 2	Standard-Redoxpotentiale ( $E^0'$ ) der Halbreaktionen der Atmungskette.....	32
Tabelle 3	Standard-Redoxpotentiale ( $E^{0'}$ ) der verwendeten Mediatoren.....	35
Tabelle 4	Mikrobielle <i>p</i> HBA-Produktion in der wissenschaftlichen Literatur.....	44
Tabelle 5	Zusammensetzung des definierten Mediums M9 .....	50
Tabelle 6	Zusammensetzung der Spurenelement-Stammlösung .....	51
Tabelle 7	Zusammensetzung der für Kathodenkammer und Salzbrücke verwendeten Elektrolytlösung.....	51
Tabelle 8	Mit den Modellen <i>i</i> JP815 und <i>i</i> JP815 <sub>mod</sub> geschätzte Biomasseerträge .....	74
Tabelle 9	Substrate zur <i>p</i> HBA-Produktion.....	78
Tabelle 10	Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA/pSEVA-ubiC</i> . 81	81
Tabelle 11	Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit <i>P. putida</i> KT2440 wt.....	92
Tabelle 12	Übersicht wichtiger Kenngrößen der aeroben Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA/pSEVA-ubiC</i> 100	100
Tabelle 13	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium mit FeCl <sub>3</sub> , K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> oder Riboflavin. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	117
Tabelle 14	Projizierte, geometrische und spezifische Oberflächen der Graphit-Stab-, Graphit-Bürsten- und Graphit-Vlieselektrode.....	137
Tabelle 15	Redoxreaktion an der Anode bei mediatorvermittelter Anodenatmung .....	146
Tabelle 16	Redoxreaktionen im Medium bei mediatorvermittelter Anodenatmung .....	147
Tabelle 17	Vergleich wichtiger Kenngrößen der Sauerstoff- und Anodenatmung .....	165
Tabelle 18	Funktionen und Eigenschaften der zentralen Komponenten bio-elektrochemischer Prozesse .....	176
Tabelle 19	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.....	205

Tabelle 20	Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors im aeroben Betrieb .....	207
Tabelle 21	Komponenten des Glas-Rührkesselreaktors Labfors für die Anodenatmung.....	207
Tabelle 22	Komponenten des 1 L Systems für Anodenatmung im Satzverfahren .....	208
Tabelle 23	Komponenten des 0,1 L Parallelsystems .....	209
Tabelle 24	Allgemeine Geräte .....	209
Tabelle 25	Bauteile und Software der HPLC-Anlage .....	210
Tabelle 26	Redox-Halbreaktionen für die Umsetzungen unterschiedlicher Substrate zu <i>para</i> - Hydroxybenzoesäure ( <i>p</i> HBA). .....	213
Tabelle 27	HPLC Retentionszeiten. ....	216

## 14.10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prinzipieller Aufbau einer einfachen elektrochemischen Zelle.....	7
Abbildung 2	Physikalisch-chemische Prozesse an der Phasengrenze Elektrode/ Elektrolyt.....	11
Abbildung 3	Ablauf einer heterogenen katalysierten Reaktion.....	11
Abbildung 4	Schematische Darstellung einer Standard-Wasserstoffelektrode .....	15
Abbildung 5	Elektroden erster und zweiter Art.....	16
Abbildung 6	Schematische Darstellung der elektrochemischen Redox-Reihe.....	17
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Drei-Elektrodenanordnung.....	19
Abbildung 8	Prinzip der zyklischen Voltammetrie .....	20
Abbildung 9	Schematische Darstellungen von bio-elektrochemischen Systemen .....	24
Abbildung 10	Reaktorgeometrien bio-elektrochemischer Systeme .....	25
Abbildung 11	Schematische Darstellung von unterschiedlichen Membranen .....	29
Abbildung 12	Schematische Darstellung von Graphit .....	30
Abbildung 13	Schematische Darstellung des intra- und extrazellulären mikrobiellen Elektronentransfers.....	31
Abbildung 14	Schematische Darstellung der externen Elektronentransfermechanismen .....	34
Abbildung 15	Elektronenmikroskopaufnahme von <i>Pseudomonas putida</i> .....	36
Abbildung 16	Vereinfachte Darstellung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. putida</i> KT2440.....	39
Abbildung 17	Strukturformel der <i>para</i> -Hydroxybenzoesäure (pHBA).....	42
Abbildung 18	Kolbe-Schmitt-Reaktion zur Herstellung von <i>para</i> -Hydroxybenzoesäure.....	43
Abbildung 19	Wachstumsphasen im substratlimitierten Satzprozess .....	45
Abbildung 20	0,1 L-Parallelsystem für Satzprozesse mit Anodenatmung .....	54
Abbildung 21	1 L-System für anaerobe Satzprozesse mit Anodenatmung .....	56
Abbildung 22	Kathodenkammer und Referenzelektrode für die Verwendung im 1 L-System sowie im 1,8 L- und 3,6 L-Rührkesselreaktor. ....	57

Abbildung 23	Modifizierter 1,8 L-Rührkesselreaktoren für die Verwendung als bioelektrochemischer Reaktor .....	61
Abbildung 24	Modifizierter 3,6 L-Rührkesselreaktoren für die Verwendung als bioelektrochemischer Reaktor .....	62
Abbildung 25	Schematische Darstellung der Richards-Funktion zur Beschreibung von Biomasse- und Produktkonzentrationen .....	65
Abbildung 26	Schematische Darstellung der Richards-Funktion für Substratkonzentrationen .....	65
Abbildung 27	Mit den Modellen iJP815 (weiße Balken ) und iJP815 <sub>mod</sub> (schraffierte Balken) geschätzte Biomasseerträge .....	73
Abbildung 28	Experimentelle Validierung der genomweiten Modelle iJP815 und iJP815 <sub>mod</sub> .....	74
Abbildung 29	<i>In silico</i> pHBA-Erträge für die Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC .....	77
Abbildung 30	Aerobe Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC zur pHBA-Produktion.....	83
Abbildung 31	Aerobe Satzprozesse zur Umsetzung unterschiedlicher Substrate mit <i>P. putida</i> KT2440.....	95
Abbildung 32	Vergleichende Darstellung aerober Satzprozesse mit <i>P. putida</i> KT2440 (wt) und <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pobA/pSEVA-ubiC (mut) .....	103
Abbildung 33	Anaerobe Satzprozesse von <i>P. putida</i> KT2440 in Anaerobflaschen .....	106
Abbildung 34	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 im Satzverfahren in Komplexmedium .....	109
Abbildung 35	Biofilm auf Graphitgewebe .....	110
Abbildung 36	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium .	111
Abbildung 37	Zyklische Voltammogramme der Mediatoren.....	114
Abbildung 38	Anodenatmung im Satzverfahren mit <i>P. putida</i> KT2440 in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators FeCl <sub>3</sub> .....	115
Abbildung 39	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .....	116



---

Abbildung 40	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 im Satzverfahren in definiertem Medium. Untersuchung des Mediators Riboflavin .....	117
Abbildung 41	Satzprozesse mit <i>P. putida</i> KT2440 (■) und <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ (○) im definierten Medium mit unterschiedlichen $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentrationen ....	120
Abbildung 42	Einfluss der $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration auf die Wachstumsrate (A) und die Biomassezunahme (B).....	121
Abbildung 43	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Satzverfahren in definiertem Medium mit unterschiedlichen Substraten .....	123
Abbildung 44	Nebenproduktbildung bei der Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Satzverfahren in definiertem Medium mit unterschiedlichen Substraten..	126
Abbildung 45	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Satzverfahren: Vergleich der maximalen substratspezifischen <i>p</i> HBA-Erträge mit unterschiedlichen Substraten .....	127
Abbildung 46	Untersuchung elektrochemischer Reaktionen und chemischer Redoxreaktionen von <i>p</i> HBA mittels zyklischer Voltammetrie .....	132
Abbildung 47	Elektrochemische Reaktionen und chemische Redoxreaktionen von <i>p</i> HBA bei Anodenatmung.....	133
Abbildung 48	Untersuchung der Metabolisierung von <i>p</i> HBA durch <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ .....	135
Abbildung 49	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Satzverfahren: Untersuchung unterschiedlicher Elektroden.....	139
Abbildung 50	Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Satzverfahren im Rührkesselreaktor: Einflüsse erhöhter Rührergeschwindigkeit und Mediatorkonzentrationen auf die Anodenatmung .....	144
Abbildung 51	Umsetzung von Citrat mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im anaeroben Satzverfahren mit Anodenatmung: Einfluss des Redoxpotentials des Mediums auf die Anodenatmung.....	150
Abbildung 52	Anodenatmung im Satzverfahren mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta poba/pSEVA-ubiC$ im Rührkesselreaktor: Messung des Redoxpotentials im Medium bei unterschiedlichen Rührergeschwindigkeiten .....	154

---

Abbildung 53	Schematische Darstellung der Anodenatmung und <i>p</i> HBA-Herstellung mit <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA</i> /pSEVA- <i>ubiC</i> im Rührkesselreaktor .....	156
Abbildung 54:	Verbesserte Anodenatmung von <i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ <i>pobA</i> /pSEVA- <i>ubiC</i> im Rührkesselreaktor .....	158
Abbildung 55	Vergleich von Sauerstoff- und Anodenatmung .....	164
Abbildung 56	Im Rahmen dieser Arbeit gestalteter Elektro-Rührkesselreaktor im Litermaßstab .	170
Abbildung 57	Redoxzustände ausgewählter Substrate bezüglich <i>p</i> HBA .....	212
Abbildung 58	Bestimmung des OD-Biomassekorrelationsfaktors $\alpha_x$ .....	215
Abbildung 59	HPLC-Chromatogramm von Malat. ....	217
Abbildung 60	Massenspektrum von Citrat .....	217
Abbildung 61	HPLC-Chromatogramm von Fumarat. ....	218
Abbildung 62	Nachweis von Fumarat mittels HPLC .....	218



