

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

## **Vergleichende reaktionstechnische Analyse verschiedener acetogener Mikroorganismen zur Gasfermentation**

**Anna Lydia Groher**

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ing. Hartmut Spliethoff

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

Die Dissertation wurde am 29.06.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 14.09.2016 angenommen.



# Danksagung

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

Zunächst möchte ich Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit danken, am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik im Rahmen einer spannenden und anspruchsvollen Fragestellung meine Promotion durchführen zu können. Besonders bedanken möchte ich mich außerdem für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die mir zur Verfügung stehenden Freiräume beim Bearbeiten dieses Projektes.

Bei dem Coreferenten Dr. rer. nat. Wolfgang Liebl und bei dem Prüfungsvorsitzenden Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Danke auch an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die einzigartige Arbeitsatmosphäre und die super Zusammenarbeit, wobei ich vor allem Markus Amann, Harald Krispin, Andreas Schmieder, Ellen Truxius und Christoph Mähler herausheben möchte. Alexander Mayer, Christina Kantzow und Kathrin Doll möchte ich zudem für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Bei Tobias Koch, Stefan Schmieder, Sonja Kinna, Kristin Schoppel, Simone Rothmiller, Micheal Muthsam, Thorsten Dzidowski, Martin Birkert, Jeremy von Poschinger, Jana Weißer und Sebastian Imperiale bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung im Rahmen von studentischen Arbeiten und ihrer Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskräfte.

Christina Kantzow, Benjamin Kick und Yilei Fu möchte ich für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft danken. Ihr habt die Zeit am Lehrstuhl unvergesslich für mich gemacht.

Meinen Eltern und auch meinen Geschwistern gilt ein riesiges Dankeschön für den bedingungslosen Rückhalt und ihre vollste Unterstützung, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre. Ihr seid die Besten!

Besonders danken möchte ich auch meinem Verlobten Martin: Danke, dass du immer für mich da warst, alle meinen Launen ertragen hast und mich bei allem unterstützt hast.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>7</b>
3.1	Acetogene Mikroorganismen .....	7
3.1.1	Heterotropher Stoffwechsel .....	8
3.1.2	Autotropher Stoffwechsel .....	11
3.1.3	Autotrophes Produktspektrum .....	13
3.1.4	Bioenergetik .....	19
3.1.5	Verwendete Bakterienstämme.....	21
3.2	Medienzusammensetzung für die autotrophe Kultivierung von acetogenen Mikroorganismen .....	30
3.2.1	Komplexbestandteile .....	30
3.2.2	Vitamine .....	30
3.2.3	Spurenelemente .....	31
3.2.4	Reduktionsmittel.....	32
3.3	Prozesstechnische Grundlagen .....	33
3.3.1	Mikrobielles Wachstum.....	34
3.3.2	Kinetik von Wachstum und Produktbildung.....	34
3.4	Gas-Flüssig-Stofftransport im Rührkesselreaktor.....	36
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>40</b>
4.1	Bakterienstämme .....	40
4.2	Anaerobes Arbeiten .....	40
4.3	Kultivierungsmedien: Zusammensetzung und Herstellung .....	41
4.4	Kultivierung acetogener Bakterien .....	43
4.4.1	Stammhaltung .....	43
4.4.2	Vorkulturherstellung .....	43
4.4.3	Autotrophe Satzkultivierung in Anaerobflaschen.....	44
4.4.4	Autotrophe Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor.....	45
4.5	Analytische Methoden.....	47
4.5.1	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration .....	47
4.5.2	HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Produkten .....	48

4.5.3	Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsraten .....	48
4.5.4	Bestimmung der Ammoniumkonzentration.....	49
4.5.5	Bestimmung der Gasaufnahme an der Abgasanalytik.....	50
4.6	Erstellen des phylogenetischen Stammbaums .....	51
<b>5</b>	<b>Reaktionstechnischer Vergleich verschiedener acetogener Mikroorganismen* .....</b>	<b>52</b>
5.1	Auswahl der Bakterienstämme .....	52
5.2	Festlegung von Standardbedingungen für die autotrophe Satzkultivierung .....	55
5.2.1	Entwicklung eines Standardmediums .....	56
5.2.2	Leistungs- und Gaseintrag im Rührkesselreaktor.....	61
5.3	Autotrophe Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor .....	66
5.3.1	<i>Acetobacterium woodii</i> als Referenzstamm .....	66
5.3.2	<i>Acetobacterium fimetarium</i> .....	69
5.3.3	<i>Acetobacterium wieringae</i> .....	71
5.3.4	<i>Blautia hydrogenotrophica</i> .....	74
5.3.5	<i>Clostridium magnum</i> .....	76
5.3.6	<i>Eubacterium aggregans</i> .....	79
5.3.7	<i>Sporomusa acidovorans</i> .....	81
5.3.8	<i>Sporomusa ovata</i> .....	83
5.3.9	<i>Terrisporobacter mayombeii</i> .....	86
5.3.10	Vergleich der untersuchten acetogenen Mikroorganismen.....	88
<b>6</b>	<b>Autotrophe Satzkultivierungen in definiertem Medium .....</b>	<b>95</b>
6.1.1	<i>Acetobacterium wieringae</i> .....	95
6.1.2	<i>Clostridium magnum</i> .....	98
6.1.3	<i>Sporomusa ovata</i> .....	101
<b>7</b>	<b>Weiterführende reaktionstechnische Analyse von <i>Sporomusa ovata</i> .....</b>	<b>104</b>
7.1	Untersuchungen zur Ethanolbildung.....	104
7.2	Kohlenstoffmonoxid als Substrat .....	109
7.2.1	Variation der Substratzusammensetzung.....	109
7.2.2	Variation des Kohlenstoffmonoxid-Partialdrucks .....	115
7.2.3	Bedeutung des pH.....	124
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>142</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....</b>	<b>155</b>

---

<b>11 Anhang</b> .....	<b>157</b>
11.1 Medienzusätze und Puffer .....	157
11.2 $\mu$ -GC-Methodik .....	159
11.3 GA-Medium.....	160
11.4 Zugangsnummern für 16s rRNA Gensequenzen .....	162
11.5 Verwendete Chemikalien Materialien .....	163
11.6 Verwendete Geräte.....	166



# 1 Einleitung

Der globale Klimawandel macht die Reduktion der Kohlenstoffdioxidemission zu einer der größten Herausforderungen für die Industrie. Bei der Uno-Klimakonferenz 2009 in Kopenhagen wurde beschlossen, dass die Erderwärmung, welche durch den Ausstoß von Treibhausgasen verursacht wird, unter einem Schwellenwert von 2 °C gehalten werden soll (McGlade und Ekins 2015). Um dieses Ziel zu erreichen muss der Kohlenstoffausstoß zwischen 2011 und 2050 auf 1,1 Gigatonnen Kohlenstoffdioxid beschränkt werden. Die potentielle Treibhausgasemission der derzeit noch global vorhandenen fossilen Rohstoffreserven wird jedoch auf etwa das dreifache dieses Wertes geschätzt, weshalb deren Nutzung nicht mit der festgesetzten Obergrenze der Erderwärmung vereinbar ist (Meinshausen et al. 2009). Aus diesem Grund muss in den nächsten Jahren intensiv nach Alternativen zu den ohnehin bald erschöpfenden fossilen Rohstoffquellen gesucht werden.

Eine vielversprechende Strategie zur Einhaltung der Kohlenstoffdioxid-Emissions-Restriktionen und zur Bereitstellung einer Alternative zu fossilen Rohstoffen stellt die Nutzung nachwachsender Kohlenstoffquellen, beispielsweise in Form von Biokraftstoffen dar. Die Strategie der Produktion von Biokraftstoffen der ersten Generation aus nachwachsenden Nutzpflanzen, wie Zuckerrohr oder Mais brachte jedoch gravierende Nachteile mit sich. So stehen Biokraftstoffe der ersten Generation in direkter Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion, wobei die steigende Nachfrage nach Nutzpflanzen und Agrarland für die Produktion von Biokraftstoffen einer der Gründe für das Ansteigen der Lebensmittelpreisen in den letzten Jahren ist. Zudem führte die Rodung von natürlicher Vegetation zur Schaffung von neuen Anbauflächen zu einer verstärkten Freisetzung von Kohlenstoffdioxid (Fargione et al. 2008).

Die beschriebenen Nachteile waren folglich der Ursprung der zweiten Generation an Biokraftstoffen. Hierbei wird anstelle von Nutzpflanzen lignocellulosehaltige, sowie jegliche andere Art von kohlenstoffhaltiger Abfallbiomasse als Ausgangssubstrat für die Kraftstoffproduktion verwendet, wobei es drei Herangehensweisen zur Nutzung dieser Biomasse gibt: Die Lignocellulose kann beispielsweise in ihre Zuckermonomere aufgeschlossen werden, welche dann anschließend als Substrate für verschiedenste Prozesse eingesetzt werden können. Eine andere Herangehensweise ist die Vergasung von schwer abbaubarer Biomasse oder kohlenstoffhaltigen Abfällen jeglicher Art zu Synthesegas, welches zum größten Teil aus Kohlenstoffdioxid, Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff zusammengesetzt ist. Das entstandene Synthesegas kann anschließend entweder durch den Fischer-Tropsch-Prozess zu

flüssigen Kohlenwasserstoffen umgesetzt werden oder als Substrat für die sogenannte Gasfermentation zur Produktion von Chemikalien und Biokraftstoffen durch Mikroorganismen eingesetzt werden (Daniell et al. 2012; Henstra et al. 2007). Die Gasfermentation stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz da, der mehrere Vorteile gegenüber den anderen Prozessen besitzt. Im Gegensatz zum Aufschluss von Lignocellulose zu Einfachzuckern trägt die Gasfermentation durch die Verwertung von Kohlenstoffdioxid aktiv zur Reduktion des Treibhauseffekts bei und bietet zudem eine sehr hohe Rohstoffflexibilität (Schiel-Bengelsdorf und Dürre 2012). Im Vergleich zum Fischer-Tropsch-Prozess weist die Gasfermentation unter anderem hohe Substratspezifitäten, eine gute Toleranz gegenüber Teer und anderen Verunreinigungsspuren, sowie moderate Betriebstemperaturen auf (Munasinghe und Khanal 2010).

Als Biokatalysatoren für die Gasfermentation werden strikt anaerobe, acetogene Mikroorganismen eingesetzt, welche in der Lage sind die Bestandteile des Synthesegases (Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonoxid) als Energie- und Kohlenstoffquellen für Wachstum und Produktbildung zu nutzen (Ragsdale und Pierce 2008). Neben den potentiellen Biokraftstoffen Ethanol und Butanol können acetogene Mikroorganismen Synthesegas jedoch auch zu industriell relevante Chemikalien wie Acetat, Butyrat oder 2,3-Butandiol umsetzen.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Interesse der Industriellen Biotechnologie an der Gasfermentation, einem Prozess bei dem acetogene Mikroorganismen Synthesegas zu verschiedenen Produkten wie beispielsweise Acetat, Ethanol, Butanol oder 2,3-Butandiol umsetzen (Ragsdale und Pierce 2008), ist in den letzten Jahren signifikant angestiegen. Während 2003 lediglich eine Veröffentlichung zum Thema Gasfermentation erschien, waren es 2011 bereits über 40 (Daniell et al. 2012). Als Resultat hatten die drei Unternehmen INEOS Bio, Coskata Inc. und LanzaTech für 2012 das Erreichen einer Kommerzialisierung von Gasfermentationsprozessen zur Produktion von Biokraftstoffen und Chemikalien angekündigt. Doch trotz intensiver Forschung und Entwicklung hat lediglich INEOS Bio 2013 eine kommerzielle Anlage zur Produktion von Ethanol aus Synthesegas, welches durch das Vergasen von pflanzlicher Abfallbiomasse gewonnen wird, in Betrieb genommen, wobei eine jährliche Produktion von 24 Kilotonnen Ethanol erwartet wird.

Große Herausforderungen auf dem Weg zur industriellen Nutzung der Gasfermentation sind geringe Produktkonzentrationen und Produktselektivitäten, sowie die ineffiziente Verwertung der gasförmigen Substrate und geringe Biomassekonzentrationen (Liew et al. 2013), wobei letztere zudem zu geringen Raum-Zeit-Ausbeuten (volumetrische Produktivität) führt. Nach derzeitigem Wissen umfassen die acetogenen Mikroorganismen 23 Gattungen mit insgesamt mehr als 100 verschiedenen Spezies (Drake et al. 2008). Doch trotz dieser Vielzahl an potentiellen Biokatalysatoren für die Gasfermentation wurden bis jetzt nur einige wenige Bakterienstämme im Detail studiert. Die am besten charakterisierten Stämme gehören dabei den Gattungen *Clostridium* und *Acetobacterium* an (Bertsch und Müller 2015; Daniell et al. 2012; Köpke et al. 2010). Während *Clostridien* meist ein vielfältiges Produktspektrum (Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, 2,3-Butandiol) aufweisen, jedoch nur geringe Wachstums- und Produktbildungsraten zeigen (Liou et al. 2005), wurde für *Acetobacterium woodii* lediglich die Bildung von Acetat nachgewiesen, wobei jedoch hohe Wachstum- und Acetatbildungsraten, sowie hohe Acetatkonzentrationen beschrieben wurden (Kantzow et al. 2015).

Eine intensive Untersuchung und Charakterisierung von weiteren acetogenen Mikroorganismen führt möglicherweise zur Identifikation von Bakterienstämmen, welche die Vorteile von *Clostridien* und *Acetobacterien* kombinieren und dazu beitragen könnten, Herausforderungen bei der Gasfermentation, wie beispielsweise geringe Produktselektivitäten, die ineffiziente Verwertung der gasförmigen Substrate oder geringe Biomassekonzentrationen zu überwinden. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine reaktionstechnische Charakterisierung und ein

anschließender Vergleich der autotrophen Prozessleistung von weiteren, bis dato nur sehr wenig erforschten, acetogenen Bakterien realisiert werden, von denen noch keine reaktionstechnischen Prozessgrößen, wie beispielsweise Wachstums- oder Produktbildungsraten bekannt sind.

Alle in der Literatur bereits näher beschriebenen acetogenen Bakterien gehören lediglich wenigen verschiedenen Gattungen an. Die im Rahmen dieser Arbeit zu charakterisierenden Mikroorganismen sollen im Gegensatz dazu die Vielfalt der acetogenen Bakterien repräsentieren und deshalb möglichst vielen verschiedenen Gattungen angehören. Um dieser Anforderung nachzukommen, soll die evolutionäre Beziehung der acetogenen Bakterien untereinander zunächst anhand der Auftragung in einem phylogenetischen Stammbaum veranschaulicht werden. Auf der Grundlage des erstellten Stammbaums kann anschließend die Auswahl der Spezies erfolgen, welche die Mannigfaltigkeit der acetogenen Bakterien am besten wiedergeben.

Die reaktionstechnische Charakterisierung der autotrophen Prozessleistung der ausgewählten Bakterienstämme soll in einem vollständig kontrollierten und kontinuierlich mit Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid begasten 1 L-Rührkesselreaktor durchgeführt werden. Um anschließend einen aussagekräftigen Vergleich der reaktionstechnischen Prozessgrößen der verschiedenen acetogenen Bakterien zu gewährleisten, sollen alle autotrophen Satzkultivierungen zudem unter standardisierten Bedingungen erfolgen, wobei vor allem das Reaktionsmedium sowie der Leistungseintrag eine große Rolle spielen. Um die Eignung der festgelegten Bedingungen zu überprüfen und um Referenzdaten für den Vergleich der autotrophen Prozessleistungen zu generieren, soll zudem *Acetobacterium woodii*, eines der am besten untersuchten acetogenen Bakterien als Referenzstamm ebenfalls autotroph unter den festgelegten Standardbedingungen kultiviert werden.

Ein großes Problem für einen aussagekräftigen Vergleich der ermittelten Prozessgrößen ist besonders die heterogene Zusammensetzung der Kultivierungsmedien die für die einzelnen acetogenen Bakterien deklariert werden. Da Medienbestandteile wie Hefeextrakt (Leclerc et al. 1998), Vitamine (Saxena und Tanner 2012) oder Spurenelemente (Saxena und Tanner 2011) einen großen Einfluss auf die autotrophe Prozessleistung von Acetogenen haben, macht der Einsatz dieser Kultivierungsmedien einen realistischen Vergleich der Prozessleistungen unmöglich. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines standardisierten Reaktionsmediums, welches für die autotrophe Kultivierung möglichst vieler verschiedener acetogener Mikroorganismen geeignet ist, ein erster wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Durch den direkten Zusammenhang von Leistungseintrag und Gaseintragsraten (Chmiel 2011), stellt der Leistungseintrag, welcher in Rührkesselreaktoren zum größten Teil über die Drehzahl

eingestellt wird, eine weitere wichtige Einflussgröße auf die autotrophe Prozessleistung von Acetogenen dar (Munasinghe und Khanal 2010). Wird der Leistungseintrag bei Gasfermentationen zu niedrig gewählt, kommt es zu einer Limitierung der gasförmigen Substrate, weshalb zur Vermeidung solch einer Limitierung ein genügend hoher Leistungseintrag realisiert werden muss. Dem gegenüber steht jedoch die Beobachtung, dass einige acetogene Mikroorganismen scherkraftempfindlich sein sollen (Braun 1981). Um einen signifikanten Vergleich der autotrophen Prozessleistungen der zu charakterisierenden acetogenen Bakterien zu ermöglichen, soll bei allen Satzkultivierungen eine standardisierte Vorgehensweise zum Einstellen des Leistungseintrags erarbeitet werden.

Nachdem die Standardreaktionsbedingungen für die reaktionstechnische Charakterisierung festgelegt sind, können die autotrophe Satzkultivierung und der anschließende Vergleich der detektierten Prozessparameter aller ausgewählten acetogenen Bakterienstämme erfolgen.

Das acetogene Bakterium, welches anhand des Vergleichs der autotrophen Prozessleistung der ausgewählten Acetogenen als leistungsstärkstes Bakterium identifiziert wird, soll anschließend noch weiter reaktionstechnisch analysiert werden.

Acetat ist das autotrophe Hauptprodukt aller acetogenen Bakterien, wobei in geringen Mengen auch höherwertige Produkte wie beispielsweise Ethanol, Butanol oder 2,3-Butandiol identifiziert wurden (Ragsdale und Pierce 2008). Durch seinen Einsatz als Kraftstoff und Kraftstoffzusatz spielt Ethanol eine wichtige Rolle bei der Suche nach Alternativen zu Rohöl und stellt so ein besonders interessantes Produkt der Gasfermentation dar. Aus diesem Grund soll der identifizierte Bakterienstamm mit den besten autotrophen Prozessparametern vor allem im Hinblick auf die Bildung dieses Produkts näher analysiert werden. Da der Fermentations-pH in der Literatur als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf das Produktspektrum von acetogenen Bakterien beschrieben wird (Kundiya et al. 2011; Phillips et al. 1993), soll insbesondere die Auswirkung der Variation des Fermentations-pH auf die Bildung von Ethanol evaluiert werden.

Synthesegas besteht neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid auch aus Kohlenstoffmonoxid. Aus diesem Grund soll weiterhin untersucht werden, ob das leistungsstärkste der untersuchten acetogenen Bakterien auch Kohlenstoffmonoxid als Substrat für den autotrophen Stoffwechsel nutzen kann. Für verschiedene acetogene Mikroorganismen wurde bereits gezeigt, dass diese sowohl Synthesegas als auch eine Mischung aus lediglich Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonoxid als Substrat verwerten können. Einige wenige sind sogar in der Lage Kohlenstoffmonoxid als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Abrini et al. 1994; Kerby und Zeikus 1983). Daher soll weiterhin der Einsatz verschiedener Gaszusammensetzungen als Substrat evaluiert werden.

Der Anteil an Kohlenstoffmonoxid im Synthesegas variieren stark und kann abhängig vom vergasten Ausgangsmaterial 5 % - 60 % betragen (Tirado-Acevedo et al. 2010). Da für mehrere acetogene Mikroorganismen bereits ein negativer Einfluss von hohen Kohlenstoffmonoxidpartialdrücken auf die autotrophe Prozessleistung gezeigt wurde (Hurst und Lewis 2010; Vega et al. 1989), soll zudem untersucht werden, welchen Einfluss eine Variation des Kohlenstoffmonoxidpartialdruck auf die autotrophe Prozessleistung und das Produktspektrum des zu analysierenden Bakterienstamms hat.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Acetogene Mikroorganismen

Acetogene Bakterien, oder auch Acetogene, sind eine spezielle Gruppe obligat anaerober Mikroorganismen, die den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg nutzen um (Drake 1995).

- CO<sub>2</sub> zu Acetyl-CoA zu reduzieren
- Energie zu konservieren
- Zellmasse aus CO<sub>2</sub> aufzubauen

Das erste acetogene Bakterium, *Clostridium aceticum* wurde 1936 von Wieringa isoliert. Bis heute sind über 100 acetogene Spezies bekannt, die den folgenden 25 Gattungen angehören: *Acetitomaculum*, *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Bryantella*, *Butyribacterium*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Holophaga*, *Moorella*, *Natroniella*, *Natronincola*, *Oxobacter*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Syntrophococcus*, *Terrisporobacter*, *Tindallia*, *Thermoacetogenium*, *Thermoanaerobacter* und *Treponema* (Drake et al. 2008; Gerritsen et al. 2014). Die am besten untersuchten Acetogenen gehören zu den Gattungen *Clostridium* (Daniell et al. 2012; Köpke et al. 2010) und *Acetobacterium* (Bertsch und Müller 2015). Acetogene Bakterien können ubiquitär in der Natur gefunden werden wie beispielsweise Untertage (Kotelnikova 2002), im Dickdarm von Termiten (Graber und Breznak 2004), im menschlichen Darm (Rey et al. 2010), im Erdreich (Drake et al. 1997) oder in Frischwasser- und Marinesedimenten (Hoehler et al. 1999). Neben alkaliphilen (Allen et al. 2010) gibt es auch halophile (Zavarzin et al. 1995), thermophile (Drake und Daniel 2004) oder auch psychrophile (Kotsyurbenko et al. 1995) acetogene Mikroorganismen. Acetogene Bakterien sind fakultativ autotroph und bewerkstelligen ihr Wachstum entweder durch die Oxidation verschiedener organischer Substrate wie Hexosen, Pentosen, Alkoholen und Methylgruppen (vergleiche Kapitel 3.1.1) oder durch die Oxidation von anorganischen Substraten wie Kohlenstoffmonoxid (CO) oder Wasserstoff (H<sub>2</sub>), wobei letzteres normalerweise mit der Reduktion von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) gekoppelt ist (vergleiche Kapitel 3.1.2) (Drake et al. 2006). In den letzten Jahren hat die Forschung auf dem Gebiet der acetogenen Mikroorganismen stark zugenommen, so wurde beispielsweise das Genom der 13 folgenden Acetogenen sequenziert: *Moorella thermoacetica* (Pierce et al. 2008), *Clostridium ljungdahlii* (Köpke et al. 2010), *Clostridium carboxidivorans* (Paul et al. 2010), *Eubacterium limosum* (Roh et al. 2011), *Acetobacterium woodii* (Schmidt 2011), *Clostridium autoethanogenum* (Bruno-

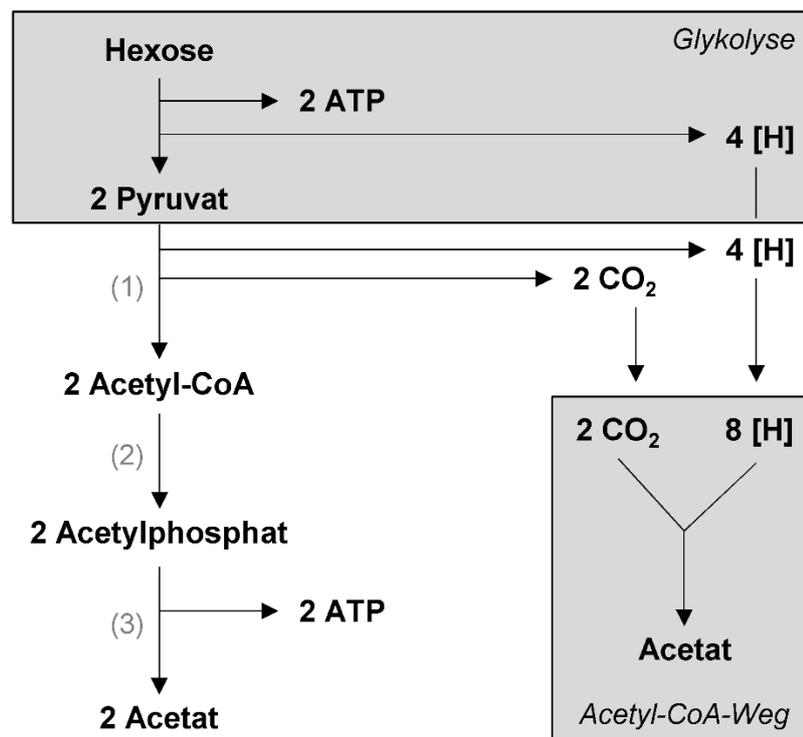
Barcena et al. 2013), *Sporomusa ovata* (Poehlein et al. 2013), *Clostridium drakei* (Jeong et al. 2014), *Thermoanaerobacter kivui* (Hess et al. 2014), *Clostridium acetium* (Poehlein et al. 2015), *Clostridium scatologenes* (Zhu et al. 2015), *Oxobacter pfennigii* (Bengelsdorf et al. 2015), *Acetobacterium bakii* (Hwang et al. 2015).

### 3.1.1 Heterotropher Stoffwechsel

Acetogene Mikroorganismen sind in der Lage verschiedenste organische Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Hexosen, Alkohole, N-Methyl-Verbindungen oder auch Aromaten als Substrat für Wachstum und Produktbildung zu nutzen. In diesem Kapitel soll der Metabolismus für die Verwertung von Hexosen und Betain näher betrachtet werden.

#### Metabolismus für den Abbau von Hexosen

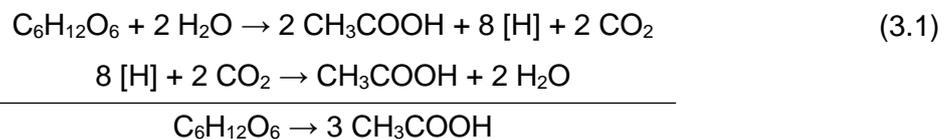
Acetogene Bakterien sind in der Lage Hexosen, wie beispielsweise Glucose zu Acetat als einzigem Endprodukt umzusetzen, wobei pro Mol Hexose 4 Mol ATP durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen werden (vergleiche Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Homoacetogene Umwandlung einer Hexose zu Acetat. Alle ATP wurden durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen. [H] steht für Reduktionsäquivalent. (1) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; (2) Phosphotransacetylase; (3) Acetatkinase. (abgeändert nach Müller et al. 2004).

Zunächst wird 1 Mol Hexose über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) unter Gewinnung von 2 Mol ATP und 4 Mol Reduktionsäquivalenten [H] zu 2 Mol Pyruvat aufgespalten. Anschließend werden die 2 Mol Pyruvat über die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu 2 Mol Acetyl-CoA decarboxyliert, wobei 4 Reduktionsäquivalente und 2 CO<sub>2</sub> freigesetzt werden. Die 2 Mol Acetyl-CoA werden zu 2 Mol Acetylphosphat und über die Acetatkinase weiter zu 2 Mol Acetat umgesetzt, wobei in letzterer Reaktion weitere 2 Mol ATP gewonnen werden. Die insgesamt entstandenen 2 Mol CO<sub>2</sub> und 4 Mol Reduktionsäquivalente werden über den reduktiven Acetyl-CoA Stoffwechselweg (vergleiche Kapitel 3.1.2) zu einem weiteren Mol Acetat umgesetzt (Drake et al. 2006).

Gleichung 3.1 zeigt die Stöchiometrie der Umsetzung von Hexosen zu Acetat am Beispiel von Glucose (Drake et al. 2008).



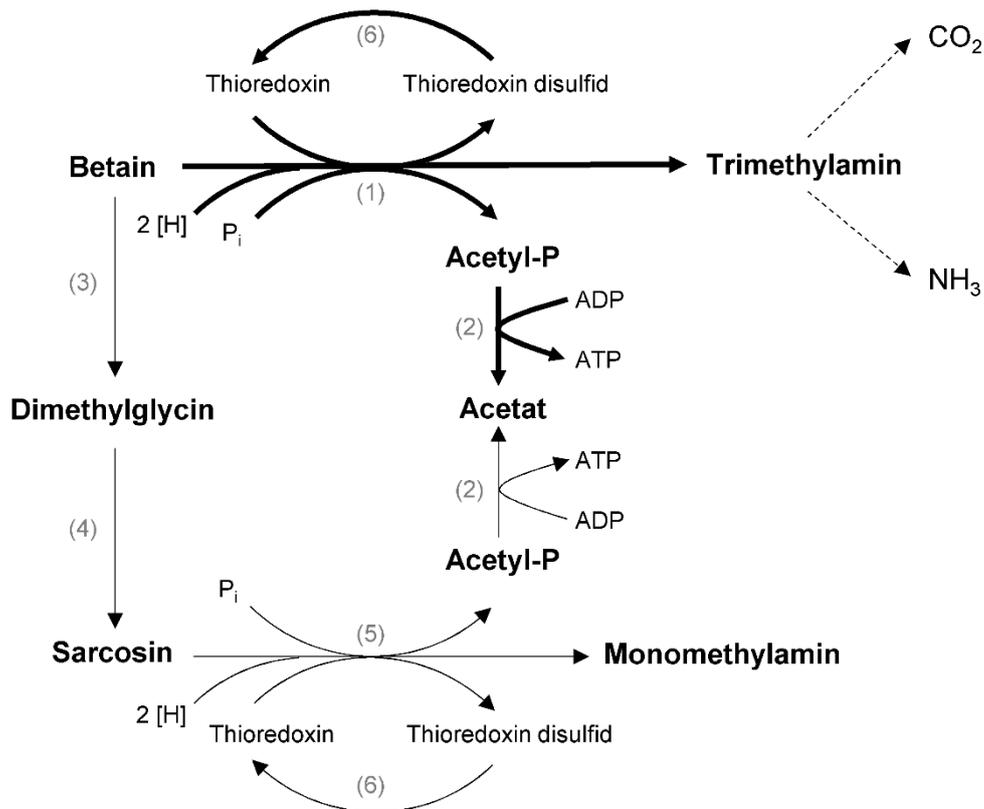
### Betain-Metabolismus

Einige Acetogene wie beispielsweise *Sporomusa ovata* (Möller et al. 1984) oder andere Mitglieder der Gattung *Sporomusa* (Dehning et al. 1989; Breznak et al. 1988; Ollivier et al. 1985) aber auch *Acetobacterium woodii* (Müller et al. 2008) und *Acetobacterium carbinolicum* (Eichler und Schink 1984) sind in der Lage N-Methyl-Verbindungen wie Betain zu verstoffwechseln. *S. ovata* setzt Betain neben Acetat und Trimethylamin auch zu geringe Mengen an CO<sub>2</sub> und Dimethylglycin um. Nach Möller et al. (1984) ergibt sich für den Abbau von Betain die in den Gleichung 3.2, angegebene Stöchiometrie:



Der genaue Stoffwechselweg zum Abbau von Betain in der Gattung *Sporomusa* ist nicht bekannt, Visser et al. (2015) gehen jedoch von dem in Abbildung 3.2 dargestellt Stoffwechselweg aus. Hauptsächlich wird Betain dabei durch die Betainreduktase zu Trimethylamin, Acetyl-P und Thioeredoxindisulfid umgesetzt, wobei ein Mol Phosphat, 2 Mol Reduktionsäquivalente und ein Mol Thioeredoxin verbraucht werden. Die Acetatkinase katalysiert

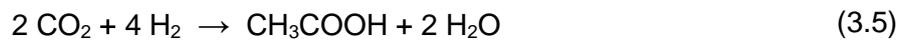
anschließend die Reaktion von Acetyl-P zu Acetat, wobei ein Mol ATP entsteht. Die Reduktionsäquivalente die durch die Betainreduktase verbraucht werden, werden durch die Oxidation von Methylgruppen zu  $\text{CO}_2$  generiert (Dieser Teil des Stoffwechsels ist durch den gestrichelten Pfeil ausgehend von Trimethylamin hinzu  $\text{CO}_2$  dargestellt). Zu einem geringen Teil wird Betain über einen anderen Weg abgebaut. Hierbei wird Betain zunächst zu Dimethylglycin und dann weiter zu Sarcosin demethyliert, wobei die Enzyme, welche die beiden Reaktionen katalysieren nicht bekannt sind. Anschließend wird Sarcosin über die Sarcosinreduktase zu Acetyl-Phosphat und weiter über die Acetatkinase zu Acetat umgesetzt.



**Abbildung 3.2:** Möglicher Stoffwechselweg für den Abbau von Betain in der Gattung *Sporomusa*. Die dicken Pfeile markieren den Hauptabbauweg. [H] steht für Reduktionsäquivalent. (1) Betainreduktase; (2) Acetatkinase; (3) Nicht bekannt; (4) Nicht bekannt; (5) Sarcosinreduktase; (6) Thioredoxinreduktase. (abgeändert nach Visser et al. 2015).

### 3.1.2 Autotropher Stoffwechsel

Acetogene Bakterien nutzen den sogenannten Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zur autotrophen Fixierung von Kohlenstoff. Dieser Stoffwechselweg wurde erstmals von Wood und Ljungdahl (Ljungdahl und Wood 1969) charakterisiert und wird deshalb auch als Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg bezeichnet. Dieser Stoffwechselweg ist das Erkennungsmerkmal von Acetogenen und ermöglicht eine Umsetzung von  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  und/oder  $\text{CO}$  zu Acetyl-CoA und weiter zu verschiedenen Endprodukten wie Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, Lactat oder 2,3-Butandiol. Die Bildung von Acetat aus den gasförmigen Substraten  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}$  kann dabei anhand der Gleichungen 3.5, 3.6, 3.7 beschrieben werden (Ragsdale und Pierce 2008):

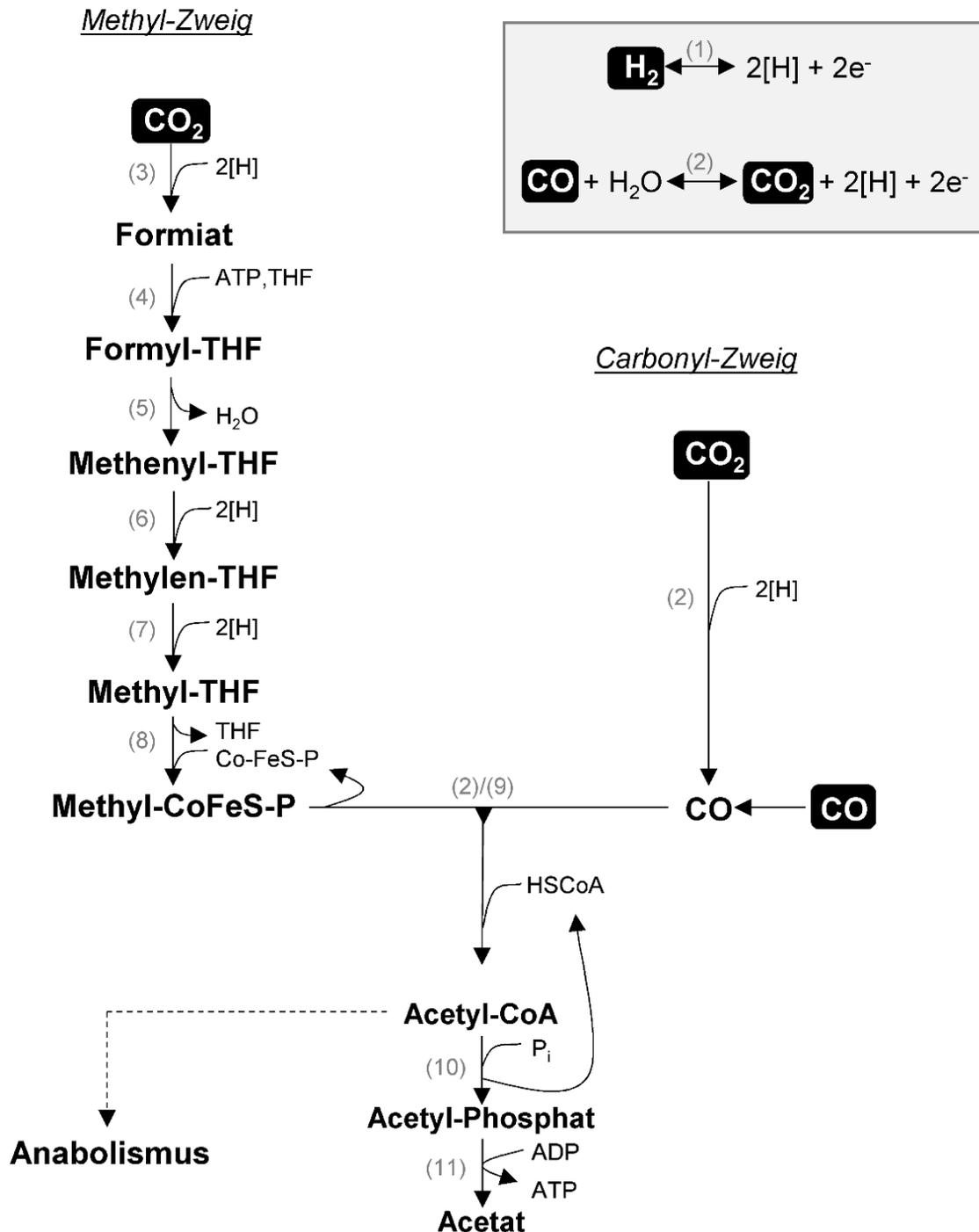


Der reduktive Acetyl-CoA Stoffwechselweg ist in Abbildung 3.3 dargestellt und setzt sich grundsätzlich aus dem Methyl- und dem Carbonyl-Zweig zusammen. Eine umfassende Beschreibung der Biochemie und Enzymologie des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs kann in verschiedenen Reviews nachgelesen werden, unter anderem in Arbeiten von Wood und Ljungdahl (Ljungdahl und Wood 1969; Ljungdahl 1986), Ragsdale (Ragsdale und Pierce 2008; Ragsdale 2004) und Drake (Drake et al. 2006). In beiden Zweigen des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs findet die Reduktion von je einem Mol  $\text{CO}_2$  statt, im Methyl-Zweig wird  $\text{CO}_2$  zu einer Methylgruppe reduziert, im Carbonyl-Zweig zu  $\text{CO}$ .

In der ersten Reaktion des Methyl-Zweigs wird  $\text{CO}_2$  zu Formiat reduziert, anschließend wird die Formyl-Gruppe unter Verbrauch von einem Mol ATP an Tetrahydrofolat (THF) gebunden, wodurch Formyl-THF entsteht. Durch die Abspaltung von Wasser entsteht Methenyl-THF welches darauffolgend über Methylen-THF zu Methyl-THF reduziert wird. Die Methylgruppe wird dann durch eine Methyltransferase auf das Corrinoid-Eisen-Schwefel Protein des bifunktionalen CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthetase-Komplexes übertragen.

Im Carbonyl-Zweig wird ein zweites Mol  $\text{CO}_2$  zu einem enzymgebundenen  $\text{CO}$  reduziert. Der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthetase-Komplex katalysiert anschließend die Synthese von Acetyl-CoA ausgehen von einer Methyl-Gruppe, einer CO-Gruppe und Coenzym A. Acetyl-CoA kann anschließend über die Phosphotransacetylase und die Acetatkinase weiter zu Acetat umgesetzt werden, wobei in der Acetatkinase-Reaktion ein Mol ATP rückgewonnen wird. Dieses ATP kompensiert dabei den ATP-Verbrauch durch die Aktivierung von Formiat im Methylzweig.

Acetyl-CoA stellt nicht nur das zentrale Vorläufermolekül der Produktbildung, sondern auch aller anderen anabolen Stoffwechselprozesse, wie der Bildung von Biomasse und Biomolekülen, dar.

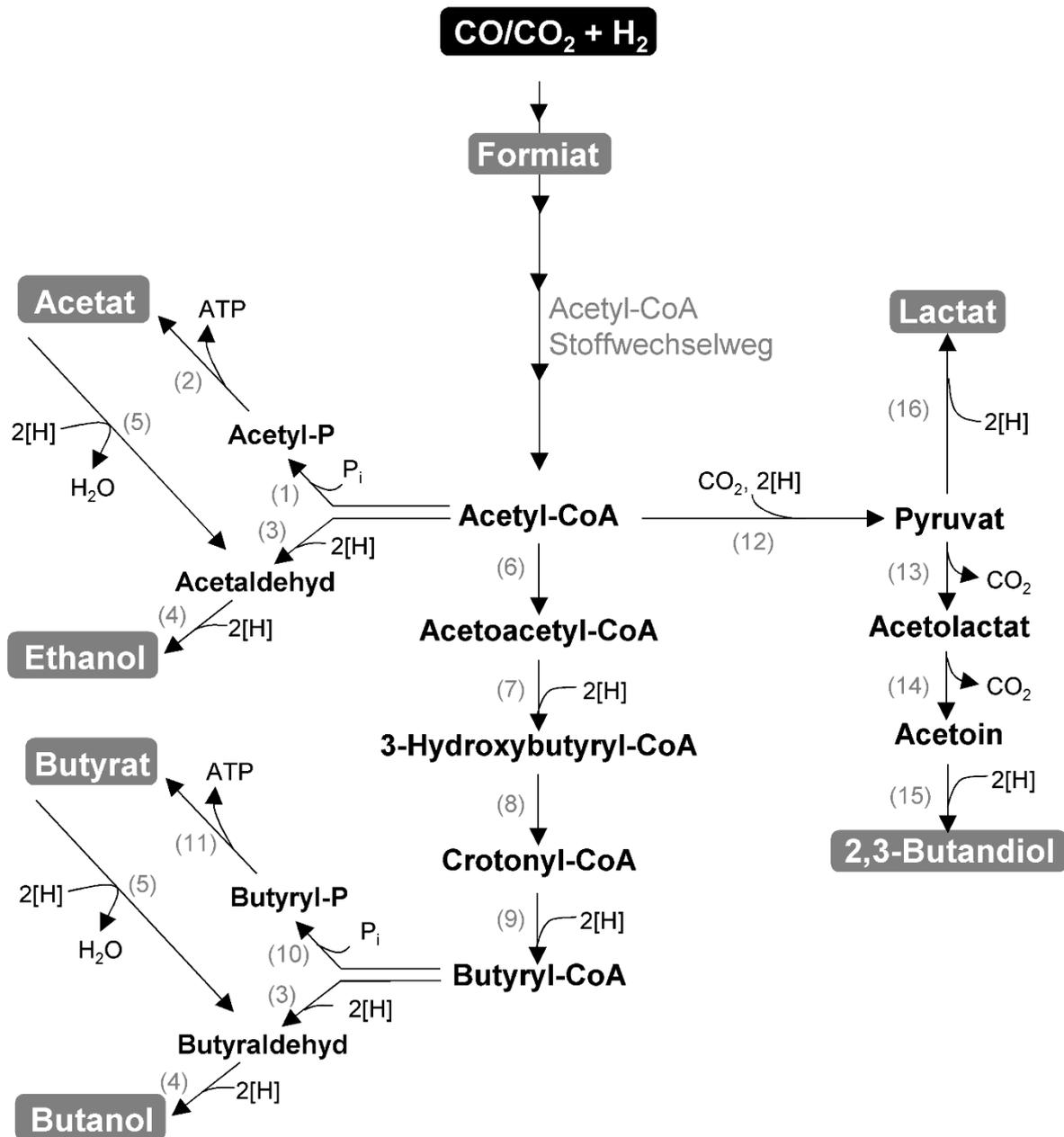


**Abbildung 3.3:** Reduktiver Acetyl-CoA Stoffwechselweg. Die angegebenen Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: (1) Hydrogenase; (2) CO-Dehydrogenase; (3) Kohlenstoffdioxidreduktase; (4) Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase; (5) Formyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase; (6) Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase; (7) Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase; (8) Methyl-Transferase; (9) Acetyl-CoA-Synthetase; (10) Phosphotransacetylase; (11) Acetatkinase. [H] gibt ein Reduktionsäquivalent an. THF = Tetrahydrofolat. (abgeändert nach Drake et al. 2008).

Die Reduktionsäquivalente welche für die Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Acetyl-CoA benötigt werden, können zum einen durch die Oxidation von Wasserstoff mittels einer Hydrogenase oder durch die Oxidation von CO mittels der CO-Dehydrogenase bereitgestellt werden (Müller 2003; Hu et al. 2011). Neben der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten führt die Oxidation von CO zudem zur Bildung von  $\text{CO}_2$ . Wird CO als Kohlenstoffquelle genutzt, kann es entweder direkt im Carbonyl-Zweig verwendet werden oder zunächst durch die Wassergas-Shift-Reaktion zu  $\text{CO}_2$  oxidiert und anschließend in den Acetyl-CoA Stoffwechselweg eingebracht werden.

### 3.1.3 Autotrophes Produktspektrum

Alle bis heute beschriebenen acetogenen Mikroorganismen produzieren Acetat (Drake et al. 2006). Wie schon in Kapitel 3.1.2 erwähnt, können einige autotroph kultivierte acetogene Bakterien neben Acetat auch noch weitere metabolische Endprodukte wie Ethanol, Butyrat, Butanol, Lactat oder 2,3-Butandiol bilden. In Abbildung 3.4 sind die Stoffwechselwege dargestellt, die zur Bildung der genannten Produkte genutzt werden. Zudem können in autotrophen Kultivierungen auch Metabole-Zwischenprodukte wie beispielsweise Formiat detektiert werden.



**Abbildung 3.4:** Autotrophe Bildung verschiedener Produkte ausgehend von Acetyl-CoA.  $[\text{H}]$  stellt ein Reduktionsäquivalent dar. (1) Phosphotransacetylase; (2) Acetatkinase, (3) Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase; (4) Alkoholdehydrogenase; (5) Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase; (6) Thiolase; (7) 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase; (8) Crotonase; (9) Butyryl-CoA-Dehydrogenase; (10) Phosphotransbutyrylase; (11) Butyratkinase; (12) Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; (13) Acetolactatsynthase; (14) Acetolactatdecarboxylase; (15) 2,3-Butandioldehydrogenase; (16) Lactatdehydrogenase. (abgeändert nach Daniell et al. 2012).

## Acetat

Wie schon in Kapitel 3.1.2 angegeben, wird bei der Bildung von einem Mol Acetat aus Acetyl-CoA ein Mol ATP rückgewonnen. Bei allen Acetogenen wurde Acetat als Endprodukt detektiert, da hierbei durch die ATP Gewinnung der ATP Verbrauch bei der Aktivierung von Formiat im Methyl-Zweig kompensieren werden kann. Nur bei der Bildung von Acetat als Endprodukt ist der netto ATP Gewinn bzw. Verlust im Acetyl-CoA Stoffwechselweg null. Bakterien die Acetat als einziges Endprodukt bilden werden auch als homoacetogen bezeichnet (Drake et al. 2006). Die höchsten Acetatkonzentrationen und Acetatbildungsraten wurden bis dato mit *A. woodii* erreicht. Kantzow et al. (2015) berichteten eine maximale Acetatkonzentration von  $59,2 \text{ g L}^{-1}$  mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $18,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei einer Satzkultivierung von *A. woodii* im Rührkesselreaktor, wobei  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  als Substrate dienten. In einem kontinuierlichen Prozess mit Zellrückhaltung wurden sogar Raum-Zeit-Ausbeuten von bis zu  $147,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  berichtet (Kantzow et al. 2015).

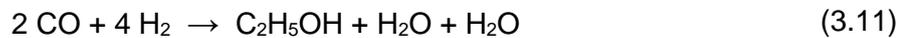
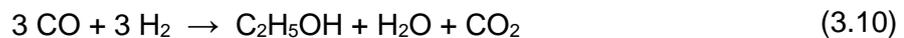
Essigsäure ist ein wichtiges industrielles Rohmaterial mit einer Anwendung in Verschiedenen Gebiete wie beispielsweise der pharmazeutischen und Textilindustrie oder auch der Lebensmittelverarbeitung (Daniell et al. 2012). Außerdem dient Essigsäure als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Vinylacetat und der Synthese von Essigsäureanhydriden. Der Bedarf an Essigsäure ist in den letzten Jahren erheblich angestiegen und es wird damit gerechnet, dass er 2017 12,15 Millionen Tonnen pro Jahr erreicht (Global Industry Analysts Inc 2012).

## Ethanol

Für die Bildung von Ethanol gibt es zwei Wege (vgl. Abbildung 3.4). Zum einen kann Ethanol direkt aus Acetyl-CoA über eine zweistufige Reaktion mit Acetaldehyd als Zwischenprodukt gebildet werden. Zum anderen kann die Bildung auch über Acetat und eine anschließende Reduktion zu Acetaldehyd erfolgen. Der letztere Reaktionsweg erfolgt bevorzugt bei niedrigem extrazellulärem pH (Mohammadi et al. 2012; Kundiyana et al. 2011), da hier sekretierte undissoziierte Essigsäure wieder zurück ins Zytoplasma diffundiert. Wegen dem basischeren intrazellulären pH dissoziiert die Essigsäure in Acetat und Proton, was ohne Gegenmaßnahme zu einer Beseitigung des Protonengradienten und somit einem zwangsläufigen Zelltod führen würde (Dürre 2005). Die Umsetzung von Acetat zu Ethanol erhöht den extrazellulären pH und gibt den Bakterien so Zeit zu sporulieren und ihr Überleben zu sichern (Daniell et al. 2012). Eine Verschiebung des Kohlenstoff- und Elektronenflusses bei erniedrigtem pH von der Acidogenese hin zur Solventogenese wurde bereits für mehrere Acetogene wie beispielsweise *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* und *Butyribacterium methylotrophicum* beschrieben (Phillips et

al. 1993; Kundiyana et al. 2010; Grethlein et al. 1990). Neben niedrigem pH (Abubackar et al. 2012, 2015) und hohen Konzentrationen an undissoziierter Essigsäure scheint auch die Erhöhung bzw. Limitierung von bestimmten Spurenelementen (siehe Kapitel 3.2.3) eine Rolle bei der Induktion der Solventogenese von Ethanol zu spielen (Saxena und Tanner 2011). Zudem fanden Cotter et al. (2009) heraus, dass auch eine Stickstofflimitierung zu einer erhöhten Ethanolproduktion bei *Clostridium autoethanogenum* führt.

Gleichungen 3.8 bis 3.11 beschreiben die Bildung von Ethanol mittels des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> bzw. CO als Substraten (Ragsdale und Pierce 2008):



Der Fokus zur Kommerzialisierung der Gasfermentation lag in den letzten Jahren vor allem auf der Produktion von Ethanol (Köpke et al. 2011a). Durch seinen Einsatz als Kraftstoff und Kraftstoffzusatz spielt Ethanol eine wichtige Rolle bei der Suche nach Alternativen zum Rohöl. Weitere Anwendung findet Ethanol jedoch auch in der Getränke- und Kosmetikindustrie. 2014 umfasste der globale Markt von Ethanol ca. 100 Milliarden Liter (Sudden 2015).

Schon 1993 erreichten Phillips et al. bei der autotrophen Kultivierung von *C. ljundahlia* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor mit Zellrecycling nach 560 Stunden eine Ethanolkonzentration von 48 g L<sup>-1</sup>. Als Substrat wurde hierbei eine Mischung aus H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> eingesetzt. Bei der autotrophen Kultivierung von *C. ragsdalei* in einem 100 L Pilotmaßstab-Fermenter mit H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> als Substrat wurde nach 59 Tagen eine Ethanolkonzentration von 25,3 g L<sup>-1</sup> erreicht (Kundiyana et al. 2010). Für *Alkalibaculum bacchi* wurde in einem kontinuierlichen Prozess mit Zellrecycling eine maximale Ethanolkonzentration von 6,6 g L<sup>-1</sup> nachgewiesen. Als Substrate dienten hier H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> (Liu et al. 2014). Auch bei *C. autoethanogenum* wurde die Produktion von Ethanol näher untersucht. In einem kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit reinem CO als Substrat wurden nach 859 Stunden 4,2 g L<sup>-1</sup> Ethanol erzielt (Abubackar et al. 2016a). Zusätzlich zu den genannten Acetogenen wurde die autotrophe Bildung von Ethanol auch für *B. methylotrophicum* (Lynd et al. 1982), *Clostridium carboxidivorans* (Liou et al. 2005), *Clostridium drakei* (Liou et al. 2005), *Clostridium scatologenes* (Liou et al. 2005), *Oxobacter pfennigii* (Krumholz und Bryant. 1985) und *S. ovata* (Möller et al. 1984) nachgewiesen.

Die beiden Firmen „Coskata Inc.“ und „LanzaTech“ betreiben bereits Pilotanlagen für die kommerzielle Herstellung von Ethanol mittels Gasfermentation und haben die Planung von kommerziellen Anlagen mit Kapazitäten von bis zu 8 Millionen Gallonen Ethanol pro Jahr bekanntgegeben (Liew et al. 2013). „INEOS Bio“ hat Mitte 2013 in Zusammenarbeit mit „New Planet Energy“ die weltweit erste kommerzielle Anlage eröffnet, bei der Synthesegas aus Abfallbiomasse zur Produktion von Ethanol mittels Gasfermentation genutzt wird (INEOS Bio 2013).

## Butyrat

Genau wie bei der Bildung von Acetat wird auch bei der Bildung von Butyrat im letzten Reaktionsschritt durch die Butyratkinase ein ATP freigesetzt. Da für die Produktion des C4-Körpers jedoch die Kondensation von 2 Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA durch eine Thiolase notwendig ist (vergleiche Abbildung 3.4), wird bei der Bildung von Butyrat als Endprodukt im Gegensatz zu Acetat nur halb so viel ATP rückgewonnen wie bei der Aktivierung von Formiat im Methylzweig verbraucht werden.

Die autotrophe Bildung von Butyrat wurde bereits für folgende acetogene Bakterien nachgewiesen: *B. methylotrophicum* (Grethlein et al. 1991), *C. carboxidivorans*, *C. drakei*, *C. scatologenes* (Liou et al. 2005), *Eubacterium limosum* (Genthner et al. 1981) und *O. pfennigii* (Krumholz und Bryant. 1985). Für *B. methylotrophicum* wurden dabei in einer Kultivierung im Bioreaktor mit CO als Substrat 1,48 g L<sup>-1</sup> Butyrat nach 408 Stunden erreicht (Grethlein et al. 1991).

Zusätzlich wurde durch gentechnische Veränderung von *C. ljundahlii* die Fähigkeit zur autotrophen Bildung des nicht natürlichen Produkts Butyrat in diesen Organismus eingebracht (Ueki et al. 2014).

Anwendung findet Buttersäure unter anderem in der Tierfutter-, Nahrungsmittel-, pharmazeutischen und der chemischen Industrie. Der Globale Marktwert von Buttersäure wurde 2015 auf 124,6 Millionen US Dollar geschätzt und es wird erwartet, dass er bis 2020 auf 289,3 Millionen steigt (MarketsandMarkets 2015a).

## Butanol

Für die Bildung von Butanol müssen wie bei Butyrat zunächst 2 Acetyl-CoA durch eine Thiolase zu Acetoacetyl-CoA kondensiert werden (vgl. Abbildung 3.4). Anschließend wird dieses Molekül über drei weitere Enzymreaktionen zu Butyryl-CoA umgesetzt. Ausgehend von Butyryl-CoA gibt

es wie für Ethanol auch für die Bildung von Butanol zwei verschiedene Wege. Zum einen kann Butanol direkt aus Butyryl-CoA über eine zweistufige Reaktion mit Butyraldehyd als Zwischenprodukt gebildet werden. Zum anderen kann die Bildung auch über Butyrat und eine anschließende Reduktion zu Butyraldehyd erfolgen, wobei dieser Weg bevorzugt bei niedrigem pH erfolgt (vergleiche Abschnitt über Ethanol). Es wird vermutet, dass neben einem niedrigem pH und einer hohen Konzentration an undissoziierter Buttersäure, auch limitierende Konzentrationen an Sulfat und Phosphat, sowie das Verhältnis ATP/ADP und das NAD(P)H Level eine Rolle in der Solventogenese von Butanol spielen (Köpke und Dürre 2011).

Die autotrophe Produktion von Butanol wurde bislang für *C. carboxidivorans* (Bruant et al. 2010) und *B. methylotrophicum* (Heiskanen et al. 2007) untersucht. Phillips et al. (2015) erreichten bei der autotrophen Kultivierung von *C. carboxidivorans* in Anaerobflaschen mit H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> als Substrat eine Butanolkonzentration von 1,09 g L<sup>-1</sup>. Für *B. methylotrophicum* wurde in einem kontinuierlichen Prozess mit Zellrecycling und CO als Substrat eine durchschnittliche Butanolkonzentration von 2,7 g L<sup>-1</sup> gezeigt (Grethlein et al. 1991).

Die Fähigkeit zur autotrophen Bildung von Butanol wurde außerdem durch gentechnische Veränderung von *C. ljundahlii* (Köpke et al. 2010) und *C. autoethanogenum* (Köpke und Liew 2010) ermöglicht, wobei mit letzterem 1,9 g L<sup>-1</sup> Butanol produziert werden konnten (Dürre 2016).

Die Nachfrage nach Butanol ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Im Zeitraum von 2005 bis 2013 steigerte sich der weltweite Verbrauch von Butanol um 2,7 % pro Jahr. Der größte Teil des Butanols wird dabei zur Herstellung von Butyl-Acrylat und Butyl-Acetat eingesetzt (Ceresana 2014). Doch neben der chemischen Anwendung gilt Butanol auch als vielversprechender Biokraftstoff und hat sogar einige Vorteile gegenüber Ethanol, wie beispielsweise eine höhere Energiedichte oder eine geringere Wasserabsorption (Dürre 2007; Köpke et al. 2011c).

## Lactat

Für die Bildung von Lactat wird zunächst Acetyl-CoA in Pyruvat umgesetzt, wobei 1 Mol CO<sub>2</sub> und 2 Mol Reduktionsäquivalente verbraucht werden. Anschließend wird Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert. Die autotrophe Bildung von Lactat wurde bislang für *C. autoethanogenum*, *C. ljundahlii* und *C. ragsdalei* gezeigt, wobei Konzentrationen von nur 0,018 g L<sup>-1</sup> detektiert wurden (Köpke et al. 2011b).

Anwendung findet Milchsäure vor allem zur Herstellung von Polylactiden, wobei es sich um biologisch abbaubare Polymere handelt, die vor allem zur Verpackung von kurzlebigen Gütern verwendet werden. Weitere Anwendungsfelder von Milchsäure sind unter anderen auch die

Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie, sowie die Pharmazeutische- und die Kosmetikindustrie. Es wird damit gerechnet, dass der globale Markt für Milchsäure bis 2020 auf 3,8 Milliarden US Dollar steigt (MarketsandMarkets 2015b).

### **2,3-Butandiol**

Genau wie bei der Bildung Lactat wird Acetyl-CoA bei der Bildung von 2,3-Butandiol zunächst zu Pyruvat umgesetzt. Anschließend katalysiert die Acetolactatsynthase die Bildung von 1 Mol Acetolactat aus 2 Mol Pyruvat. Acetolactat wird dann über Acetoin weiter zu 2,3-Butandiol umgesetzt (Köpke et al. 2014).

Die autotrophe Bildung von 2,3-Butandiol wurde bislang für die acetogenen Bakterien *C. autoethanogenum*, *C. ljundahlii* und *C. ragsdalei* nachgewiesen (Köpke et al. 2011b), wobei in Anaerobflaschen mit H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> als Substrat Konzentrationen von bis zu 0,18 g L<sup>-1</sup> gemessen wurden.

2,3-Butandiol ist eine hochwertige Chemikalie, die als Ausgangsstoff für die Produktion von industriellen Lösungsmitteln wie Methylethylketon,  $\gamma$ -Butyrolacton oder 1,3-Butadien dient, wobei letzteres ein Intermediat bei der Produktion von Nylon und ein Monomer für die Produktion von synthetischem Gummi ist. 2012 umfasste der globale Markt für 2,3-Butandiol ein Volumen von 61,8 Kilotonnen pro Jahr (Transparency Merket Research 2015).

„LanzaTech“ produzierte bereits CO-basiertes 2,3-Butandiol in einer Demonstrationsanlage mit einer Kapazität von 15 Tausend Gallonen pro Jahr und gab 2012 zum ersten Mal die Planung einer kommerziellen Anlage zur Herstellung von 2,3-Butandiol mittels Gasfermentation bekannt (LanzaTech 2012).

#### **3.1.4 Bioenergetik**

Bei der autotrophen Bildung verschiedener Endprodukte wie beispielsweise Acetat, Butyrat oder Lactat mittels dem Acetyl-CoA Stoffwechselweg (vergleiche Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) ist kein netto ATP-Gewinn durch Substratkettenphosphorylierung zu verzeichnen. Da der Acetyl-CoA Stoffwechselweg jedoch ein Wachstum der acetogenen Mikroorganismen ermöglicht, muss er an eine ATP Gewinnung mittels eines chemiosmotischen Mechanismus gekoppelt sein (Martin 2012). In acetogenen Mikroorganismen erfolgt die Energiekonservierung durch den Aufbau eines membranständigen Ionengradienten und dessen Kopplung an die ATP-Synthese.

Lange Zeit wurden acetogenen Mikroorganismen nach der Ausbildung des transmembranen Ionengradienten in zwei bioenergetische Klassen unterteilt: Zum einen die H<sup>+</sup>-abhängigen Acetogenen und zum anderen die Na<sup>+</sup>-abhängigen Acetogenen. Erstere nutzen demnach Cytochrome für den Aufbau eines transmembranen Protonengradienten, durch welchen eine ATP-Synthase angetrieben wird. Letztere nutzen im Gegensatz dazu einen transmembranen Natriumgradienten zu ATP-Synthese und besitzen keine Cytochrome (Müller 2003). Diese bioenergetische Klassifizierung der acetogenen Mikroorganismen wurde jedoch durch die Untersuchung von *C. ljungdahlii* widerlegt, da dieses acetogene Bakterium weder Cytochrome besitzt noch einen transmembranen Natriumgradienten aufbaut. 2014 wurde daher eine neue bioenergetische Klassifizierung der acetogenen Mikroorganismen vorgeschlagen, nach welcher eine Aufteilung in Rnf-Acetogene und Ech-Acetogene erfolgt. Rnf-Acetogene nutzen zum Aufbau eines Ionengradienten über die Zellmembran eine Ferredoxin-NAD<sup>+</sup> Oxidoreduktase mit mehreren Untereinheiten, welche auch als Rnf-Komplex bezeichnet wird. Ech-Acetogene hingegen nutzen eine energieübertragende Hydrogenase, Ech-Komplex, zum Aufbau eines transmembranen Ionengradienten. Das Ion, welches zum Aufbau des Gradienten über die Zellmembran und die anschließende Energiegewinnung mittels ATP-Synthese genutzt wird, führt zu einer weiteren Aufteilung der bioenergetischen Klassen in jeweils zwei Unterklassen (Schuchmann und Müller 2014): Na<sup>+</sup>-abhängige Rnf-Acetogene, H<sup>+</sup>-abhängige Rnf-Acetogene, H<sup>+</sup>-abhängige Ech-Acetogene und Na<sup>+</sup>-abhängige Ech-Acetogene, wobei für letztere bis dato noch kein zugehöriger Organismus bekannt ist. Eine detaillierte Beschreibung der Energiegewinnung der anderen drei Klassen kann bei Schuchmann und Müller (2014) nachgelesen werden.

### Na<sup>+</sup>-abhängige Rnf-Acetogene

*A. woodii* ist der Modellorganismus dieser bioenergetischen Klasse und das erste acetogene Bakterium dessen Energiegewinnung vollständig aufgeklärt ist. Durch die Bildung von einem Mol Acetat generiert dieser Mikroorganismus 0,3 Mol ATP, was zu folgender Gleichung führt:



### H<sup>+</sup>-abhängige Rnf-Acetogene

Der Modellorganismus dieser bioenergetischen Klasse ist *C. ljungdahlii*. Der Mechanismus der Energiegewinnung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. *C. ljungdahlii* besitzt die Gene für 5 verschiedene Hydrogenase und 3 unterschiedliche Gencluster für Formiatdehydrogenasen, wobei nicht bekannt ist welche der codierten Enzyme am Acetyl-CoA Stoffwechselweg beteiligt

sind. Zudem wurde die Methylen-THF-Reduktase dieses Organismus noch nicht aufgereinigt, weshalb nicht geklärt ist, welche Reduktionsäquivalente von diesem Enzym genutzt werden. Der ATP Gewinn von *C. ljungdahlii* kann deshalb nur theoretisch auf Grundlage der Kombination der verschiedenen Enzyme kalkuliert werden. Für die verschiedenen Enzymkombinationen wurden ein ATP Gewinn von 0,13 bis 0,63 Mol ATP pro Mol Acetat berechnet.

### H<sup>+</sup>-abhängige Ech-Acetogene

*M. thermoacetica* dient als Modellorganismus dieser bioenergetischen Klasse. Zunächst wurde angenommen, dass Cytochrome und Quinone in diesem Bakterium den Transport von Elektronen zu Methylen-THF bewerkstelligen. Es gibt jedoch keine experimentellen Daten die diese These stützen und keine Hinweis darauf, dass die Methylen-THF-Reduktase membrangebunden ist. Das einzige membrangebundene, potentiell Ion-transportierende Enzym, dass mit dem Acetyl-CoA Stoffwechselweg verbunden sein kann, ist eine energieübertragende Hydrogenase (Ech). Aus diesem Grund geht man jetzt davon aus, dass der Ech-Komplex ein essentieller Bestandteil des Energiegewinnungssystems in *M. thermoacetica* ist.

Die Energiegewinnung in *M. thermoacetica* konnte bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt werden, da der zweite Elektronakzeptor der Methylen-THF-Reduktase nicht bekannt ist. Unter der Annahme, dass Ferredoxin der zweite Elektronakzeptor ist, kann folgende Gleichung zur Energiegewinnung aufgestellt werden:



### 3.1.5 Verwendete Bakterienstämme

In diesem Kapitel werden alle, im Rahmen dieser Arbeit, verwendeten acetogenen Bakterienstämme beschrieben.

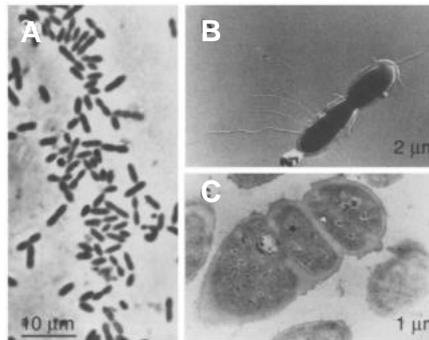
Tabelle 3.1 sind zunächst die wichtigsten Eigenschaften aller verwendeten acetogenen Bakterienstämme vergleichend dargestellt. Anschließend erfolgt zudem eine genaue Beschreibung der einzelnen Mikroorganismen.

**Tabelle 3.1:** Vergleich der wichtigsten Eigenschaften der verwendeten acetogenen Bakterienstämme.

	Substrate	Produkte	Temperatur	pH	motil	Sporen	Genom
<i>A. fimetarium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ; CO	Acetat	1 – 35 °C	6.0 – 8.5	ja	-	-
<i>A. wieringae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	opt. 30 °C	opt. 7.2 – 7.8	ja	-	-
<i>A. woodii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ; CO	Acetat, Formiat	opt. 30 °C	opt. 7.0	ja	-	sequenziert
<i>B. hydrogenotrophica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	opt. 35 – 37 °C	6.0 – 7.0	-	-	-
<i>C. magnum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	opt. 30 – 32 °C	6.0 – 7.5	ja	ja	-
<i>E. aggregans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Formiat	opt. 35 °C	6.0 – 9.0	-	-	-
<i>S. acidovorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	opt. 35 °C	5.4 – 7.5	ja	ja	-
<i>S. ovata</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Ethanol	opt. 34 – 39 °C	5.3 – 7.2	ja	ja	sequenziert
<i>T. mayombeii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	opt. 33 °C	5.5 – 9.3	ja	ja	-

***Acetobacterium fimetarium***

*A. fimetarium* (DSM 8238) ist ein gram-positives, oval geformtes Stäbchen. Es besitzt die Abmessungen 0,8 - 1,1 x 1,5 - 2,6 µm und wurde erstmals 1995 von Kotsyurbenko et al. aus Rinderdung isoliert. Eine Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Peritriche Flagellen erlauben *A. fimetarium* sich aktiv fortzubewegen (Abbildung 3.5). Dieses acetogene Bakterium wird als psychroaktiv bezeichnet, da Wachstum in einem Temperaturbereich zwischen 1 °C und 35 °C beobachtet werden kann. Die optimale Kultivierungstemperatur liegt bei 30°C. Der pH-Bereich reicht von 6,0 – 8,5 mit einem Optimum bei 7,5 (Kotsyurbenko et al. 1995).



**Abbildung 3.5:** Mikroskop-Aufnahmen von *A. fimetarium*. (A) Lichtmikroskop-Aufnahme; (B) Elektronenmikroskop-Aufnahme; (C) Ultradünnschnitt. (Kotsyurbenko et al. 1995)

Als heterotrophe Substrate wurden unter anderem Fructose, Malat, Lactat und Betain identifiziert. Acetat wurde als einziges Endprodukt der heterotrophen und auch der autotrophen Fermentation von *A. fimetarium* detektiert. Als autotrophes Substrat kann neben H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> auch CO dienen (Kotsyurbenko et al. 1995), wobei das Bakterium während der Verstoffwechslung dieser Substrate meist paarweise auftritt.

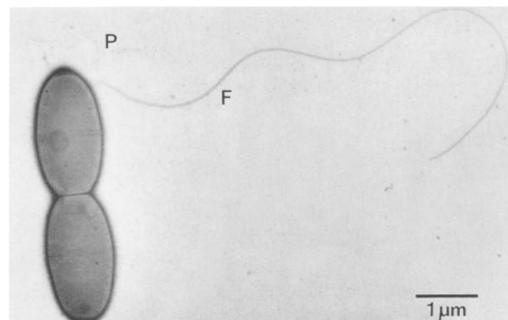
***Acetobacterium wieringae***

*A. wieringae* (DSM 1911) wurde nach K. T. Wieringa benannt, dem Entdecker des ersten chemolithotrophen Bakteriums *Clostridium aceticum*. *A. wieringae* ist ein gram-positives und stäbchenförmiges Bakterium, welches 1982 von Braun und Gottschalk aus einem Abwasserdigestor isoliert wurde und morphologisch *A. woodii* ähnelt. Es besitzt ein bis zwei subterminale Flagellen, durch welche es sich aktiv fortbewegen kann und hat eine Größe von etwa 1 x 1 - 2 µm. In einer aktiv wachsenden Kultur tritt *A. wieringae* meist in Paaren auf (Braun und Gottschalk 1982). Eine Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Der optimale pH-Bereich für eine autotrophe Kultivierung liegt zwischen 7,2 und 7,8. Das Temperaturoptimum beträgt 30°C. Als Substrate dienen neben H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> auch Fructose oder Lactat, wobei das einzige bis dato detektierte Fermentationsprodukt Acetat ist. Eine autotrophe Kultivierung von *A. wieringae* mit

H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als Substrat ist auch in definiertem Medium möglich. Glucose, Lactose, Ethanol und Pyruvat können nicht verstoffwechselt werden (Braun und Gottschalk 1982).

### ***Acetobacterium woodii***

*A. woodii* (DSM 1030) wurde 1977 von Balch et al. aus Meeressediment isoliert und nach Harland G. Wood benannt. Dieses stäbchenförmige Bakterium ist gram-positiv, tritt meist paarweise auf, ist 1 – 2 µm lang und kann sich durch seine ein bis zwei subterminalen Flagellen aktiv fortbewegen (Abbildung 3.6).

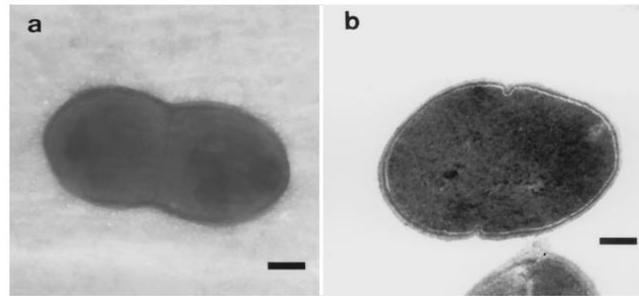


**Abbildung 3.6:** Elektronenmikroskop-Aufnahme von *A. woodii*. (P) Pili-artige Struktur. (F) Flagellum. (Balch et al. 1977)

Die optimale Wachstumstemperatur dieses Bakteriums liegt bei 30 °C, das pH-Optimum bei 7,0. Acetat ist das einzige Endprodukt sowohl der heterotrophen als auch der autotrophen Kultivierung von *A. woodii*. Als autotrophe Substrate können H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> oder auch CO verwendet werden (Balch et al. 1977; Bertsch und Müller 2015). Als heterotrophe Substrate dienen unter anderem Fructose, Glucose, Lactat und Glycerin (Balch et al. 1977; Fuchs 1986; Tanner et al. 1981). Darüber hinaus wurde zudem die Verwertung der N-Methyl-Verbindung Betain durch *A. woodii* beobachtet (Müller et al. 2008). Nach der erfolgreichen Sequenzierung des Genoms von *A. woodii* (Schmidt 2011) konnten bereits erste genetisch modifizierte Stämme für eine verbesserte autotrophe Acetatbildung generiert werden (Straub et al. 2014).

### ***Blautia hydrogenotrophica***

*B. hydrogenotrophica* (DSM 10507) bzw. früher *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, wurde 1996 von Bernalier et al. aus den Fäkalien eines Menschen isoliert. Die Namensänderung erfolgte 2008 durch Liu et al.. Es handelt sich bei *B. hydrogenotrophica* um einen gram-positiven, nicht-motilen Coccobacillus, der meist einzeln oder paarweise auftritt (Abbildung 3.7).

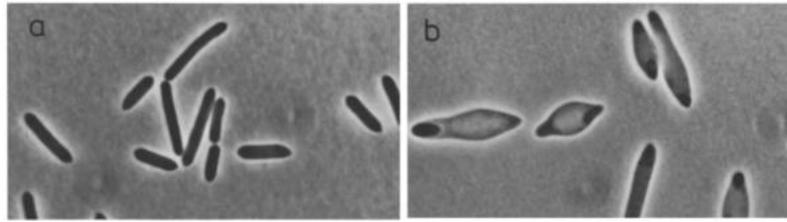


**Abbildung 3.7:** Morphologie von *B. hydrogenotrophica*. (A) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme nach negativ Färbung, Strich: 0,18 µm; (B) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme eines Dünnschnitts, Strich: 0,11 µm. (Bernalier et al. 1996)

Der pH-Bereich dieses Bakteriums liegt zwischen 6,0 und 7,0, das Temperaturoptimum zwischen 35 °C und 37 °C. Die Größe von *B. hydrogenotrophica* beträgt 0,6 x 0,7 µm. Eine Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Gemäß Literaturangabe ist die Zugabe von Hefeextrakt oder Pepton im Medium für eine erfolgreiche Kultivierung nicht notwendig, stimuliert jedoch das Wachstum. Das einzige Endprodukt der autotrophen Fermentation mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als Substrate ist Acetat (Bernalier et al. 1996). Bei der Verwendung von Glucose und Fructose als Substrat wurden neben dem Hauptprodukt Acetat auch noch kleinere Mengen an Lactat und Ethanol und Spuren von Isobutyrat und Isovalerat detektiert.

### ***Clostridium magnum***

*C. magnum* (DSM 2767) wurde 1984 von Schink aus pasteurisiertem Frischwassersediment isoliert und zunächst als nicht-autotrophes homoacetogenes Bakterium identifiziert. Erst 7 Jahre später wurde die Fähigkeit dieses Bakteriums zur Nutzung von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als Substrat bewiesen (Bomar et al. 1991). Eine autotrophe Kultivierung von *C. magnum* konnte nur durch die Zugabe von Hefeextrakt ins Medium erreicht werden, eine autotrophe Kultivierung in definiertem Medium war unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen nicht möglich. *C. magnum* ist sporenbildendes Stäbchen mit den Abmessungen 1 - 4 x 4 - 16 µm (Schink 1984) (Abbildung 3.8). Obwohl die Gramfärbung gram-negatives Ergebnis zeigte, besitzt dieses Bakterium keine gram-negative Zellwand-Architektur (Schink 1984). Polare und subpolare Flagellen ermöglichen eine aktive Fortbewegung. Das pH-Optimum dieses Bakteriums wurde als 7,0 identifiziert. Der pH-Bereich in dem Wachstum möglich ist, wird zwischen 6,0 und 7,5 angegeben. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 30 °C und 32 °C.

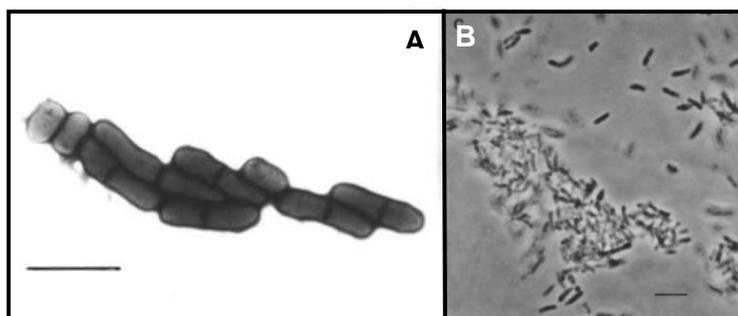


**Abbildung 3.8:** Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen von *C. magnum*. (A) Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase; (B) Bakterienzellen am Beginn der stationären Wachstumsphase. (Schink 1984)

Obwohl die Gramfärbung gram-negatives Ergebnis zeigte, besitzt dieses Bakterium keine gram-negative Zellwand-Architektur (Schink 1984). Polare und subpolare Flagellen ermöglichen eine aktive Fortbewegung. Das pH-Optimum dieses Bakteriums wurde als 7,0 identifiziert. Der pH-Bereich in dem Wachstum möglich ist, wird zwischen 6,0 und 7,5 angegeben. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 30 °C und 32 °C. Neben Fructose können auch Glucose, Sucrose, Xylose, Malat, Citrat, 2,3-Butandiol und Pyruvat als heterotrophe Substrate dienen. In allen Fällen ist das einzige Fermentationsprodukt Acetat (Schink 1984).

### ***Eubacterium aggregans***

*E. aggregans* (DSM 12183) ist ein gram-positives, nicht-sporenbildendes, stabförmiges Bakterium, das 1998 von Mechichi et al. aus einem methanogenen Reaktor isoliert wurde, welcher mit dem Abwasser einer Olivenmühle gespeist wurde (Abbildung 3.9).



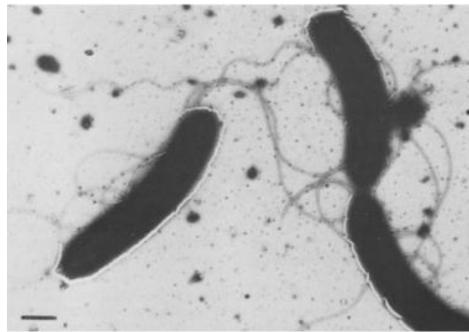
**Abbildung 3.9:** Morphologie von *E. aggregans*. (A) Negativ gefärbte Bakterienzellen, Strich: 2 µm; (B) Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme von aggregierenden Zellen, Strich: 5 µm. (Mechichi et al. 1998)

*E. aggregans* ist 2 – 3 x 0,4 – 0,8 µm groß und nicht beweglich. Seinen Namen erhielt dieses Bakterium auf Grund seiner extensiven Aggregatbildung (Mechichi et al. 1998). Ein Wachstum wurde in einem pH-Bereich von 6,0 – 9,0 beobachtet, wobei das pH-Optimum bei 7,2 liegt. Das Optimum der Wachstumstemperatur beträgt 35 °C. Gemäß Literaturangaben muss Hefeextrakt zugegeben werden, um ein Wachstum von *E. aggregans* zu erreichen. Bei der autotrophen

Kultivierung mit  $H_2$  und  $CO_2$  als Substrat wurden Acetat und Formiat als Endprodukte detektiert (Mechichi et al. 1998). Mit Glucose oder Fructose als Substrat wurden Formiat, Pyruvat, Acetat, Lactat, Ethanol und Butyrat als Produkt identifiziert (Majors et al. 2008). Neben Glucose und Fructose können auch Sucrose, Lactat, Methanol und Betain als heterotrophe Substrate dienen. Zudem wurde die Demethylierung verschiedener methoxylierter aromatischer Moleküle beobachtet (Mechichi et al. 1998).

### ***Sporomusa acidovorans***

*S. acidovorans* (DSM 3132) wurde 1985 von Ollivier et al. aus einem Pilot-Fermenter isoliert, der mit dem Abwasser einer Alkohol-Destillerie inokuliert wurde. Es handelt sich um ein gram-negatives, sporenbildendes, leicht gekrümmtes Stäbchen (Abbildung 3.10).

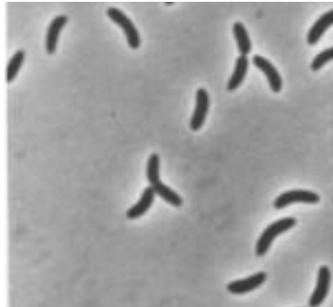


**Abbildung 3.10:** Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme von *S. acidovorans*, Strich: 0,5  $\mu m$  (Ollivier et al. 1985).

Laterale Flagellen ermöglichen dem Bakterium sich aktiv fortzubewegen. *S. acidovorans* ist 2 - 8 x 0,7 - 1  $\mu m$  groß und liegt stets einzeln oder in kurzen Ketten vor. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 35 °C, das pH-Optimum liegt zwischen 6,5 und 7,0. Wachstum wurde jedoch in einem pH-Bereich von 5,4 – 7,5 beobachtet. Unter den von Ollivier et al. (1985) verwendeten Bedingungen war eine Kultivierung von *S. acidovorans* in definiertem Medium nicht möglich. Neben  $CO_2$  und  $H_2$  dienen diesem Bakterium unter anderem auch Methanol, Glycerin, Formiat, Fumarat, Glutamat, Fructose und Ribose als Substrat. Das einzige, bislang detektierte organische Endprodukt ist Acetat (Ollivier et al. 1985).

### ***Sporomusa ovata***

*S. ovata* (DSM 2662) ist ein gram-negatives, sporenformendes, bananen-förmiges Stäbchen, das 1984 von Möller et al. aus einer Zuckerrübenblatt-Silage isoliert wurde (Abbildung 3.11). Es ist  $0,7 - 0,9 \times 3 - 5 \mu\text{m}$  groß und besitzt bis zu 15 unilaterale Flagellen.

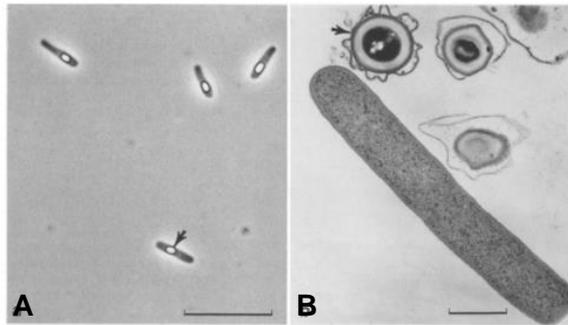


**Abbildung 3.11:** Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme von *S. ovata* (Möller et al. 1984).

Der optimale Temperaturbereich für ein Wachstum auf Betain liegt zwischen  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , der optimale pH-Bereich zwischen 5,3 und 7,2. Der pH-Bereich in dem Wachstum möglich ist befindet sich zwischen 5,0 und 8,1. *S. ovata* wurde erfolgreich in definiertem Medium kultiviert, wobei die Zugabe von Hefeextrakt zu einer Stimulation des Wachstums führte. Möller et al. (1984) detektierten  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$ , sowie Betain, N,N-dimethylglycin, Sarcosin, Fructose, Lactat, Pyruvat, Formiat, Methanol, Ethanol, n-Propanol, n-Butanol und 2,3-Butandiol als Substrate, wobei stets Acetat und geringe Mengen an Ethanol produziert wurden. 1993 wurde außerdem die Nutzung von 3,4-Dimethoxybenzoat als Substrat identifiziert (Stupperich und Konle). 2010 publizierten Nevin et al. die Reduktion von  $\text{CO}_2$  durch *S. ovata* mit Hilfe von Elektronen, die von einer Graphitelektrode bereit gestellt werden. Bei dieser sogenannten mikrobiellen Elektrosynthese wurden Acetat und 2-Oxobutyrat als Endprodukte identifiziert. Schließlich wurde 2013 auch das Genom von *S. ovata* sequenziert (Poehlein et al.).

### ***Terrisporobacter mayombeii***

*T. mayombeii* (DSM 6539) wurde 1991 von Kane et al. als *Clostridium mayombeii* aus dem Darm der bodenverwertenden afrikanischen Termiten *Cubitermes speciosus* isoliert und 2014 von Gerritsen et al. umbenannt. Es handelt sich hierbei um ein gram-positives, sporenbildendes Stäbchen, dass  $1 - 2 \times 6 \mu\text{m}$  groß ist und meinst paarweise auftritt (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** Morphologie von *T. mayombeii*. (A) Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme, Strich: 10 µm; (B) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme eines Dünnschnitts, Strich: 1 µm. (Kane et al. 1991)

Peritriche Flagellen ermöglichen dem Bakterium eine aktive Fortbewegung. Das Temperaturoptimum von *T. mayombeii* befindet sich nach Kane et al. (1991) bei 33 °C, das pH-Optimum bei 7,3. Ein Wachstum von *T. mayombeii* wird in einem pH-Bereich von 5,5 – 9,3 detektiert. Die autotrophe Fermentation der Substrate H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> führte zur Bildung von Acetat als einzigem Endprodukt. Als heterotrophe Substrate dienen unter anderem Glucose, Fructose, Xylose, Maltose, Glycerin und Malat, wobei auch hier das Hauptendprodukt Acetat ist. Um ein Wachstum von *C. mayombeii* zu erreichen, muss dem Medium Hefeextrakt zugesetzt werden (Kane et al. 1991).

## 3.2 Medienzusammensetzung für die autotrophe Kultivierung von acetogenen Mikroorganismen

In der Gasfermentation nutzen acetogene Bakterien  $H_2$ ,  $CO_2$  oder  $CO$  als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Um jedoch hohe Wachstums- und Produktbildungsrate zu erreichen, ist die zusätzliche Versorgung der Bakterien mit ausreichend Nährstoffen, Vitaminen und Spurenelementen eine Grundvoraussetzung. In diesem Kapitel soll deshalb die Bedeutung ausgesuchter Medienkomponenten für den autotrophen Stoffwechsel von acetogenen Mikroorganismen näher betrachtet werden.

### 3.2.1 Komplexbestandteile

Für viele anspruchsvolle Mikroorganismen ist der genaue Nährstoffbedarf noch nicht bekannt, was auch auf die Mehrzahl der acetogenen Bakterien zutrifft. In solchen Fällen erfolgt die Kultivierung in sogenannten komplexen oder undefinierten Nährmedien, denen Komplexbestandteile wie beispielsweise Hefeextrakt oder Pepton zugesetzt werden um so den Nährstoffbedarf der Bakterien zu decken (Fuchs et al. 2007). Hefeextrakt beispielsweise enthält unter anderem Oligopeptide, freie Aminosäuren, einige Fettsäuren, Kohlehydrate, Cholin und verschiedene Vitamine (Baltes 1971), wobei die genaue Zusammensetzung je nach Bezugsquelle und Charge variiert und somit nicht genau angegeben werden kann.

Für verschiedene acetogenen Mikroorganismen wie beispielsweise die in dieser Arbeit verwendeten *C. mayombeii*, *E. aggregans* und *S. acidovorans* wurde beschrieben, dass eine Kultivierung in definiertem Medium nicht möglich ist (Kane et al. 1991; Mechichi et al. 1998; Ollivier et al. 1985), also eine Zugabe von Komplexbestandteilen ins Medium nötig ist. Zudem wurde für einige Acetogene, die in definiertem Medium kultiviert werden können, wie beispielsweise *B. hydrogenotrophica* und *S. ovata*, beschrieben, dass die Zugabe von Hefeextrakt zu einer Stimulation des Wachstums führt (Bernalier et al. 1996; Möller et al. 1984).

### 3.2.2 Vitamine

Neben Spurenelementen spielen auch Vitamine eine entscheidende Rolle bei der autotrophen Kultivierung von acetogenen Mikroorganismen. So ist Pantothenensäure beispielsweise ein Bestandteil von Coenzym A (Brass 1994), welches ein wichtiges Ausgangssubstrat für die Herstellung von Acetyl-CoA im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg darstellt (vergleiche Kapitel 3.1.2). Cyanocobalamin oder auch Vitamin  $B_{12}$  wiederum ist essentiell für die Cobalamin-abhängige Methyl-Transferase (Das et al. 2007), welche im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg die Übertragung

einer Methylgruppe auf das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein katalysiert. Ein weiteres wichtiges Vitamin ist die Folsäure. Ihre biologisch aktive Form ist Tetrahydrofolsäure, die wiederum als wichtiges Coenzym im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg dient.

Für einige acetogene Mikroorganismen wurden bereits verschiedene Vitamine als essentiell bestimmt. *Moorella thermoacetica* und *Moorella thermoautotrophica* beispielsweise benötigen Nicotinsäure (Lundie und Drake 1984)(Savage und Drake 1986), während *A. woodii* und *B. methylotrophicum* auf Pantothersäure angewiesen sind (Balch et al. 1977; Moench und Zeikus 1983). Für das Wachstum von *Treponema primitia* hingegen muss Folsäure im Medium vorhanden sein (Graber und Breznak 2004). *E. limosum* benötigt neben Biotin zusätzlich Pantothersäure und Liponsäure als essentielle Medienbestandteile (Genthner et al. 1981).

### 3.2.3 Spurenelemente

Acetogene Bakterien produzieren Acetyl-CoA als Vorläufer für Biomasse und Produkte. Das Zellwachstum und die Produktbildung können somit durch die Erhöhung des Kohlenstoffflusses durch den Acetyl-CoA Stoffwechselweg erhöht werden. Um dies zu erreichen muss die Aktivität der Metalloenzyme, welche am Acetyl-CoA Stoffwechselweg beteiligt sind, erhöht werden. Zu den Metalloenzymen, Enzyme mit einem Metallion als Cofaktor, gehören unter anderen die bifunktionelle CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase, die Formiatdehydrogenase, die Hydrogenase, sowie die Alkoholdehydrogenase (Ragsdale und Pierce 2008). Die im Medium enthaltenen Spurenelemente können die Aktivität dieser Enzyme beträchtlich beeinflussen und so das Wachstum und die Produktbildung verbessern. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Erhöhung von Metallionen wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{SeO}_4^-$ ,  $\text{WO}_4^-$  und  $\text{Fe}^{2+}$ , sowie die Eliminierung von  $\text{Cu}^{2+}$  im Fermentationsmedium zu einem erhöhten Wachstum und einer verbesserten Ethanol- und Acetatproduktion in *C. ragsdalei* führten (Saxena und Tanner 2011).

Nickel ist ein wichtiger Cofaktor für beispielsweise die CO-Dehydrogenase, die Acetyl-CoA-Synthetase und Hydrogenasen (Ragsdale 2009). Saxena und Tanner (2011) zeigten, dass eine Erhöhung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentration im Medium zu einer gesteigerten Aktivität der CO-Dehydrogenase führt. Die Optimierung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentration kann zudem die CO-Aufnahme und Ethanolproduktion steigern (Simpson et al. 2010). Wolfram und Selen werden unter anderem als Cofaktoren in der Formiatdehydrogenase verwendet (Ragsdale und Wood 2008). Eine optimale Konzentration an  $\text{SeO}_4^-$  und  $\text{WO}_4^-$  führte in *C. ragsdalei* zu einer erhöhten Aktivität eben dieses Enzyms (Saxena und Tanner 2011). Viele Enzyme des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs, wie beispielsweise die Formiatdehydrogenase, die Methylentetrahydrofolat-Reduktase, die Hydrogenase und die bifunktionelle CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase enthalten ein Eisen-Schwefel-Cluster (Ragsdale und Pierce 2008), weswegen

Eisen und auch Schwefel eine wichtige Rolle im autotrophen Stoffwechsel von acetogenen Bakterien spielen. So konnte Demler (2012) durch eine Erhöhung der Konzentration an Eisensulfat im Medium eine Steigerung der autotrophen Acetatproduktion bei *A. woodii* erzielen. Kobalt ist an der Übertragung der Methylgruppe auf das Eisen-Schwefel-Protein beteiligt, wohingegen Nickel als Teil der CO-Dehydrogenase identifiziert werden konnte (Ragsdale und Wood 2008). Kupfer konnte bis jetzt in keinem Enzym des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs nachgewiesen werden. Es wurden jedoch gezeigt, dass  $\text{Cu}^{2+}$  einen negativen Effekt auf die Ethanolbildung in *C. ragsdalei* hat (Saxena und Tanner 2011).

### 3.2.4 Reduktionsmittel

Mikroorganismen, die nicht in der Lage sind in einer Umgebung mit hohem Redoxpotential zu wachsen, werden als obligat anaerobe Bakterien bezeichnet. Das Redoxpotential, oder auch Oxidations-/Reduktionspotential gibt die „Aktivität von Elektronen in einer Substanz oder Lösung“ an. In Fermentationsmedien wird das Redoxpotential durch Sauerstoff erhöht, was das Wachstum von obligat anaeroben Bakterien inhibiert. Eine Erniedrigung des Redoxpotentials des Kulturmediums ist somit essentiell für die Kultivierung von Acetogenen. Acetogene Bakterien sind zum Teil selbst in der Lage redoxaktive Verbindungen zu bilden und so Reste von Sauerstoff zu eliminieren und das Redoxpotential abzusenken (Boga und Brune 2003). Um das Redoxpotential jedoch auf einen optimalen Wert abzusenken und dort zu halten, müssen dem Fermentationsmedium zusätzlich Reduktionsmittel zugegeben werden. Gewöhnlich werden Natriumthioglycolat, Titan(III)-citrat, Kaliumhexacyanoferrat, Cystein-HCl oder Natriumsulfid hierfür eingesetzt (Mohammadi et al. 2011). Um ein optimales Redoxpotential im Medium zu gewährleisten ist der Einsatz einer optimalen Konzentration an Reduktionsmittel wichtig. Werden zu hohe Konzentrationen eingesetzt, kann es zu einer erniedrigten ATP Bildung und somit zu einem geringeren Wachstum kommen (Klasson et al. 1991). Der Einsatz einer optimalen Konzentration gestaltet sich jedoch besonders im Fall von Natriumsulfid schwierig, da dieses Molekül in wässrigen Medien zu Schwefelwasserstoff umgesetzt werden kann. Schwefelwasserstoff wiederum ist flüchtig und wird vor allem in kontinuierlich begasten Systemen aus dem Fermentationsmedium ausgetragen, was zu einer Änderung des Redoxpotentials im Fermentationsmedium führt (Hu et al. 2010). Da viele Enzyme des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, ist es von Vorteil schwefelhaltige Reduktionsmittel wie beispielsweise Cystein-HCl zu verwenden, da diese zusätzlich auch als Schwefelquelle dienen können (Fuchs et al. 2007). Des Weiteren kann der Einsatz von Reduktionsmittel bei der Kultivierung von acetogenen Bakterien durch die gesteigerte Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten für die NADH Bildung zur Verschiebung des Kohlenstoff- und Elektronenflusses hin zu Solventogenese führen (Girbal 1995).

### 3.3 Prozesstechnische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des mikrobiellen Wachstums anhand der mathematischen Beschreibung von mikrobiellen Prozessen unter kontrollierten Bedingungen aufgezeigt. Grundsätzlich kann die Kultivierung von Mikroorganismen in drei Betriebsweisen, die Satz-, die Zulauf- und die kontinuierliche Kultivierung unterteilt werden, wobei die allgemeine Stoffbilanzgleichung für den idealen Rührkesselreaktor durch Gleichung 3.14 beschrieben wird (Chmiel 2011).

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V_R \quad (3.14)$$

$V_R$	Volumen des Reaktors, L
$c_i$	Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L <sup>-1</sup>
$F_{\text{ein}}$	Zulaufstrom, L h <sup>-1</sup>
$c_{i,\text{ein}}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L <sup>-1</sup>
$F_{\text{aus}}$	Ablaufstrom, L h <sup>-1</sup>
$c_{i,\text{aus}}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L <sup>-1</sup>
$r_i$	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

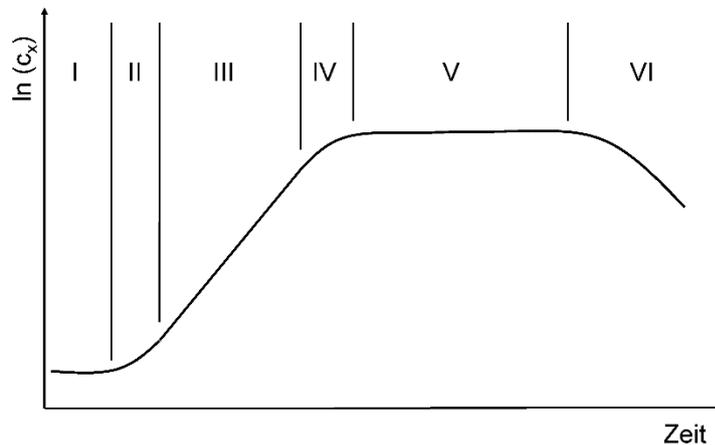
Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich Satzkultivierungen durchgeführt. Beim Satzverfahren handelt es sich, im Bezug auf die Flüssigkeit um ein abgeschlossenes System. Alle benötigten Nährstoffe sind bereits zu Beginn des Prozesses im Nährmedium vorgelegt. Da während des Betriebs kein frisches Medium zugeführt wird, kann das Reaktionsvolumen als konstant betrachtet werden, wodurch die allgemeine Stoffbilanzgleichung zu Gleichung 3.15 vereinfacht werden kann.

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.15)$$

Die Zugabe von geringen Mengen an Titrations- oder Antischaummittel wird dabei als vernachlässigbar angesehen. Neben den von Beginn an vorliegenden Medienkomponenten werden die Bakterien während der Satzkultivierung kontinuierlich mit gasförmigen Substraten wie beispielsweise Sauerstoff oder auch Synthesegas (H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub>) versorgt.

### 3.3.1 Mikrobielles Wachstum

Das Wachstum von Mikroorganismen unter unlimitierten, aber begrenzten Nährstoffbedingungen im Satzverfahren ergibt bei einer halblogarithmischen Auftragung der Zellzahl über die Prozesszeit die in Abbildung 3.13 dargestellten Wachstumsphasen (Monod 1949).



**Abbildung 3.13:** Typischer Wachstumsverlauf im Satzbetrieb: (I) Verzögerungsphase, (II) Übergangsphase, (III) exponentielle Wachstumsphase, (IV) Limitierungsphase, (V) stationäre Phase und (VI) Absterbephase.

Nach dem Überführen der Bakterienzellen kommt es zunächst zur Verzögerungsphase in der eine Adaption an die eingestellten Reaktionsbedingungen erfolgt. Anschließend kommt es in der Übergangsphase zu einem ersten Wachstum und einem Ansteigen der Wachstumsrate. In der exponentiellen Wachstumsphase wird schließlich die maximal mögliche spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) erreicht und so lange aufrechterhalten, bis eine Limitierung durch ein oder mehrere Medienbestandteile auftritt und die Wachstumsrate wieder abnimmt (Limitierungsphase). In der nachfolgenden stationären Phase stehen Wachstums- und Absterberate im Gleichgewicht. Wenn schließlich das Absterben der Bakterien überwiegt beginnt die letzte Phase, die Absterbephase.

### 3.3.2 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Für die kinetische Beschreibung von Wachstum und Produktbildung geht man meist von einem unstrukturierten und unsegregierten Zustand aus, was bedeutet, dass keine Substrukturen im zellulären System und keine Subpopulationen in der Zellpopulation existieren. Diese Betrachtungsweise erlaubt eine einfache Definition verschiedener wichtiger Parameter (Chmiel 2011).

Einer der wichtigsten Parameter ist die Wachstumsrate, welche die Veränderung der Biomassekonzentration über die Zeit wiedergibt und unter nicht-limitierenden Bedingungen proportional zur vorliegenden Biomasse ist. Die Wachstumsrate kann mit Gleichung 3.16 beschrieben werden.

$$r_x = \frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \quad (3.16)$$

$r_x$	Wachstumsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$c_x$	Biomassekonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$t$	Zeit, h
$\mu$	spezifische Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$

Somit ist die spezifische Wachstumsrate gemäß Gleichung 3.17 definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (3.17)$$

In definiertem Medium stellt die limitierende Komponente für das Wachstum in der Regel die Kohlenstoffquelle dar. In der von Monod (1949) beschriebenen Sättigungskinetik (siehe Gleichung 3.18) wird ein formaler Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate und dem wachstumslimitierenden Substrat hergestellt.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.18)$$

$\mu_{\max}$	maximale spezifische Wachstumsrate, $\text{h}^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$K_S$	Halbsättigungskonstante des limitierenden Substrats, $\text{g L}^{-1}$

Die maximale spezifische Wachstumsrate ist dabei eine theoretische Größe, die lediglich bei einem sehr großen Substratüberschuss erreicht wird. Die Halbsättigungskonstante definiert die Substratkonzentration, bei der die spezifische Wachstumsrate die Hälfte des maximal erreichbaren Wertes beträgt.

Entsprechend der Wachstumsrate können auch die Produktbildungsraten, sowie die Substrataufnahmeraten definiert werden (siehe Gleichung 3.19 und 3.20).

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = q_S \cdot c_x \quad (3.19)$$

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = q_P \cdot c_x \quad (3.20)$$

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

Zur Beschreibung von Ausbeutekoeffizienten werden die in Beziehung zu stellenden Raten ins Verhältnis gesetzt. Im Beispiel des substratbezogenen Biomasseausbeutekoeffizienten wird die Biomasse mit der Substratkonzentration in Beziehung gesetzt (siehe Gleichung 3.21).

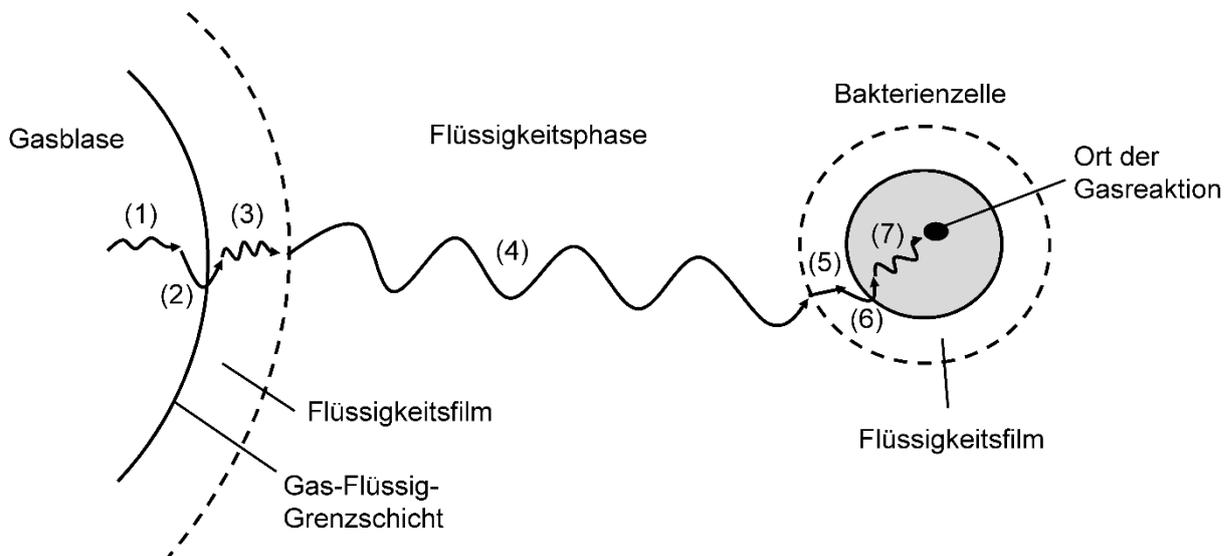
$$Y_{X/S} = \frac{dc_x}{dc_S} \quad (3.21)$$

$Y_{X/S}$	substratbezogener Biomasseausbeutekoeffizient, $\text{g g}^{-1}$
-----------	--

### 3.4 Gas-Flüssig-Stofftransport im Rührkesselreaktor

Der Massentransfer zwischen der Gas- und der Flüssigphase ist typischerweise einer der limitierenden Faktoren in der Gasfermentation. Für die Gasfermentation trifft dies mehr zu als für aerobe Prozesse, da die Löslichkeit von  $\text{CO}$  und  $\text{H}_2$  nur lediglich 60 % bzw. 4 % (bezogen auf die Masse) der Löslichkeit von Sauerstoff beträgt (Bredwell et al. 1999). Diese Limitierung der gasförmigen Substrate resultiert in einer niedrigen Substrataufnahmerate und somit in einer geringen Produktivität. Die Massentransferlimitierung kann dabei von verschiedenen, nachfolgend beschriebenen und in Abbildung 3.14 dargestellten Schritten verursacht werden: Zunächst erfolgt der Transport des gasförmigen Substrats vom Inneren der Gasblase in die Gas-Flüssig-Grenzschicht und von da aus weiter in das wässrige Fermentationsmedium. Nach der Diffusion durch das Fermentationsmedium hin zur Bakterienzelle erfolgt die Diffusion des

gasförmigen Substrats durch den Flüssigkeitsfilm der die Bakterienzelle umgibt. Anschließend muss die Grenzfläche zwischen Flüssigkeitsphase und Bakterienzelle durchdrungen werden bevor das gasförmige Substrat in den intrazellulären Reaktionsraum gelangt.



**Abbildung 3.14:** Transfer von Gasmolekülen aus der Gasblase durch die Flüssigkeit zur Bakterienzelle: (1) Transfer vom Kern der Gasblase zur Gas-Flüssig-Grenzschicht; (2) Transport über die Gas-Flüssig-Grenzschicht; (3) Diffusion durch den laminaren Flüssigkeitsfilm um die Gasblase; (4) konvektiver Transport durch die Flüssigkeit; (5) Diffusion durch den laminaren Flüssigkeitsfilm um die Bakterienzelle; (6) Diffusion über die Zellmembran; (7) Intrazellulärer Transport zum Ort der Gasreaktion (abgeändert nach Doran 2007).

Für schwer lösliche Gase, wie  $H_2$ ,  $CO$  und  $CO_2$  ist der Hauptgrund für die Massentransferlimitierung und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der Transport über die Gas-Flüssig-Grenzschicht (Munasinghe und Khanal 2010). Der Stofftransport an Grenzschichten kann im Wesentlichen anhand von drei Modellen beschrieben werden. Das Penetrationsmodell, die Theorie der Oberflächenerneuerung und das Zweifilmmodell (Chmiel 2011), wobei letzteres am häufigsten verwendet wird und deshalb nachfolgend näher beschrieben werden soll.

Bei der Zweifilmtheorie geht man davon aus, dass sich sowohl auf der Gasseite als auch auf der Flüssigseite der Grenzschicht ein laminarer Film ausbildet, durch den der Stofftransport per Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgt. Im Kern der Gasblase bzw. der Flüssigphase hingegen liegt eine turbulente Strömung vor, durch die ein konvektiver Stofftransport erfolgt. Das gasförmige Substrat diffundiert solange aus der Gas- in die Flüssigphase bis die Gelöstgaskonzentration in der Flüssigphase ihre Sättigungskonzentration

erreicht hat, wobei der Diffusionsstrom (Gaseintragsrate) proportional zum treibenden Konzentrationsgefälle und der Phasengrenzfläche ist (Gleichung 3.22).

$$\text{GTR} = k_L \frac{A_g}{V} \cdot (c_g^* - c_g) \quad (3.22)$$

GTR	Gaseintragsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$k_L$	Stoffübergangskoeffizient, $\text{m h}^{-1}$
$A_g$	Phasengrenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit, $\text{m}^2$
$V$	Flüssigkeitsvolumen im Reaktor, $\text{m}^3$
$c_g^*$	Sättigungskonzentration in der Flüssigphase, $\text{g L}^{-1}$
$c_g$	Gelöstgaskonzentration in der Kernströmung der Flüssigphase, $\text{g L}^{-1}$

Der Quotient der Phasengrenzfläche und des Flüssigkeitsvolumens im Reaktor gibt dabei die spezifische Gasaustauschfläche an. Im Rührkesselreaktor ist die Bestimmung des Stoffübergangskoeffizienten und der spezifischen Gasaustauschfläche nicht getrennt möglich, weshalb beide zum volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten  $k_L a$  zusammengefasst werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Gase  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{CO}$  können die Transferraten analog berechnet werden (Gleichung 3.23, 3.24, 3.25)

Wasserstoffeintragsrate (HTR):

$$\text{HTR} = k_L a \cdot (c_{\text{H}_2}^* - c_{\text{H}_2}) \quad (3.23)$$

Kohlenstoffdioxideintragsrate (CTR):

$$\text{CTR} = k_L a \cdot (c_{\text{CO}_2}^* - c_{\text{CO}_2}) \quad (3.24)$$

Kohlenstoffmonoxideintragsrate (COTR):

$$\text{COTR} = k_L a \cdot (c_{\text{CO}}^* - c_{\text{CO}}) \quad (3.25)$$

Durch die direkte Proportionalität der spezifischen Gasaustauschfläche zur Gaseintragsrate, sind die Anzahl der Gasblasen und deren Durchmesser wichtige Einflussfaktoren auf den Gas-Flüssig-Stofftransport. Je mehr und je kleiner die Gasblasen, umso größer ist die Gasaustauschfläche, wobei die Gasblasen sehr stark vom Leistungseintrag und zu einem

geringen Teil auch von der Leerrohrgeschwindigkeit der Gasphase beeinflusst werden (Hass und Pörtner 2011). Ein hoher Leistungseintrag, der durch hohe Rührerdrehzahlen erreicht werden kann, führt zu einer feinen Dispersion des Gases im Reaktor. Neben der großen Gasaustauschfläche haben kleine Gasblasen zusätzlich den Vorteil einer niedrigen Aufstiegsgeschwindigkeit, was zu einer längeren Verweilzeit der Gasblasen in der Flüssigkeit und somit zu einem größeren Gasvolumen im Reaktor führt (Doran 2007).

## 4 Material und Methoden

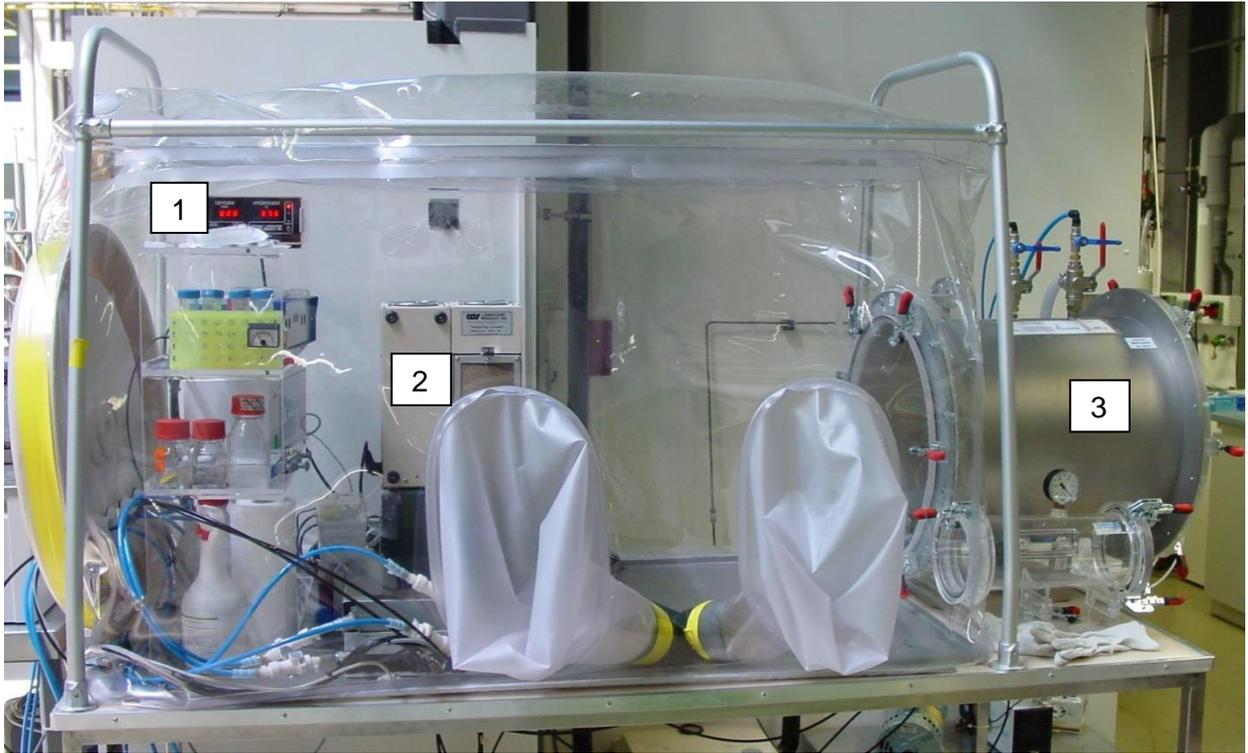
Im diesem Kapitel werden alle im Rahmen dieser Arbeiten verwendeten Methoden vorgestellt. Eine genaue Auflistung der verwendeten Materialien befindet sich im Anhang (Kapitel 11).

### 4.1 Bakterienstämme

Die acetogenen Mikroorganismen *A. fimetarium* (DSM 8238), *A. wieringae* (DSM 1911), *A. woodii* (DSM 1030), *B. hydrogenotrophica* (DSM 10507), *C. magnum* (DSM 2767), *E. aggregans* (DSM 12183), *S. acidovorans* (DSM 3132), *S. ovata* (DSM 2662) und *T. mayombeii* (DSM 6539) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

### 4.2 Anaerobes Arbeiten

Acetogene Bakterien gehören zu den strikt anaeroben Mikroorganismen, weshalb bei ihrer Verwendung spezielle anaerobe Arbeitsweisen eingehalten werden müssen, die von Hungate (1969) entwickelt wurden. Das offene Arbeiten unter einer sauerstoffarmen Atmosphäre erfolgte in einer Anaerobwerkbank (Abbildung 4.1) aus einer Polyvinylchlorid-Folie (Toepffer Laborsysteme GmbH, Göppingen). Die Anaerobkammer war mit einem Gemisch aus  $\geq 95\%$  Stickstoff und  $\leq 5\%$  Wasserstoff befüllt, dem sogenannten Formiergas. Durch das ständige umwälzen der Gasatmosphäre, konnten Reste von Sauerstoff an den Palladium-Katalysatoren mit Wasserstoff zu Wasser abreagieren, welches wiederum in Trockenmittel gebunden wurde, um so die Luftfeuchte in der Werkbank gering zu halten. Die vorhandenen Konzentrationen an  $O_2$  und  $H_2$  wurden stetig durch ein Gasmessgerät im ppm-Bereich gemessen. Das Entfernen von Keimen erfolgte durch eine HEPA-Filtereinheit (Speers et al. 2009). Geräte, Medien und Bakterienkulturen konnten durch zwei Rundschleusen in die Anaerobwerkbank eingebracht werden. Während des hierfür nötigen Schleusvorgangs wurden die Schleusen evakuiert und anschließend mit Formiergas befüllt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.



**Abbildung 4.1:** Anaerobwerkbank. (1) Gas-Analyzer. (2) Gebläse mit integriertem Palladium-Katalysator/HEPA-Filtereinheit. (3) Große und kleine Rundschleuse.

### 4.3 Kultivierungsmedien: Zusammensetzung und Herstellung

Die verwendeten acetogenen Mikroorganismen wurden, wenn nicht anders angegeben, im sogenannten General-acetogen Medium (GA-Medium) kultiviert. Zusätzlich erfolgte teilweise eine Kultivierung in dem von der DSMZ empfohlenen Medium.

#### GA-Medium

Die Zusammensetzung des GA-Medium ist in Tabelle 4.1 angegeben. Um das Medium zu anaerobisieren wurden die Bestandteile, wenn nicht anders angegeben, in voll entsalztem Wasser gelöst und für 20 min gekocht. Während des Abkühlens in einem Eiswasserbad wurde das Medium kontinuierlich mit 20% CO<sub>2</sub> und 80% N<sub>2</sub> begast. Die weitere Zugabe von Medienbestandteilen bzw. die Aufteilung des Mediums auf verschiedene Kulturgefäße erfolgten ausschließlich unter der Anaerobwerkbank. Nach dem Autoklavieren (121 °C; 20 min) war das Medium bereit für die Verwendung.

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzung des GA-Medium

Komponente	Konzentration	Einheit	Kommentar
NH <sub>4</sub> Cl	1	g L <sup>-1</sup>	
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,5	g L <sup>-1</sup>	
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,004	g L <sup>-1</sup>	
NaCl	2,25	g L <sup>-1</sup>	
Hefeextrakt	2	g L <sup>-1</sup>	
Selenit-Wolframat-Lsg.	1	ml L <sup>-1</sup>	Zusammensetzung siehe Anhang
Vitaminlösung	20	ml L <sup>-1</sup>	Zusammensetzung siehe Anhang
Spurenelementlösung	2	ml L <sup>-1</sup>	Zusammensetzung siehe Anhang
NaHCO <sub>3</sub>	4	g L <sup>-1</sup>	Zugabe nach dem Kochen
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,15	g L <sup>-1</sup>	Zugabe nach dem Autoklavieren
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,35	g L <sup>-1</sup>	Zugabe nach dem Autoklavieren
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,23	g L <sup>-1</sup>	Zugabe nach dem Autoklavieren
Cys-HCl	0,4	g L <sup>-1</sup>	Zugabe nach dem Autoklavieren

### DSMZ-Medium

Von der DSMZ wurden folgende Medien empfohlen: Medium 614 für *A. fimetarium*, Medium 135 für *A. wieringae*, Medium 135 für *A. woodii*, Medium 104 für *B. hydrogenotrophica*, Medium 104b für *C. magnum*, Medium 711a für *E. aggregans*, Medium 311 für *S. acidovorans*, Medium 311 für *S. ovata* und Medium 515 für *T. mayombeii*. Alle Medien wurden nach den vorgegebenen Rezepten hergestellt, welche unter [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de) abgerufen werden können. Einzige Ausnahme waren heterotrophe Kohlenstoffquellen und Resazurin. Diese Bestandteile wurden den Medien nicht zugegeben. Um die Sterilität der Medien zu gewährleisten, erfolgte stets ein Autoklavierzyklus (121 °C; 20 min).

## 4.4 Kultivierung acetogener Bakterien

In diesem Kapitel werden die verschiedenen verwendeten Kultivierungsarten der acetogenen Bakterien näher beschrieben.

### 4.4.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung aller Bakterien, außer von *C. magnum*, erfolgte in Kryokulturen. Hierfür wurden die Mikroorganismen in der exponentiellen Wachstumsphase einer heterotrophen Kultivierung in GA-Medium mit zusätzlich 2 g L<sup>-1</sup> Pepton aus Casein in Hungate-Kulturröhrchen überführt und nach der Zugabe eines Frostschutzmittels (Endkonzentration: 10%) bei -80°C eingefroren. Für die einzelnen Bakterienstämme wurden dabei folgende Frostschutzmittel verwendet: *A. fimetarium* (Saccharose), *A. wieringae* (Saccharose), *A. woodii* (Saccharose), *B. hydrogenotrophica* (Saccharose), *E. aggregans* (Saccharose), *S. acidovorans* (Glycerin), *S. ovata* (Saccharose) und *T. mayombeii* (Glycerin).

*C. magnum* wurde als Lebendkultur bei 30°C in GA-Medium mit zusätzlich 2 g L<sup>-1</sup> Pepton aus Casein gehalten, da dieses Bakterium durch die Kryokonservierung die Fähigkeit zum autotrophen Metabolismus verliert. Die Stammhaltung erfolgte alle 5-6 Tage durch Überimpfen in frisches Medium.

### 4.4.2 Vorkulturherstellung

Die Vorkulturherstellung von *A. fimetarium*, *A. wieringae*, *A. woodii*, *B. hydrogenotrophica*, *E. aggregans*, *S. acidovorans*, *S. ovata* und *T. mayombeii* erfolgte ausgehend von einer Kryokultur, die von *C. magnum* ausgehend von einer Lebendkultur. Für alle Mikroorganismen wurde eine 2-stufige heterotrophe Vorkulturherstellung in GA-Medium mit zusätzlich 2 g L<sup>-1</sup> Pepton aus Casein in Anaerobflaschen durchgeführt, wobei die in Tabelle 4.2 angegebenen Substrate und Temperaturen verwendet wurden. Vor der Kultivierung wurde der pH des GA-Medium mit 5 M NaOH oder 10% Schwefelsäure auf den gewünschten pH eingestellt (Tabelle 4.2).

Zunächst wurden 1 - 5 mL der Kryo- bzw. Lebendkultur in 50 oder 200 mL Medium überimpft. In der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden 10 – 25 mL dieser Zellsuspension in mindestens 2 x 500 mL Medium überführt und erneut bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert.

**Tabelle 4.2:** Heterotrophe Kohlenstoffquellen, Temperaturen und pH, die bei der Vorkulturherstellung verwendet wurden.

Stamm	Heterotrophe Kohlenstoffquelle	Temperatur	pH
<i>A. fimetarium</i>	Fructose, 10 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,5
<i>A. wieringae</i>	Fructose, 10 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,4
<i>A. woodii</i>	Fructose, 10 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,0
<i>B. hydrogenotrophica</i>	Fructose, 5 g L <sup>-1</sup>	37 °C	7,0
<i>C. magnum</i>	Glucose, 5 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,0
<i>E. aggregans</i>	Fructose, 10 g L <sup>-1</sup>	37 °C	7,2
<i>S. acidovorans</i>	Fructose, 5 g L <sup>-1</sup>	37 °C	7,0
<i>S. ovata</i>	Betain, 5 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,0
<i>T. mayombeii</i>	Fructose, 5 g L <sup>-1</sup>	30 °C	7,0

Für die Inokulation von autotrophen Versuchen wurden die Bakterien nachfolgend in Zentrifugenbecher überführt und für 20 min bei 4500 rpm und 25 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der gesamte Überstand verworfen und das Zellpellet in dem gewünschten Volumen an PBS-Puffer (Anaerobflaschen) oder GA-Medium (Laborrührkesselreaktor) resuspendiert. Die Inokulation der jeweiligen Kulturgefäße erfolgte durch die Zugabe der Zellsuspension mittels einer sterilen Einwegspritze.

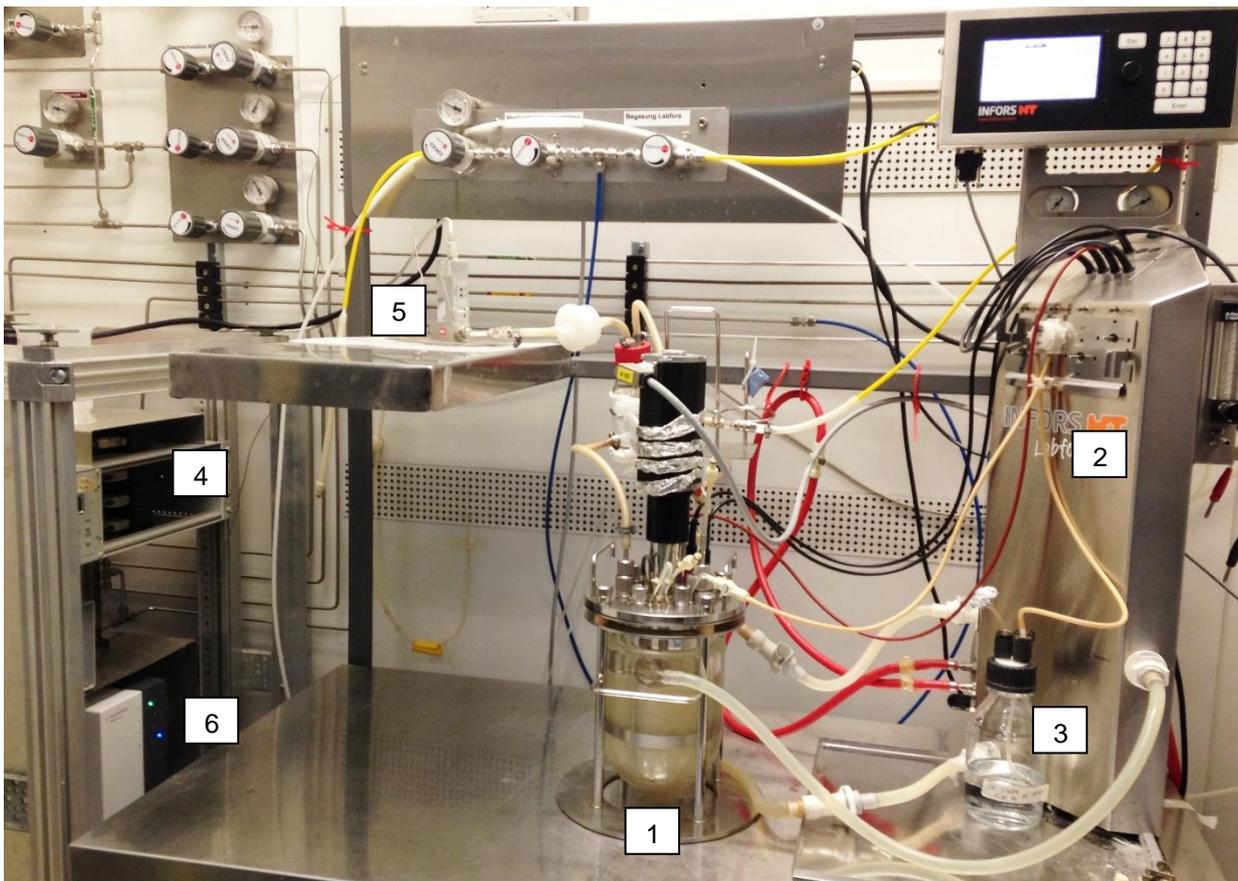
#### 4.4.3 Autotrophe Satzkultivierung in Anaerobflaschen

Für diese Kultivierungsmethode wurden beschichtete 500 mL Schottflaschen verwendet, welche mit einem Butylstopfen (Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel, Bovenden) und einer Lochkappe verschlossen wurden. Das Füllvolumen der Anaerobflaschen betrug 100 ml. Der Kopfraum der Flaschen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit einer Mischung aus 33,4 % CO<sub>2</sub> und 66,6 % H<sub>2</sub> begast und mit 1 bar Überdruck beaufschlagt. Die Begasung erfolgte dabei nach dem Autoklavieren über eine Kanüle durch den Butylstopfen. Um eine möglichst reine Gasatmosphäre in den Anaerobflaschen zu gewährleisten, erfolgte ein dreimaliges Beaufschlagen und erneutes Ablassen von 1 bar Überdruck im Kopfraum. Letztlich wurde der gewünschte Kultivierungsdruck von 1 bar eingestellt. Zur Einstellung des Gas-Flüssig-Gleichgewichts wurden die begasten Anaerobflaschen über Nacht bei der jeweiligen Kultivierungstemperatur und einer Schüttelfrequenz von 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde der pH mit 5 M NaOH oder 10% Schwefelsäure auf den gewünschten pH titriert, wobei dieser von den einzelnen Bakterienstämmen abhängig war (Tabelle 4.2). Alle Versuche wurden in

einem Dreifachansatz durchgeführt und mit einer Biotrockenmasse von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei den, in Tabelle 4.2 angegebenen Temperaturen und einer Schüttelfrequenz von 100 rpm. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben genommen und der Gasdruck im Kopfraum mittels eines Manometers bestimmt.

#### **4.4.4 Autotrophe Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor**

Für die autotrophe Kultivierung mit kontinuierlicher Begasung und Abgasanalytik wurde der, in Abbildung 4.2 dargestellte Versuchsaufbau verwendet. Der Laborrührkesselreaktor (INFORS HT, Bottmingen, Schweiz) hatte ein Nominalvolumen von 2 L und ein Füllvolumen von 1 L. Um eine optimale Durchmischung und Gasdispergierung zu erreichen, wurden drei Strömungsbrechern und zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern eingesetzt. Zudem war der Rührkesselreaktor mit einer Temperatur und einer pH-Sonde ausgestattet. Über die Software IRIS konnten die Parameter ausgelesen und gegebenenfalls geregelt werden. Die Begasung des Reaktors erfolgte über die Gasmischtation WMR 4000 (Westphal Mess- und Regeltechnik, Ottobrunn) und ein Begasungsrohr. Der Austritt des Abgases aus dem Reaktor erfolgte durch einen auf  $9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  temperierten Kondensator um eine Verdunstung des Reaktionsmediums so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde der Abgasvolumenstrom über einen Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) gemessen und die Zusammensetzung mittels eines Mikro-Gaschromatographen (CP-4900, Varian, Darmstadt) analysiert. Dieses Vorgehen ermöglichte die Ermittlung der Verbrauchsdaten von  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}$  durch die Mikroorganismen (siehe Kapitel 4.5.5).



**Abbildung 4.2:** Rührkesselreaktor für die Gasfermentation verschiedener acetogener Mikroorganismen. (1) Rührkesselreaktor; (2) Steuereinheit; (3) Titrationsmittel; (4) Gasmischstation; (5) Massendurchflussmesser; (6) Mikro-Gaschromatograph.

### Kultivierungsbedingungen

Um sauerstofffreie Bedingungen zu gewährleisten und zur Ausbildung des Gas-Flüssig-Gleichgewichts der gasförmigen Substrate, wurden das Reaktionsmedium und der Reaktor nach dem Autoklavieren (121 °C; 20 min) für mindestens 12 h mit dem Versuchsgasgemisch (siehe unten) begast. Vor dem Start jeder Gasfermentation wurden dem Reaktionsmedium 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  Antischaummittel (Polypropylenglycol) zugegeben, um so eine Schaumbildung zu unterdrücken. Die Inokulation erfolgte für alle Versuche mit einer Biotrockenmassekonzentration von 0,2  $\text{g L}^{-1}$ . Temperatur und pH wurden für jeden Bakterienstamm auf die in Tabelle 4.2 (Kapitel 4.4.2) angegebenen Werte geregelt, wobei 3 M Natronlauge als Titrationsmittel diente. Die Begasung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit einer Mischung aus 20 %  $\text{CO}_2$  und 80 %  $\text{H}_2$  und einem Volumenstrom von 5  $\text{L h}^{-1}$ . Der Rührer wurde 2-phasig betrieben. Anfänglich wurde eine Rührerdrehzahl von 200 rpm ( $0,05 \text{ W L}^{-1}$ ) eingestellt, um den Bakterien eine Adaption an die autotrophen Bedingungen ohne den potentiell negativen Einfluss von hohen Scherkräften zu ermöglichen. Hatte die Konzentration an produzierten Säuren (Essigsäure, Ameisensäure) im

Rührkesselreaktor den Grenzwert von  $1 \text{ g L}^{-1}$  erreicht, wurden die Rührerdrehzahl automatisch auf 600 rpm erhöht. Um das zu ermöglichen, wurde der Basenpumpenwert ermittelt, der sich bei der Neutralisation von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Essigsäure unter Versuchsbedingungen ergab. Im IRIS-Steuerprogramm wurde anschließend eine Sequenz hinterlegt, welche die Erhöhung der Drehzahl bei dem ermittelten Basenpumpenwert initiierte. Die Erhöhung der Rührergeschwindigkeit diente zwei Aspekten: Zum einen wurde durch den erhöhten Leistungseintrag eine Gaslimitierung vermieden. Und zum anderen konnte durch die Drehzahlerhöhung während des Versuchs eine potentielle Scherkraftempfindlichkeit der einzelnen Bakterien identifiziert werden. Während des Versuchs wurde in regelmäßigen Abständen über eine sterile Einwegspritze Probe entnommen.

## 4.5 Analytische Methoden

### 4.5.1 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmassekonzentration

Die optische Dichte der Zellsuspension wurde mit Hilfe eines UV-Vis Einstrahlphotometers (Genesys 10S, Thermo Scientific, Neuss) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die zu messende Suspension musste stets im linearen Bereich des Photometers liegen ( $\text{OD}_{600} \leq 0,3$ ), weshalb gegebenenfalls mit PBS verdünnt wurde.

Die Biotrockenmassekonzentration (BTM) verhält sich linear zur optischen Dichte und wurde anhand eines Korrelationsfaktors mittels Gleichung 4.1 aus dieser berechnet.

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

$c_x$	Biotrockenmassekonzentration, $\text{g L}^{-1}$
$f_x$	Korrelationsfaktor, $\text{g L}^{-1}$
OD	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm, -

Für die Bestimmung der Korrelationsfaktoren wurden heterotroph gewachsene Bakterienkulturen verwendet (siehe Kapitel 4.4.2). Die Bakterien wurden zu einer optischen Dichte von 10 aufkonzentriert (4500 rpm; 20 min) und aus der resultierende Zellsuspension eine 10-stufige Verdünnungsreihe mit PBS-Puffer hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden die optische Dichte und die BTM im Dreifachansatz ermittelt, wobei letztere gravimetrisch

bestimmt wurde. Hierfür wurden getrocknete und gewogene 2 mL-Reaktionsgefäße mit 2 mL der jeweiligen Verdünnungsstufe befüllt, bei 13000 rpm für 10 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 48 h bei 80°C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Reaktionsgefäße erneut gewogen und so das Gewicht des Zellpellets ermittelt. Aus der Auftragung der BTM über die optische Dichte ergaben sich folgende Korrelationsfaktoren: *A. fimetarium*,  $f_x = 0.40 \times \text{OD}$ ; *A. wieringae*,  $f_x = 0.67 \times \text{OD}$ ; *B. hydrogenotrophica*,  $f_x = 0.37 \times \text{OD}$ ; *C. magnum*,  $f_x = 0.48 \times \text{OD}$ ; *E. aggregans*,  $f_x = 0.39 \times \text{OD}$ ; *S. acidovorans*,  $f_x = 0.47 \times \text{OD}$ ; *S. ovata*,  $f_x = 0.52 \times \text{OD}$ ; *T. mayombeii*,  $f_x = 0.40 \times \text{OD}$ . Für *A. woodii* wurde der Korrelationsfaktor  $f_x = 0.50 \times \text{OD}$  von Demler und Weuster-Botz (2011) verwendet.

#### 4.5.2 HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Produkten

Die Quantifizierung der Produktkonzentrationen an Acetat, Acetoin, Butanol, Butyrat, 2,3-Butandiol, Ethanol, Lactat und Pyruvat erfolgte über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Zunächst wurde die zu untersuchende Zellsuspension steril filtriert (0,2 µm Spritzenfilter, Carl Roth, Karlsruhe), in Rollrandgefäße überführt und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Für die Analyse wurde das HPLC-System Finnigan Surveyor Plus (Thermo Fischer, Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Auftrennung erfolgte mittels der Aminex HPC-87H Säule (BioRad, München) bei einer Temperatur von 60°C und einer Flussrate der mobilen Phase von 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Als Vorsäule wurde die Micro-Guard Cation H Cartridge Säule (BioRad, München) verwendet. Als Laufmittel diente dabei 5 mM Schwefelsäure. Es wurden jeweils 10 µL der Probe injiziert und das Produktspektrum während einer Messzeit von 40 min im Brechungsindexdetektor bestimmt. Über einen externen Standard konnten aus den integrierten Peakflächen die Produktkonzentrationen berechnet werden.

#### 4.5.3 Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsraten

Für die Ermittlung der Wachstums- und Produktbildungsraten der autotrophen Kultivierungen im Rührkesselreaktor, wurden zunächst die offline gemessenen Daten der Biotrockenmasse- und der Produktkonzentrationen in den relevanten Prozess-Zeiträumen anhand einer sigmoidalen bzw. doppelt sigmoidalen Funktion interpoliert. Die resultierenden Interpolationen wurden verwendet, um Wachstums- und Produktbildungsraten anhand einer Differenzenapproximation 1. Ordnung zu berechnen (Gleichungen 4.2, 4.3, 4.4) Für alle Berechnungen wurde eine Abtastzeit von 5 min verwendet.

**Wachstumsrate**

$$\mu = \frac{1}{c_x^*} \cdot \frac{\Delta c_x}{\Delta t} \quad (4.2)$$

$\mu$	Wachstumsrate, d <sup>-1</sup>
$c_x$	Biotrockenmassekonzentration, g L <sup>-1</sup>
$c_x^*$	Mittelwert aus $c_{x,1}$ und $c_{x,2}$ , g L <sup>-1</sup>
$t$	Zeit, d

**Volumetrische Produktbildungsrate**

$$Q_p = \frac{\Delta c_p}{\Delta t} \quad (4.3)$$

$Q_p$	Volumetrische Produktbildungsrate, g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
$c_p$	Produktkonzentration, g L <sup>-1</sup>

**Zellspezifische Produktbildungsrate**

$$q_p = \frac{1}{c_x^*} \cdot \frac{\Delta c_p}{\Delta t} \quad (4.4)$$

$q_p$	Zellspezifische Produktbildungsrate, g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
-------	--

**4.5.4 Bestimmung der Ammoniumkonzentration**

Für die quantitative Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurde der Ammoniak UV-Test (Nr. 11112732035) von R-Biopharm (Darmstadt) verwendet. Die Messung der Ammoniumkonzentration erfolgte hierbei indirekt über den auftretenden NADH-Verbrauch, der photometrisch (340 nm) gemessen wurde. Der enzymatischen Nachweise wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die eingesetzten Volumina wurden jedoch für die Verwendung einer Mikrotiterplatte modifiziert. Vor der Analyse wurden die zu untersuchenden Proben zunächst zentrifugiert (3 min; 13000 rpm), steril filtriert (0,22 µm) und falls nötig mit VE-Wasser verdünnt.

#### 4.5.5 Bestimmung der Gasaufnahmeraten anhand der Abgasanalytik

Für die Bestimmung der Gasaufnahmeraten wurde eine Abgasanalytik bestehend aus einem Massendurchflussmesser (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) und einer Mikro-Gaschromatographieeinheit (CP-4900, Varian, Darmstadt) verwendet. Die genaue Methodik der  $\mu$ -GC kann im Anhang in Kapitel 11.2 eingesehen werden.

Da der Massendurchflussmesser (MFM) auf Stickstoff kalibriert war, das Abgas jedoch aus einer Mischung aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff beziehungsweise teilweise auch aus Kohlenstoffmonoxid bestand, musste der angezeigte Volumenstrom zunächst in den tatsächlichen Volumenstrom umgerechnet werden. Die Umrechnung erfolgte anhand des Mischgaskonversionsfaktors und Gleichung 4.5.

$$V_{\text{Abgas}} = V_{\text{MFM}} \cdot \text{MGK} \quad (4.5)$$

$V_{\text{Abgas}}$	tatsächlicher Abgas-Volumenstrom, L h <sup>-1</sup>
$V_{\text{MFM}}$	angezeigter Volumenstrom des MFM, L h <sup>-1</sup>
MGK	Mischgaskonversionsfaktor, -

Der Mischgaskonversionsfaktor (MGK) ist wiederum eine Funktion der Gaszusammensetzung und kann nach Gleichung 4.6 berechnet werden.

$$\text{MGK} = \frac{100}{\sum \frac{V_i}{G_{f,i}}} \quad (4.6)$$

$V_i$	Volumenanteil der Gaskomponente i, %
$G_{f,i}$	Gaskonversionsfaktor der Gaskomponente i, %

Der benötigten Gaskonversionsfaktor ( $G_f$ ) des jeweiligen Gases (Index i) wurde dabei empirisch bestimmt. Hierfür wurden verschiedene Volumenströme des gewünschten Gases eingestellt und die zugehörigen angezeigten Volumenströme des MFM ermittelt. Eine Korrelation der eingestellten und der angezeigten Volumenströme ergab den jeweiligen Gaskonversionsfaktor.

Der Volumenanteil der Gaskomponente ( $V_i$ ) wurde durch den  $\mu$ -Gaschromatographen ( $\mu$ GC) mittels einer externen Kalibration am Ende jeder Gasfermentation bestimmt. Für die Kalibration

wurde der Rührkesselreaktor mit verschiedenen Gaszusammensetzungen und einem Volumenstrom von  $15 \text{ L h}^{-1}$  für jeweils mindestens 45 Minuten begast. Während dieser Zeit wurde die Abgaszusammensetzung regelmäßig (alle 3 min) durch die  $\mu$ -GC analysiert. Eine Korrelation der erhaltenen Peakflächen und der eingestellten Gaszusammensetzungen ermöglichte anschließend die Berechnung der prozentualen Gaszusammensetzung der Abgasdaten, die während der Gasfermentation aufgenommen wurden.

Abschließend konnte durch die Multiplikation der prozentualen Abgasanteile mit dem tatsächlichen Abgasvolumenstrom zum gleichen Zeitpunkt der jeweilige Massenstrom der einzelnen Gaskomponenten im Abgas berechnet werden. Die Differenz der eingestellten und berechneten Massenströme ergab die Gasmenge, die zum jeweiligen Zeitpunkt von den Mikroorganismen aufgenommen wurde.

Für die Berechnung der integralen Kohlenstoffbilanzen wurden die Menge an Kohlenstoff, die in der gebildeten Biomasse sowie den Produkten fixiert wurde der Menge an aufgenommenem Kohlenstoff gegenüber gestellt, wobei diese über die aufgenommene Menge an Kohlenstoffdioxid beziehungsweise Kohlenstoffmonoxid berechnet wurde.

#### **4.6 Erstellen des phylogenetischen Stammbaums**

Ein phylogenetischer Stammbaum stellt die evolutionären Beziehungen verschiedener Spezies zueinander dar. Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte phylogenetische Stammbaum wurde auf Grundlage der 16s rRNA Sequenzen der verwendeten acetogenen Mikroorganismen erstellt. Die GenBank Zugangsnummer der 16s rRNA Sequenzen sind in Kapitel 11.4 aufgeführt. Sowohl für die multiple Sequenzalinierung, als auch für die Konstruktion des Stammbaums wurde das Programm MEGA 6.06 verwendet. Die multiple Sequenzalinierung wurde auf Grundlage des ClustalW-Algorithmus durchgeführt. Der phylogenetische Stammbaum wurde anhand des Maximum-Likelihood-Algorithmus konstruiert.

## 5 Reaktionstechnischer Vergleich verschiedener acetogener Mikroorganismen\*

In den letzten Jahren ist die Synthesegasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Doch trotz der vielen Fortschritte verhindern einige Faktoren, wie beispielsweise geringe Produkt- und Biomasseausbeuten sowie eine ineffiziente Verwertung der gasförmigen Substrate eine weitere kommerzielle Nutzung der Gasfermentation (Liew et al. 2013). Obwohl heute über 100 verschiedene Spezies von acetogenen Bakterien bekannt sind (Drake et al. 2008), wurde die autotrophe Kultivierung bis jetzt nur von einigen wenigen Spezies reaktionstechnisch charakterisiert. Die am besten untersuchten acetogenen Mikroorganismen gehören dabei den Gattungen *Clostridium* und *Acetobacterium* an (Daniell et al. 2012; Demler und Weuster-Botz 2011; Köpke et al. 2011b). Auf Grund dieser Problemstellung sollte im Rahmen dieser Arbeit die autotrophe Prozessleistung von acht, bislang noch wenig untersuchten acetogenen Bakterien in einem vollständig kontrollierten und kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor reaktionstechnisch untersucht und anschließend verglichen werden, um so acetogene Bakterienstämme zu identifizieren, die hohe Wachstums- und Produktbildungsraten beziehungsweise eine effiziente Synthesegasverwertung aufweisen.

### 5.1 Auswahl der Bakterienstämme

Voraussetzung für die Auswahl der Bakterienstämme war, dass die zu untersuchenden acht acetogenen Bakterienstämme die Vielfalt der acetogenen Mikroorganismen widerspiegeln und deshalb möglichst vielen verschiedenen Gattungen angehören sollten. Um diese Voraussetzung zu gewährleisten, wurde zunächst eine Literaturrecherche nach allen Acetogenen durchgeführt, die  $H_2$  und  $CO_2$  als Substrat nutzen können. Da die Fähigkeit zur Metabolisierung von CO für viele Acetogene noch nicht untersucht wurde, sollten die Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor für die Charakterisierung der Bakterien zunächst ausschließlich mit einer Mischung aus  $H_2$  und  $CO_2$  erfolgen. Acetogene, die lediglich CO, jedoch nicht  $H_2$  und  $CO_2$  verwerten können, wurden nicht berücksichtigt. Das Ergebnis der Literaturrecherche sind die in Tabelle 5.1 angegebenen acetogenen Mikroorganismen:

\* Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert in:

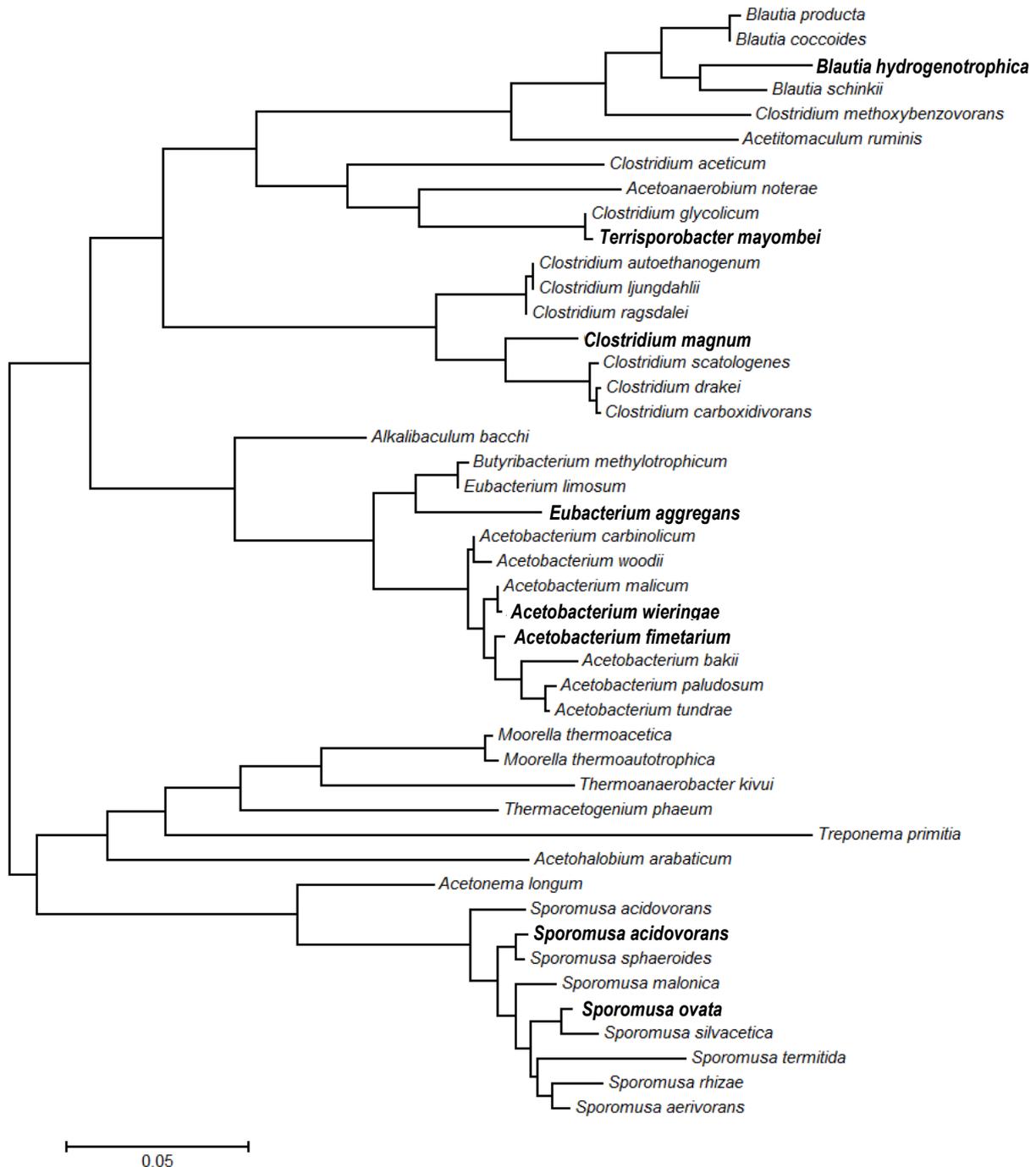
Groher und Weuster-Botz (2016b): General medium for the autotrophic cultivation of acetogens. *Bioproc Biosys. Eng*, DOI 10.1007/s00449-016-1634-5.

Groher und Weuster-Botz (2016a): Comparative reaction engineering analysis of different acetogenic bacteria for gas fermentation. *J. Biotechnol.* 228: 88-94

**Tabelle 5.1:** Angabe aller in der Literatur identifizierter acetogener Bakterien, die H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als alleinige Energie- und Kohlenstoffquellen nutzen können. Zusätzlich ist das jeweilige autotrophe Produktspektrum der Mikroorganismen angegeben.

Organismus	Substrate	Produkte	Literatur
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Greening und Leedle 1989
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Sleat et al. 1985
<i>Acetobacterium bakii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Kotsyurbenko et al. 1995
<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Eichler und Schink 1984
<i>Acetobacterium dehalogenans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Trauneker et al. 1991
<i>Acetobacterium fimetarium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Kotsyurbenko et al. 1995
<i>Acetobacterium malicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Tanaka und Pfennig 1988
<i>Acetobacterium paludosum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Kotsyurbenko et al. 1995
<i>Acetobacterium tundrae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Simankova et al. 2000
<i>Acetobacterium wieringae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Braun und Gottschalk 1982
<i>Acetobacterium woodii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Balch et al. 1977
<i>Acetohalobium arabaticum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Zhilina und Zavarzin 1990
<i>Acetonema longum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Butyrat	Kane und Breznak 1991
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol	Allen et al. 2010
<i>Blautia coccooides</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Kaneuchi et al. 1976
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Bernalier et al. 1996
<i>Blautia producta</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Geerligs et al. 1987
<i>Blautia schinkii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Rieu-Lesme et al. 1996
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol	Zeikus et al. 1980
<i>Clostridium aceticum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Adamse 1980
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	Abrini et al. 1994
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol	Liou et al. 2005
<i>Clostridium drakei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol	Gössner et al. 2008
<i>Clostridium glycolicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Küsel et al. 2001
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	Tanner et al. 1993
<i>Clostridium magnum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Schink 1984
<i>Clostridium methoxybenzovorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Mechichi et al. 1999
<i>Clostridium ragsdalei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	Huhnke et al. 2010
<i>Clostridium scatologenes</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Ethanol, Butyrat	Liou et al. 2005
<i>Eubacterium aggregans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Mechichi et al. 1998
<i>Eubacterium limosum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat, Butyrat	Genthner et al. 1981
<i>Moorella mulderi</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Balk et al. 2003
<i>Moorella thermoacetica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Kerby und Zeikus 1983
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO	Acetat	Wiegel et al. 1981
<i>Sporomusa acidovorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Ollivier et al. 1985
<i>Sporomusa aerivorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Boga 2003
<i>Sporomusa malonica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Dehning et al. 1989
<i>Sporomusa ovata</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Möller et al. 1984
<i>Sporomusa paucivorans</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Hermann et al. 1987
<i>Sporomusa rhizae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Gössner et al. 2006
<i>Sporomusa silvacetica</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Kuhner et al. 1997
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat, Ethanol	Möller et al. 1984
<i>Sporomusa termitida</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Breznak et al. 1988
<i>Thermoacetogenium phaeum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Hattori et al. 2000
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Leigh et al. 1981
<i>Treponema primitia</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Graber und Breznak 2004
<i>Terrisporobacter mayombeii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Acetat	Kane et al. 1991

Um die evolutionäre Beziehung und damit die Vielfältigkeit der recherchierten acetogenen Mikroorganismen darzustellen, wurde anschließend ein phylogenetischer Stammbaum auf Grundlage der 16s rRNA der Bakterien erstellt (vergleiche Abbildung 5.1). Da für die Bakterienstämme *A. dehalogenans* und *M. mulderi* keine 16s rRNA Sequenzen veröffentlicht sind, konnten diese Spezies nicht in den Stammbaum aufgenommen werden.



**Abbildung 5.1:** Evolutionäre Beziehung der autotroph auf  $H_2$  und  $CO_2$  kultivierbaren acetogenen Mikroorganismen. Der phylogenetische Stammbaum wurde auf Grundlage des Maximum-Likelihood-Algorithmus erstellt. Der vertikale Strich entspricht einer Substitutionsrate von 5 %. Im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Bakterienstämme sind hervorgehoben.

## Diskussion

Um die Vielfalt der acetogenen Mikroorganismen abzubilden, sollte möglichst aus jedem Zweig des phylogenetischen Stammbaums mindestens ein Bakterium ausgewählt werden. Es musste jedoch berücksichtigt werden, dass folgende Bakterien nicht zu Auswahl standen:

*Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Eubacterium limosum* und *Acetobacterium woodii*. Für diese acetogenen Bakterienstämme wurde die autotrophe Kultivierung bereits näher untersucht und in der Literatur beschrieben (Abubackar et al. 2015; Phillips et al. 1993; Kundiyana et al. 2011; Phillips et al. 2015; Kantzow et al. 2015; Chang et al. 2001).

*Acetobacterium bakii*, *Acetobacterium paludosum*, *Acetobacterium tundrae*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophica*, *Thermoanaerobacter kivui* und *Thermoacetogenium phaeum*. Da es sich bei diesen Bakterienstämmen um psychrophile beziehungsweise thermophile Mikroorganismen handelt (Kotsyurbenko et al. 1995; Simankova et al. 2000; Kerby und Zeikus 1983; Wiegel et al. 1981; Leigh et al. 1981; Hattori et al. 2000) und eine Realisierung der extremen Wachstumstemperaturen im Rührkesselreaktor nicht möglich war, konnten diese Bakterienstämme nicht für den reaktionstechnischen Vergleich in Betracht gezogen werden.

Schließlich wurden folgende acht acetogenen Bakterienstämme aus sechs verschiedenen Gattungen für die reaktionstechnische Charakterisierung ihrer autotrophen Prozessleistung ausgewählt: *Acetobacterium fimetarium*, *Acetobacterium wieringae*, *Blautia hydrogenotrophica*, *Clostridium magnum*, *Eubacterium aggregans*, *Sporomusa acidovorans*, *Sporomusa ovata* und *Terrisporobacter mayombeii*.

## 5.2 Festlegung von Standardbedingungen für die autotrophe Satzkultivierung

Der Vergleich der autotrophen Prozessleistung der ausgewählten acetogenen Mikroorganismen sollte anhand von Daten erfolgen, die während einer Satzkultivierung in einem vollständig kontrollierten und kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor aufgenommen wurden. Um einen aussagekräftigen Vergleich der reaktionstechnischen Analysen durchführen zu können, sollten dabei alle autotrophen Satzkultivierungen unter Standardbedingungen durchgeführt werden. Die Standardbedingungen bezogen sich in diesem Zusammenhang auf das Kultivierungsmedium, den Leistungseintrag und die Begasungsrate während den

Satzkultivierungen. Die Einstellung von Temperatur und pH konnten nicht standardisiert werden, sondern wurden gemäß der optimalen Wachstumstemperatur und dem optimalen pH der einzelnen Bakterien (vergleiche Kapitel 4.4.2) eingestellt.

### 5.2.1 Entwicklung eines Standardmediums

Ein großes Problem für einen Vergleich der autotrophen Prozessleistung ist die sehr heterogene Zusammensetzung der Kultivierungsmedien, die in der Literatur und von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) für die einzelnen acetogenen Bakterien deklariert werden. Zum Teil enthalten diese Medien bis zu  $25 \text{ g L}^{-1}$  Komplexbestandteile oder es wird auf die Zugabe von Vitaminen oder Spurenelementen verzichtet. Die Verwendung dieser Medien würde einen Vergleich der autotrophen Prozessleistung unmöglich machen, da Medienbestandteile wie Hefeextrakt (Leclerc et al. 1998), Vitamine (Saxena und Tanner 2012) oder Spurenelemente (Saxena und Tanner 2011) einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung von Acetogenen haben. Um dennoch einen aussagekräftigen Vergleich der autotrophen Stoffwechselleistung der ausgewählten acetogenen Bakterien zu ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Standardmedium für die autotrophe Satzkultivierung verschiedener acetogener Mikroorganismen erarbeitet werden.

#### Zusammensetzung

Als Basis für das Standardmedium wurde das DSMZ 311 Medium verwendet, da diesem Medium nur geringe Mengen an Komplexbestandteilen ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) zugegeben werden und es bereits wichtige Bestandteile wie verschiedene Vitamine und Spurenelemente enthält. Zudem wird dieses Medium bereits für die Kultivierung mehrerer acetogener Bakterien wie beispielsweise *S. ovata* und *T. mayombei* von der DSMZ vorgeschlagen. Um dieses Basismedium für die autotrophe Satzkultivierung verschiedener acetogener Bakterien nutzbar zu machen, wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

- Um eine Stickstofflimitierung während der Satzkultivierung zu vermeiden, wurde die Ammoniumchlorid-Konzentration auf  $1 \text{ g L}^{-1}$  verdoppelt.
- Da vielen Enzyme des Acetyl-CoA Stoffwechselwegs ein Eisen-Schwefel-Cluster enthalten oder ein Metallion als Cofaktor besitzen (Ragsdale und Pierce 2008), wurden außerdem die Eisensulfat- und die Spurenelement-Konzentrationen verdoppelt.
- Zudem erfolgte eine Verdopplung aller Vitamin-Konzentrationen, da Vitamine, wie beispielsweise Biotin oder Folsäure essentiell für verschiedene acetogene

Mikroorganismen sind (Lundie und Drake 1984; Genthner et al. 1981; Graber und Breznak 2004).

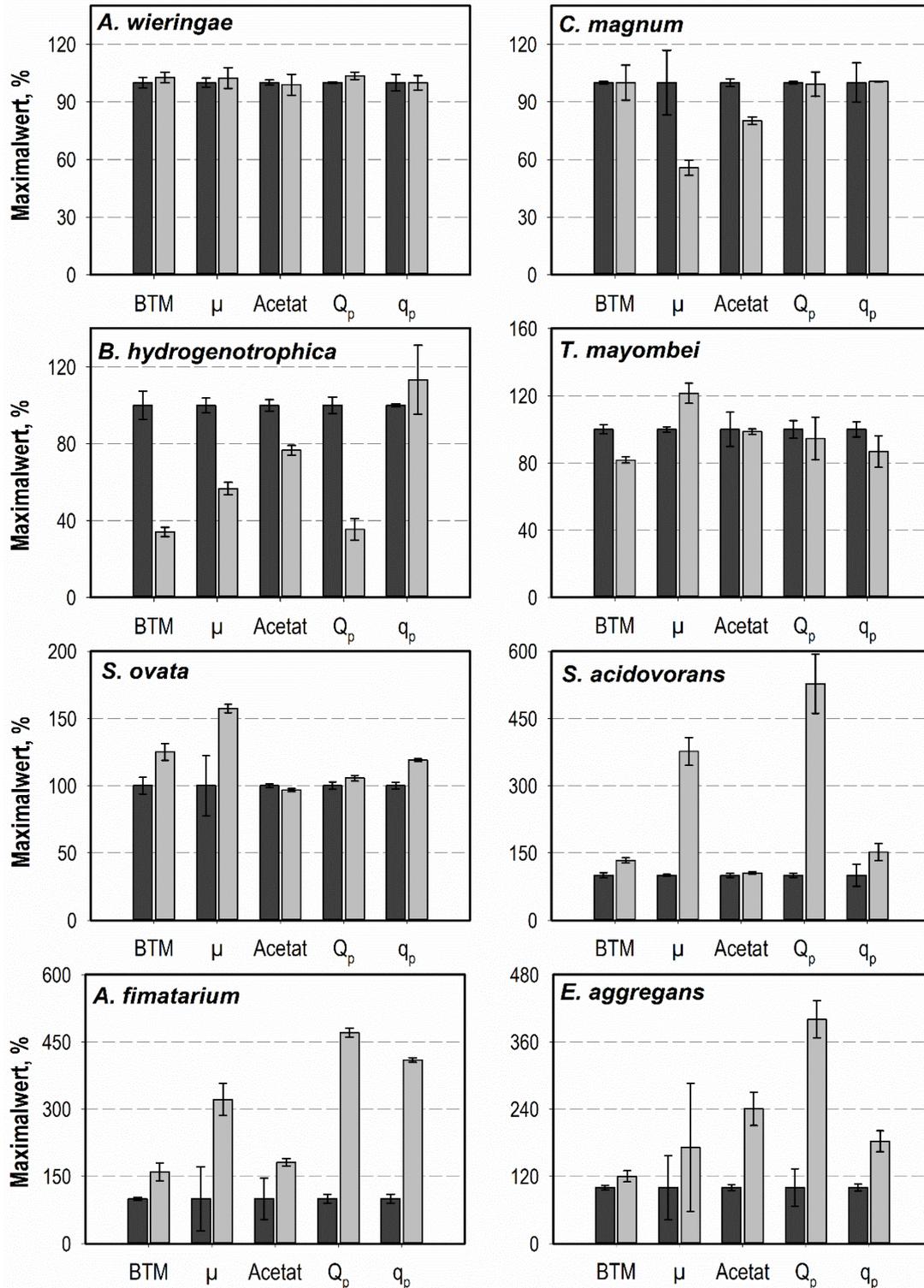
- Darüber hinaus wurde die Calciumchlorid-Konzentration auf  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  reduziert, um so die Bildung von unlöslichen Verbindungen wie beispielsweise Calciumcarbonat oder Calciumphosphat zu vermeiden.
- Neben Cystein-HCl ist im DSMZ Medium 311 auch Natriumsulfid als Reduktionsmittel enthalten. Da Natriumsulfid in wässrigem Medium zu flüchtigem Schwefelwasserstoff umgesetzt werden kann und so vor allem in kontinuierlich begasten Reaktoren ausgast (Hu et al. 2010), wurde Natriumsulfid aus dem Standardmedium eliminiert.
- Weiterhin wurden auch Pepton aus Casein aus der Liste der Medienkomponenten für das Standardmedium gestrichen, um so den Anteil an Komplexbestandteilen auf ein Minimum zu reduzieren.

Das durch die angegebenen Veränderungen neu entwickelte Medium wird im Folgenden stets als GA-Medium (General-Acetogen-Medium) bezeichnet. Die genaue Zusammensetzung des GA-Mediums kann in Kapitel 4.3 eingesehen werden.

### **Validierung des GA-Medium**

Um die Eignung des GA-Mediums für die autotrophe Satzkultivierung verschiedener acetogener Mikroorganismen zu validieren, sollte die autotrophe Satzkultivierung der acht ausgewählten Bakterienstämme in GA-Medium mit der autotrophen Satzkultivierung in den von der DSMZ angegebenen Medien (vergleiche Kapitel 4.3) verglichen werden.

Alle hierfür durchgeführten Satzversuche erfolgten in begasten Anaerobflaschen im Dreifachansatz. Zur Bewertung der autotrophen Prozessleistungen werden die maximalen Wachstumsraten, sowie die maximalen Biomassekonzentrationen und die volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten verglichen. Letztere werden anhand der Bildung von Acetat ermittelt, da Acetat gemäß Literaturangaben das autotrophe Hauptstoffwechselprodukt aller acht verwendeten Acetogenen ist (Braun und Gottschalk 1982; Bernalier et al. 1996; Bomar et al. 1991; Kane et al. 1991, Mechichi et al. 1998, 1998; Ollivier et al. 1985; Möller et al. 1984; Kotsyurbenko et al. 1995). Die Ergebnisse der Gegenüberstellung der autotrophen Satzkultivierungen in GA-Medium und DSMZ-Medium sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Um einen einfachen Vergleich zu ermöglichen, wurden die ermittelten Werte der betrachteten Prozessparameter für die Satzkultivierung in DSMZ-Medium auf 100 % normiert und die Werte für das GA-Medium dementsprechend berechnet. Die zugrundeliegenden Daten können im Anhang in Kapitel 11.3 eingesehen werden.



**Abbildung 5.2:** Vergleich der Maximalwerte der Konzentrationen an Biotrockenmasse (BTM), und Acetat, sowie der Wachstumsraten ( $\mu$ ) und der volumetrischen ( $Q_p$ ) und zellspezifischen Acetatbildungsrate ( $q_p$ ). Dunkelgrau: Autotrophe Satz Kultivierung in den von der DSMZ empfohlenen Medien. Hellgrau: Autotrophe Satz Kultivierung in GA-Medium. Werte, die unter Verwendung der DSMZ-Medien ermittelt wurden, sind auf 100% normiert. Die Werte für das GA-Medium wurden dementsprechend kalkuliert. Die Versuche erfolgten im Dreifachansatz in Anaerobflaschen mit einer Anfangsgasphase von 66%  $H_2$  und 34%  $CO_2$  (2 bar absolut).

Um einen negativen Einfluss zu starker pH-Veränderungen auf die autotrophen Satzkultivierungen auszuschließen, wurde der pH der einzelnen Kultivierungsansätze über die gesamte Versuchsdauer in regelmäßigen Abständen gemessen. Die detektierten pH-Werte befanden sich jedoch zu allen Zeitpunkten innerhalb des pH-Bereichs der für die einzelnen acetogenen Bakterien in der Literatur angegeben ist (Braun und Gottschalk 1982; Bernalier et al. 1996; Bomar et al. 1991; Kane et al. 1991, Mechichi et al. 1998, 1998; Ollivier et al. 1985; Möller et al. 1984; Kotsyurbenko et al. 1995).

Der Vergleich der detektierten Prozessparameter zeigt, dass für *A. wieringae*, *S. ovata* und *T. mayombeii* die Endkonzentrationen an Biomasse und Acetat aber auch die Wachstums- und Produktbildungsraten des autotrophen Satzprozesses in GA-Medium vergleichbar oder sogar etwas höher waren als bei der Kultivierung in den von der DSMZ vorgeschlagenen Medien. Die maximalen zellspezifischen Acetatbildungsraten beispielsweise waren für *A. wieringae*, *S. ovata* und *T. mayombeii* 15,19 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 17,83 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> und 19,34 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in GA-Medium und 15,20 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 14,98 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> und 20,55 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in den von der DSMZ angegebenen Medien.

Bei *S. acidovorans*, *A. fimetarium* und *E. aggregans* resultierte die Satzkultivierung in GA-Medium in einer signifikanten Verbesserung der autotrophen Prozessleistung. Die volumetrische Acetatbildungsrate beispielsweise erhöhte sich bei *S. acidovorans* um das 5,3-fache, von 0,65 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (DSMZ-Medium) auf 3,43 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (GA-Medium). Für *A. fimetarium* und *E. aggregans* waren die volumetrischen Acetatbildungsraten in GA-Medium 4,7-fach und 4,0-fach höher als in dem von der DSMZ vorgeschlagenen Medium. Die zellspezifischen Acetatbildungsraten erhöhten sich für *S. acidovorans*, *A. fimetarium* und *E. aggregans* um das 1,5-fache – 4-fache in GA-Medium.

Beim Vergleich der beiden autotrophen Satzkultivierungen für *C. magnum* und *B. hydrogenotrophica* ergab sich ein anderes Bild. Bei beiden Acetogenen führte die Satzkultivierung in GA-Medium zu teilweise deutlich erniedrigten Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, sowie Wachstums- und volumetrischen Acetatbildungsraten. So war die maximal detektierte Biotrockenmassekonzentration für *B. hydrogenotrophica* in dem von der DSMZ vorgeschlagenen Medium 0,41 g L<sup>-1</sup>, wohingegen die Biomasse in der Satzkultivierung in GA-Medium nur eine Endkonzentration von 0,14 g L<sup>-1</sup> erreichte. Lediglich die zellspezifischen Acetatbildungsraten waren in den Versuchen in GA-Medium gleich gut (*C. magnum*), oder sogar besser (*B. hydrogenotrophica*) als in dem jeweiligen Vergleichsversuch.

## Diskussion

Die Resultate für *A. wieringae*, *A. fimetarium*, *E. aggregans*, *S. acidovorans*, *S. ovata* und *T. mayombeii* zeigen deutlich, dass das GA-Medium für die autotrophe Satzkultivierung dieser acetogenen Mikroorganismen sehr gut geeignet ist. Bei dem Vergleich der autotrophen Prozessleistung von *C. magnum* und *B. hydrogenotrophica* in GA- und DSMZ-Medium, muss bedacht werden, dass das von der DSMZ angegebene Medium für diese Stämme jeweils  $20 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise  $25 \text{ g L}^{-1}$  Komplexbestandteile enthält. Im Gegensatz dazu ist das GA-Medium mit lediglich  $2 \text{ g L}^{-1}$  Hefeextrakt versetzt. Die erhöhte Verfügbarkeit von heterotrophen Kohlenstoffquellen in den DSMZ-Medien (Faktor 10 oder höher) führte folglich zu erhöhten Wachstumsraten, sowie zu höheren Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen in den Satzkultivierungen. Die verwendeten DSMZ-Medien repräsentieren daher jedoch weniger autotrophe, sondern vielmehr mixotrophe Prozessbedingungen. Die Gegenüberstellung der zellspezifischen Acetatbildungsraten zeigt hingegen, dass die Produktivität der Bakterienzellen in GA-Medium auch bei *C. magnum* und *B. hydrogenotrophica* vergleichbar oder sogar besser war als in den von der DSMZ vorgeschlagenen Medien. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das GA-Medium auch für die autotrophe Satzkultivierung von *C. magnum* und *B. hydrogenotrophica* gut geeignet ist.

Da die ausgewählten Bakterienstämme sechs verschiedenen Gattungen angehören und einen Querschnitt des gesamten phylogenetischen Stammbaums darstellen (vergleiche Kapitel 525.1), kann angenommen werden, dass sie die Vielfalt der acetogenen Bakterien gut wiedergeben. Unter dieser Voraussetzung und in Anbetracht der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse, kann davon ausgegangen werden, dass das neu designte GA-Medium für die autotrophe Kultivierung aller acetogener Bakterien geeignet ist. Durch die Verwendung des GA-Mediums eröffnet sich damit die Möglichkeit, die autotrophe Prozessleistung verschiedener acetogener Mikroorganismen ohne den verfälschenden Einfluss verschiedener Medienkomponenten, wie beispielsweise Hefeextrakt, Vitamine oder Spurenelemente zu vergleichen.

### 5.2.2 Leistungs- und Gaseintrag im Rührkesselreaktor

Sind Bakterien substratlimitiert, können keine maximalen Wachstums- und Produktbildungsraten erreicht werden. Um bei Synthesegasfermentationen eine Limitierung durch die gasförmigen Substrate zu vermeiden, muss deshalb während der Gasfermentation im Rührkesselreaktor ein genügend hoher Leistungseintrag beziehungsweise eine genügend hohe Rührerdrehzahl eingestellt werden um so ausreichend hohe Gaseintragsraten zu gewährleisten (Hass und Pörtner 2011). Dem gegenüber steht jedoch die Tatsache, dass einige acetogene Mikroorganismen, wie beispielsweise *C. aceticum* (Braun 1981), scherkraftempfindlich sind. Auf Grund der gegebenen Voraussetzungen sollte für die Festlegung der Standardbedingungen für den reaktionstechnischen Vergleich der autotrophen Prozessleistung die niedrigst mögliche Rührerdrehzahl ermittelt werden, bei der noch eine ausreichende Versorgung der ausgewählten acetogenen Mikroorganismen mit den gasförmigen Substraten  $H_2$  und  $CO_2$  im 1 L-Rührkesselreaktor gewährleistet werden kann. Die Begasungsrate spielt für den Gaseintrag lediglich eine untergeordnete Rolle (vergleiche Kapitel 3.4). Um während der autotrophen Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor jedoch eine möglichst effiziente Nutzung der zugeführten Gase zu erreichen, sollte für die Standardbedingungen zusätzlich ein möglichst niedriger Gasvolumenstrom eingestellt werden.

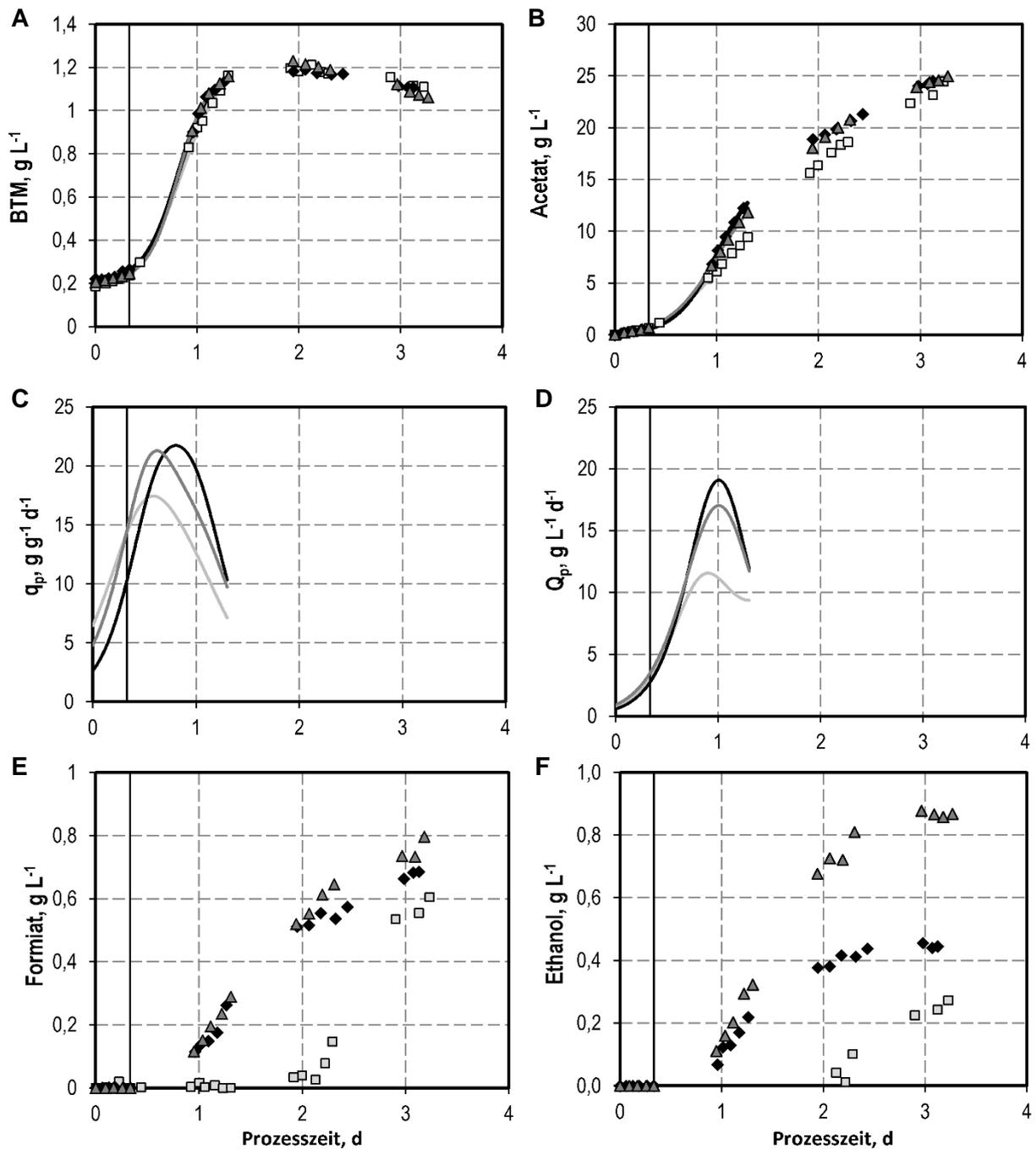
#### Leistungseintrag

Um die acetogenen Mikroorganismen während der Adaption an die autotrophen Kultivierungsbedingungen im Rührkesselreaktor nach der Inokulation nicht zusätzlichem potentiell Scherstress auszusetzen, wurde für die Standardbedingungen ein zweiphasiger Betrieb der Rührerdrehzahl festgelegt. Nach der Inokulation wurde die Drehzahl zunächst auf 200 rpm ( $0,05 \text{ W L}^{-1}$ ) eingestellt. Nach einer erfolgreichen Adaption der acetogenen Mikroorganismen an die autotrophen Bedingungen (autotrophe Produktion von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Carbonsäuren) wurde die Rührerdrehzahl automatisiert erhöht (vergleiche Kapitel 4.4.4). Für die zweite Phase der Rührerdrehzahl sollte eine möglichst niedrige und gleichzeitig jedoch ausreichend hohe Drehzahl gewählt werden, um so eine Limitierung durch die gasförmigen Substrate  $H_2$  und  $CO_2$  zu vermeiden. Zur Ermittlung dieser Drehzahl wurden autotrophe Satzkultivierungen mit *S. ovata* durchgeführt, da dieser Mikroorganismus während der autotrophen Satzkultivierung in Anaerobflaschen (vergleiche Kapitel 5.2.1) vergleichsweise hohe Wachstums- und Produktbildungsraten gezeigt hatte und in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) eine Scherkraftunempfindlichkeit ermittelt wurde.

Abbildung 5.3 zeigt drei autotrophe Satzkultivierungen von *S. ovata* im 1 L-Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Drehzahlstufen der zweiten Drehzahlphase. 500 rpm entsprechen dabei einem Leistungseintrag von  $0,85 \text{ W L}^{-1}$ . Der zugehörige Leistungseintrag von 600 rpm ist  $1,5 \text{ W L}^{-1}$  und von 800 rpm  $3,5 \text{ W L}^{-1}$ .

Die Biotrockenmassekonzentration verläuft in allen drei Versuchen annähernd identisch, was auch durch die sehr ähnlichen maximalen Wachstumsraten wiedergegeben wird (500 rpm:  $2,50 \text{ d}^{-1}$ ; 600 rpm:  $2,73 \text{ d}^{-1}$ ; 800 rpm:  $2,52 \text{ d}^{-1}$ ).

Bei den Verläufen der Acetatkonzentrationen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. Während die Acetatkonzentration in den Versuchen mit 600 rpm und 800 rpm relativ ähnlich verläuft und in beiden Fällen eine sigmoidale Funktion beschreibt, liegt die Acetatkonzentration im Versuch mit einer Drehzahl von 500 rpm zwischen 1,5 und 2,5 Tagen stets unter den Acetatkonzentrationen der Vergleichsversuche. Der Acetatverlauf der Satzkultivierung mit 500 rpm beschreibt dabei mehr eine lineare Funktion. Die aus den Versuchsdaten berechnete zellspezifische Acetatbildungsrate der Satzkultivierung mit 500 rpm ( $17,8 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) liegt ebenfalls deutlich unter denen der Satzkultivierungen mit 600 rpm ( $21,3 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und 800 rpm ( $21,7 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Das gleiche gilt auch für die volumetrischen Produktbildungsrate (vergleiche Abbildung 5.3 D). Die nach 3 Tagen gemessenen Formiatkonzentrationen waren in allen drei Versuchen ähnlich, wobei ein Anstieg der Formiatkonzentration im Versuch mit 500 rpm erst nach 2 Tagen beobachtet wurde, wohingegen die Formiatbildung in den Vergleichsversuchen bereits nach 1 Tag einsetzte. Eine zeitlich verzögerte Produktion wurde auch für Ethanol beobachtet. Die nach 3 Tagen bestimmte Ethanolkonzentration der Satzkultivierung mit 600 rpm war mit  $0,87 \text{ g L}^{-1}$  in etwa doppelt so hoch wie die Ethanolkonzentration in den Vergleichskultivierungen.

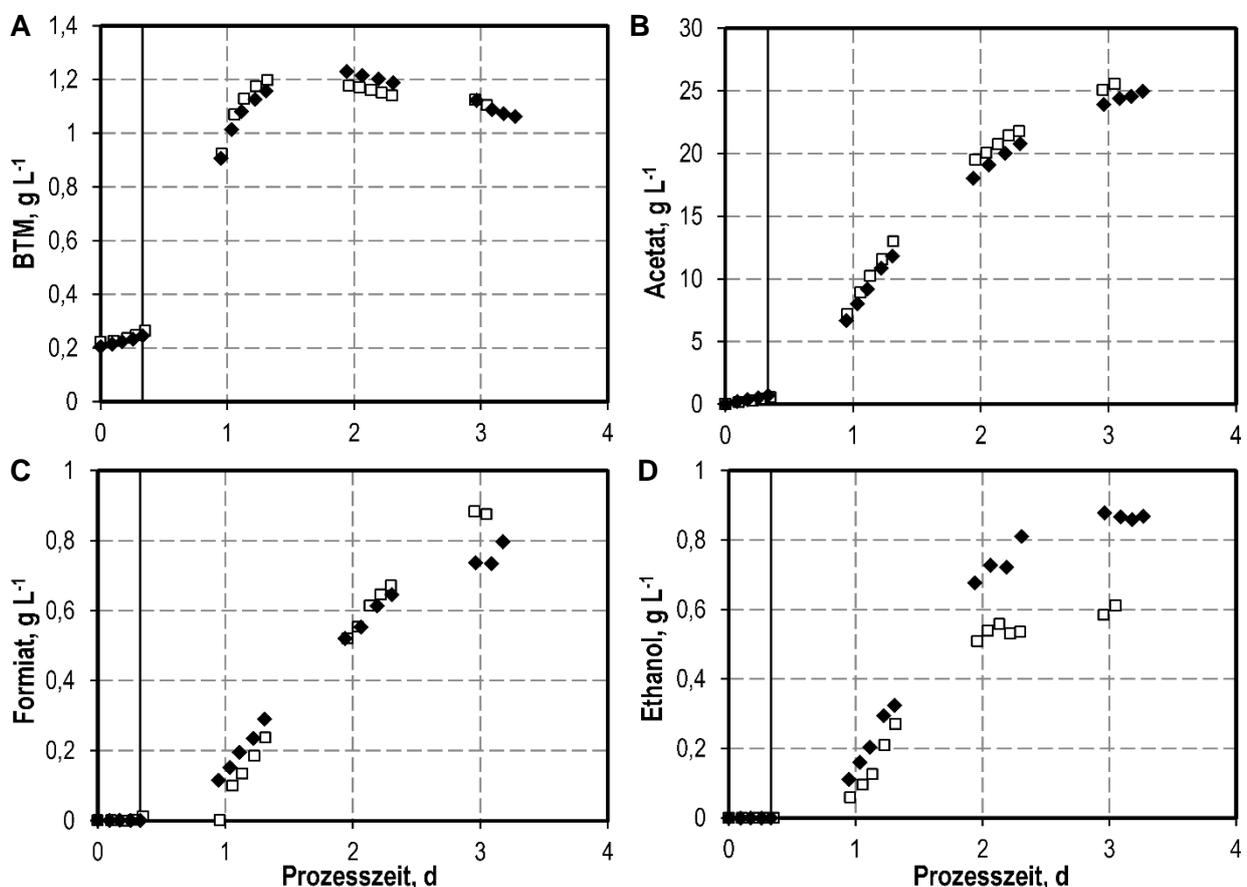


**Abbildung 5.3:** Autotrophe Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Drehzahleniveaus der zweiten Drehzahlphase. Hellgrau (□): 500 rpm ( $0,85 \text{ W L}^{-1}$ ); Dunkelgrau (▲): 600 rpm ( $1,5 \text{ W L}^{-1}$ ); Schwarz (◆): 800 rpm ( $3,5 \text{ W L}^{-1}$ ). A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Acetatkonzentrationen; C) zellspezifische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetatbildungsrate; C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Acetatkonzentrationen ermittelt; E) Formiatkonzentrationen; F) Ethanolkonzentrationen, Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an. Die Satzkultivierungen wurden bei einer Temperatur von  $30^\circ\text{C}$  und einem pH von 7,0 durchgeführt. Die Begasungsrate betragen jeweils  $10 \text{ L h}^{-1}$  mit einem  $p_{\text{H}_2}$  von 800 mbar und einem  $p_{\text{CO}_2}$  von 200 mbar.

## Begasungsrate

Um eine effiziente Nutzung der zugeführten gasförmigen Substrate ( $H_2$  und  $CO_2$ ) zu erreichen und möglichst wenig ungenutztes Gas über den Abgasvolumenstrom wieder aus dem Rührkesselreaktor auszutragen, sollte eine möglichst niedrige Begasungsrate eingestellt werden, die jedoch keine Gaslimitierung verursacht.

Abbildung 5.4 zeigt den Vergleich von zwei autotrophen Satzkultivierungen mit *S. ovata*, wobei die Begasungsrate entweder auf  $10\text{ L h}^{-1}$  oder auf lediglich  $5\text{ L h}^{-1}$  eingestellt wurde. Die Gaspartialdrücke betragen in beiden Fällen  $800\text{ mbar}$  für  $H_2$  und  $200\text{ mbar}$  für  $CO_2$ .



**Abbildung 5.4:** Autotrophe Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Begasungsraten. (□):  $5\text{ L h}^{-1}$ ; (◆):  $10\text{ L h}^{-1}$ . A) Biotrockenmassekonzentrationen; B) Acetatkonzentrationen; C) Formiatkonzentrationen; D) Ethanolkonzentrationen, Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an. Die Drehzahl betrug  $200/600\text{ rpm}$ . Die Kultivierungen wurden bei einer Temperatur von  $30\text{ °C}$  und einem pH von  $7,0$  Medium durchgeführt. Es wurde jeweils mit einem  $pH_2$  von  $800\text{ mbar}$  und einem  $pCO_2$  von  $200\text{ mbar}$  begast.

Die Verläufe der Biotockenmassekonzentrationen sind in beiden Versuchen nahezu identisch. Die Acetatkonzentration der Satzkultivierung mit einer Begasungsrate von  $5 \text{ L h}^{-1}$  stieg ab 1 Tag über die Acetatkonzentration des Vergleichsprozesses und lag ab 2 Tagen stets etwa  $1 \text{ g L}^{-1}$  über der Acetatkonzentrationen der Satzkultivierung mit der höheren Begasungsrate. Die Formiatbildung setzte im autotrophen Satzprozess mit einer Begasungsrate von  $5 \text{ L h}^{-1}$  etwas später ein als im Vergleichsversuch, erreichte am Ende der Satzkultivierung jedoch eine um  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  erhöhte Endkonzentration. Die gemessene Endkonzentration an Ethanol war im Versuch mit einer Begasungsrate von  $10 \text{ L h}^{-1}$  um etwa  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  höher als in der Vergleichskultivierung.

In Tabelle 5.2 sind die wichtigsten prozesstechnischen Parameter der beiden autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* mit unterschiedlicher Begasungsrate angegeben. Die Parameter zeigen, dass das Wachstum und die Acetatbildung im Versuch mit einer Begasungsrate von  $5 \text{ L h}^{-1}$  vergleichbar sind zur Satzkultivierung mit  $10 \text{ L h}^{-1}$ .

**Tabelle 5.2:** Spezifische Raten (maximale Wachstumsrate, zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate) bei autotrophen Satzprozessen mit *S. ovata* im 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Begasungsraten.

Begasungsrate	$\mu, \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Acetat}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Acetat}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
5 L h <sup>-1</sup>	2,82	18,13	23,44
10 L h <sup>-1</sup>	2,73	17,02	21,28

## Diskussion

In diesem Kapitel sollten die Drehzahl und die Begasungsrate für die Standardbedingungen der autotrophen Satzkultivierungen im 1 L-Rührkesselreaktor anhand von Versuchen mit *S. ovata* untersucht und festgelegt werden.

Die Versuche zur Drehzahl verdeutlichten, dass ein Leistungseintrag von  $0,85 \text{ W L}^{-1}$  ( $\cong 500 \text{ rpm}$ ) zu gering war, um eine genügend hohe Gaseintragsrate und somit gasunlimitierte Bedingungen zu gewährleisten. Dies wird vor allem anhand der linearen Acetatproduktion zwischen 1,5 und 2,5 Tagen und den deutlich erniedrigten zellspezifischen und volumetrischen Acetatbildungsraten der Satzkultivierung mit  $500 \text{ rpm}$  ersichtlich. Bei den Leistungseinträgen von  $3,5 \text{ W L}^{-1}$  ( $\cong 800 \text{ rpm}$ ) und  $1,5 \text{ W L}^{-1}$  ( $\cong 600 \text{ rpm}$ ) konnte keine Gaslimitierung beobachtet werden. Da die Rührerdrehzahl auf Grund der Scherempfindlichkeit einiger acetogener Mikroorganismen (Braun 1981) so niedrig wie möglich gehalten werden sollte und sich für die autotrophe Satzkultivierung bei  $800 \text{ rpm}$  im Gegensatz zu  $600 \text{ rpm}$  keine signifikanten Vorteile

für Wachstum und Produktbildung ergaben, wurde 600 rpm bzw. ein Leistungseintrag von  $1,5 \text{ W L}^{-1}$  als Standardbedingung für die autotrophe Satzkultivierung der ausgewählten acetogenen Mikroorganismen festgelegt.

Die Halbierung der Begasungsrate auf  $5 \text{ L h}^{-1}$  führte zu keiner Gaslimitierung und keinem negativen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung. Die leichte Steigerung der berechneten Prozessparameter im Versuch mit  $5 \text{ L h}^{-1}$  muss als nicht signifikant eingestuft werden. Da eine möglichst effiziente und vollständige Nutzung der zugeführten gasförmigen Substrate erreicht werden sollte, wurde eine Begasungsrate von  $5 \text{ L h}^{-1}$  als Standardbedingung für die autotrophen Satzkultivierungen festgelegt.

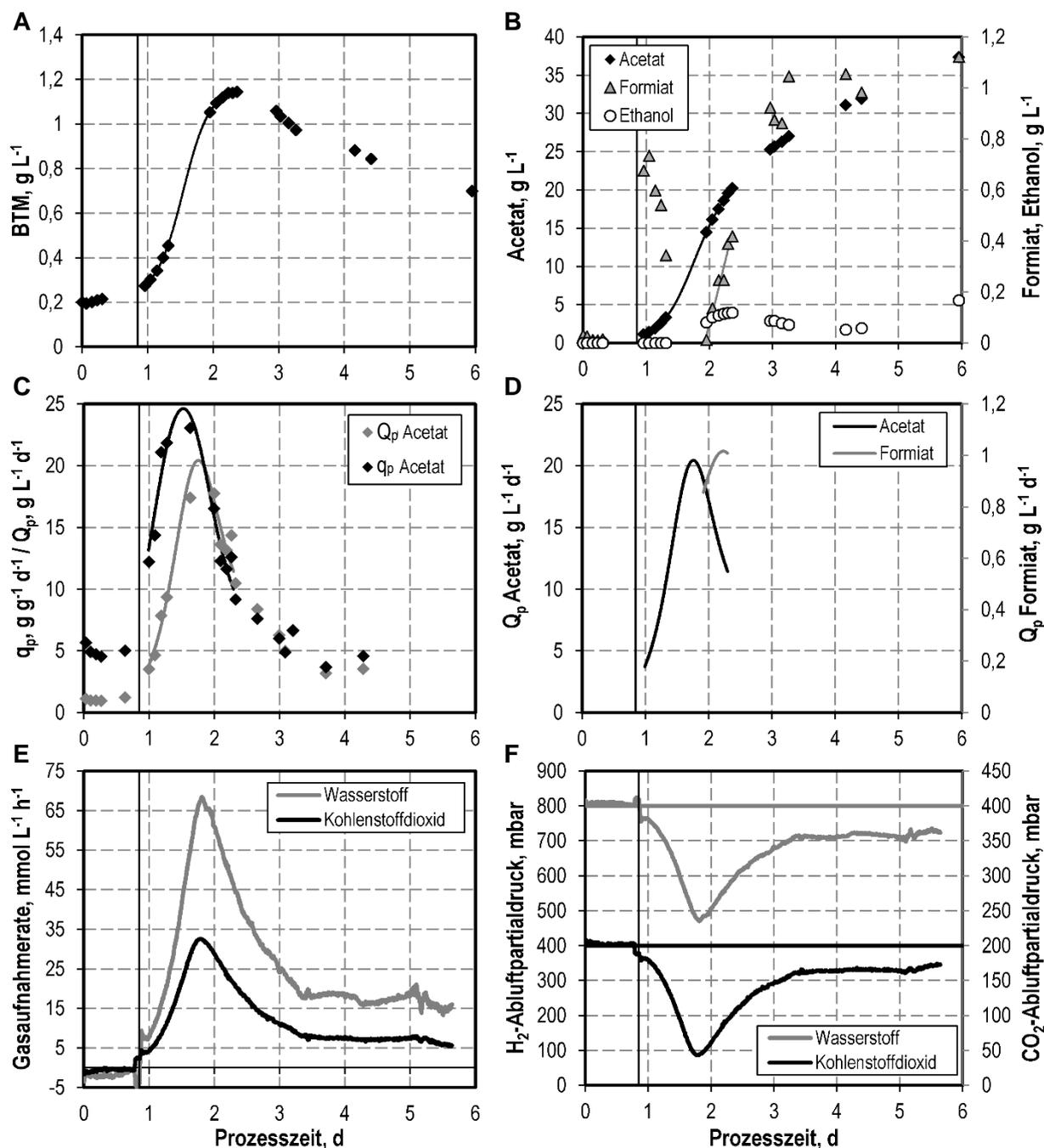
### 5.3 Autotrophe Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor

Um einen signifikanten Vergleich der autotrophen Prozessleistung der ausgewählten acetogenen Mikroorganismen zu ermöglichen, sollten alle autotrophen Satzkultivierungen im Rührkesselreaktor unter den in Kapitel 5.2 festgelegten Standardkultivierungsbedingungen durchgeführt werden. Für die nachfolgenden dargestellten Satzprozesse wurde deshalb stets das GA-Medium verwendet. Der Rührkesselreaktor wurde kontinuierlich mit  $5 \text{ L h}^{-1}$  begast ( $p_{\text{H}_2}$  800 mbar;  $p_{\text{CO}_2}$  200 mbar). Die anfängliche Rührerdrehzahl betrug 200 rpm und wurde nach der Adaption der acetogenen Bakterien an die autotrophen Bedingungen im Rührkesselreaktor automatisiert auf 600 rpm erhöht.

Um die autotrophe Prozessleistung der 8 ausgewählten Stämme besser beurteilen zu können, sollte zudem die autotrophe Satzkultivierung eines Referenzstamms erfolgen.

#### 5.3.1 *Acetobacterium woodii* als Referenzstamm

Bis dato wurden die höchsten autotrophen Acetatbildungsraten bei acetogenen Bakterien für *A. woodii*, eines der am besten untersuchten acetogenen Bakterien, berichtet (Daniell et al. 2012). Um die Eignung der festgelegten Standardkultivierungsbedingungen zu beweisen und Referenzdaten für den Vergleich der autotrophen Prozessleistung der 8 ausgewählten acetogenen Bakterien zu generieren, wurde *A. woodii* als Referenzstamm ebenfalls unter den festgelegten Standardbedingungen kultiviert. Die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung mit *A. woodii* im kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Autotrophe Satzkultivierung von *A. woodii* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

Bei einer Drehzahl von 200 rpm, innerhalb des ersten Tages der Satzkultivierung, zeigte *A. woodii* lediglich sehr geringe Wachstums- und Produktbildungs-, sowie Gasaufnahmeleistungen. Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl nach 0,85 Tagen führte zu einem steilen Anstieg der Gasaufnahmeleistungen. Die maximale Wachstumsrate wurde nach 1,4 Tagen detektiert und erreichte einen Wert von  $1,9 \text{ d}^{-1}$ . Die Erhöhung der Drehzahl führte außerdem zu einer Erhöhung der Acetatbildungsleistungen und einer Produktion von Formiat und Ethanol, wobei Formiat innerhalb des ersten Tages nach der Drehzahlerhöhung wieder metabolisiert wurde. Die maximal detektierte Ethanolkonzentration betrug  $0,17 \text{ g L}^{-1}$ . Die maximale zellspezifische Acetatbildungsleistung von  $24,52 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde nach 1,5 Tagen detektiert. Die maximale volumetrische Acetatbildungsleistung von  $20,37 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde nach etwa 1,8 Tagen gemessen und war mit den Maxima der Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidaufnahmeleistungen assoziiert. Am Ende der Satzkultivierung wurde eine finale Acetatkonzentration von  $37,4 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Die integrale Kohlenstoffbilanz war zu 98,2 % geschlossen.

## Diskussion

Der steile Anstieg der Gasaufnahmeleistungen nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl deutet auf eine starke gas-flüssig Massentransportlimitierung während der ersten Kultivierungsphase bei 200 rpm hin. Die maximale Wachstumsleistung von  $1,9 \text{ d}^{-1}$  ist deutlich höher als die von Kantzow et al. (2015) im Rührkesselreaktor unter optimierten Kultivierungsbedingungen detektierte Wachstumsleistung von  $1,2 \text{ d}^{-1}$ . Die maximale zellspezifische Acetatbildungsleistung von  $24,52 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ist sogar 1,5 mal höher als die höchste in der Literatur beschriebene zellspezifische Acetatbildungsleistung für *A. woodii* (Kantzow et al. 2015). Die finale Acetatkonzentration von  $37,4 \text{ g L}^{-1}$  lag hingegen deutlich unter der von Kantzow et al. (2015) berichteten maximalen Acetatkonzentration ( $59,2 \text{ g L}^{-1}$ ), was jedoch auf die 10-fach niedrigere Inokulations-Biotrockenmassekonzentration in dem hier durchgeführten Satzversuch zurückgeführt werden muss. Alle detektierten Prozessparameter übertrafen jedoch die bislang für die autotrophe Satzkultivierung von *A. woodii* im Rührkesselreaktor bestimmten Prozessparameter (Kantzow et al. 2015; Demler und Weuster-Botz 2011), weshalb die gezeigten Ergebnisse eindeutig die Eignung der festgelegten Standardbedingungen für die autotrophe Satzkultivierung von acetogenen Bakterien im Rührkesselreaktor nachweisen. Zudem wurde im dargestellten Versuch zum ersten Mal die autotrophe Bildung von Ethanol durch *A. woodii* gezeigt. In der Literatur wurde die Produktion von Ethanol durch *A. woodii* bislang lediglich unter heterotrophen Kultivierungsbedingungen beschrieben (Buschhorn et al. 1989).

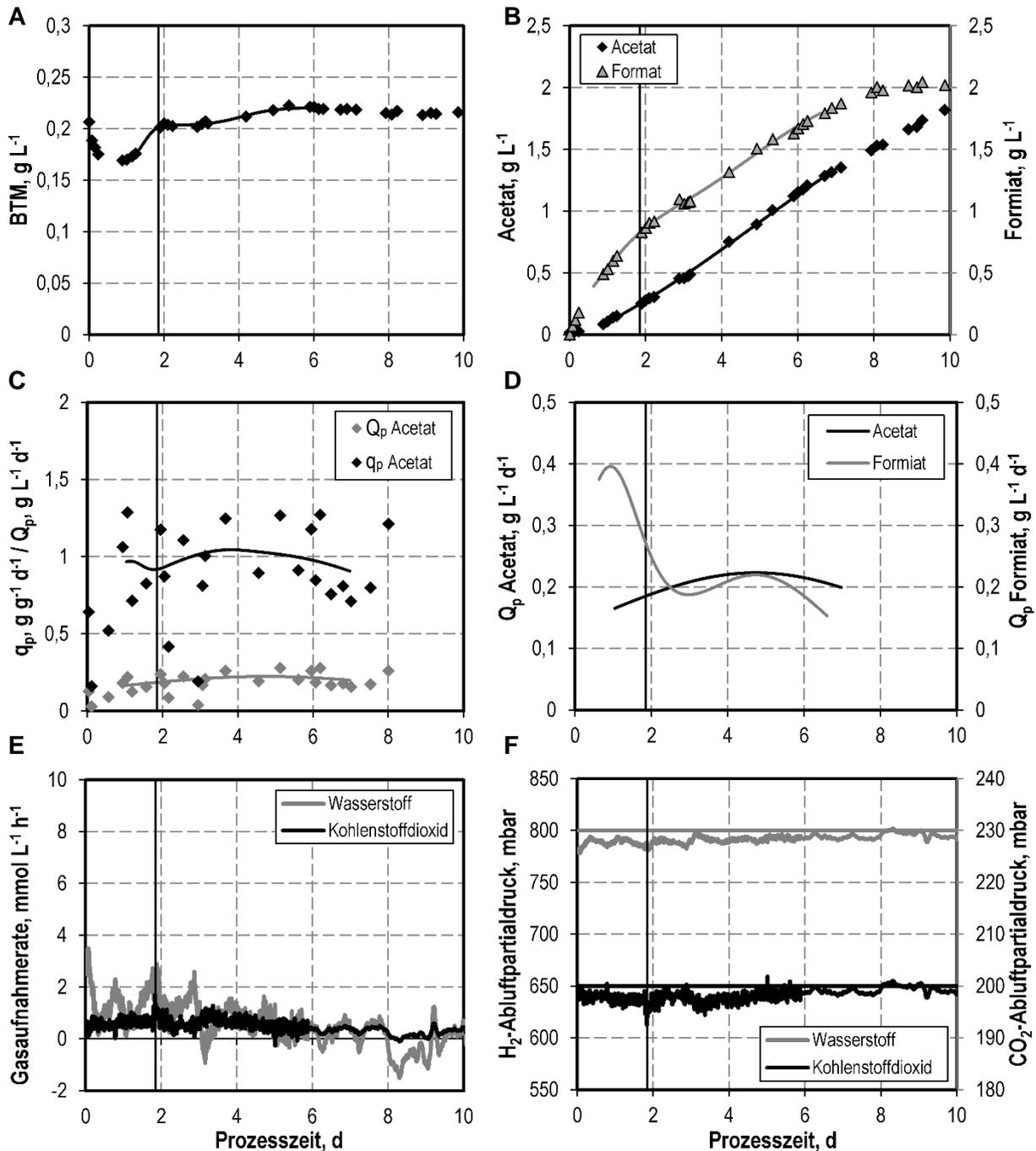
### 5.3.2 *Acetobacterium fimetarium*

*A. fimetarium* ist ein stäbchenförmiges, gram-positives und psychroaktives Bakterium, dessen Fähigkeit zur Nutzung von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als Substrate erstmals 1995 von Kotsyurbenko et al. nachgewiesen wurde. Die autotrophe Satzkultivierung von *A. fimetarium* im 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

Während des ersten Tages war zunächst eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen. Erst nach dieser Zeit zeigte *A. fimetarium* ein Wachstum, wobei eine maximale Wachstumsrate von 0,28 d<sup>-1</sup> erreicht wurde. Nach der automatisierten Erhöhung der Rührerdrehzahl nach 1,85 Tagen stagnierte die Biomassebildung jedoch erneut. Die maximale Biotrockenmasse wurde nach 5,4 Tagen gemessen und erreichte eine Konzentration von 0,22 g L<sup>-1</sup>.

Das Hauptprodukt der autotrophen Satzkultivierung von *A. fimetarium* war Formiat, gefolgt von Acetat. In der ersten Phase der Satzkultivierung (200 rpm) wurde eine volumetrische Formiatbildungsrate von 0,39 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erreicht. Durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl wurde die Formiatbildung erniedrigt (0,22 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Die maximale Formiatkonzentration wurde nach 8 Tagen gemessen (2,04 g L<sup>-1</sup>), wohingegen Acetat während des gesamten Satzprozesses annähernd linear gebildet wurde und nach 10 Tagen eine Konzentration von 1,9 g L<sup>-1</sup> erreichte. Bei der Acetatbildung konnte kein Einfluss der Rührerdrehzahl beobachtet werden. Abbildung 5.6 C zeigt die gute Vergleichbarkeit der Daten für die zellspezifische und volumetrische Acetatbildung die zum einen anhand der offline gemessenen Konzentrationen und zum anderen anhand der nicht linearen Interpolation der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentration berechnet wurden.

Die Gasaufnahmearten waren während der gesamten Satzkultivierung gering. Die maximal bestimmte H<sub>2</sub>-Aufnahmerate betrug 2,5 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, die CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate erreichte einen maximalen Wert von 1,1 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die berechnete integrale Kohlenstoffbilanz war zu 102,7 % geschlossen, wobei über den gesamten Satzprozess 116,8 mmol Kohlenstoff in Biomasse und Produkten fixiert wurde.



**Abbildung 5.6:** Autotrophe Satzkultivierung von *A. fimetarium* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,5. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat- und Formiatkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

## Diskussion

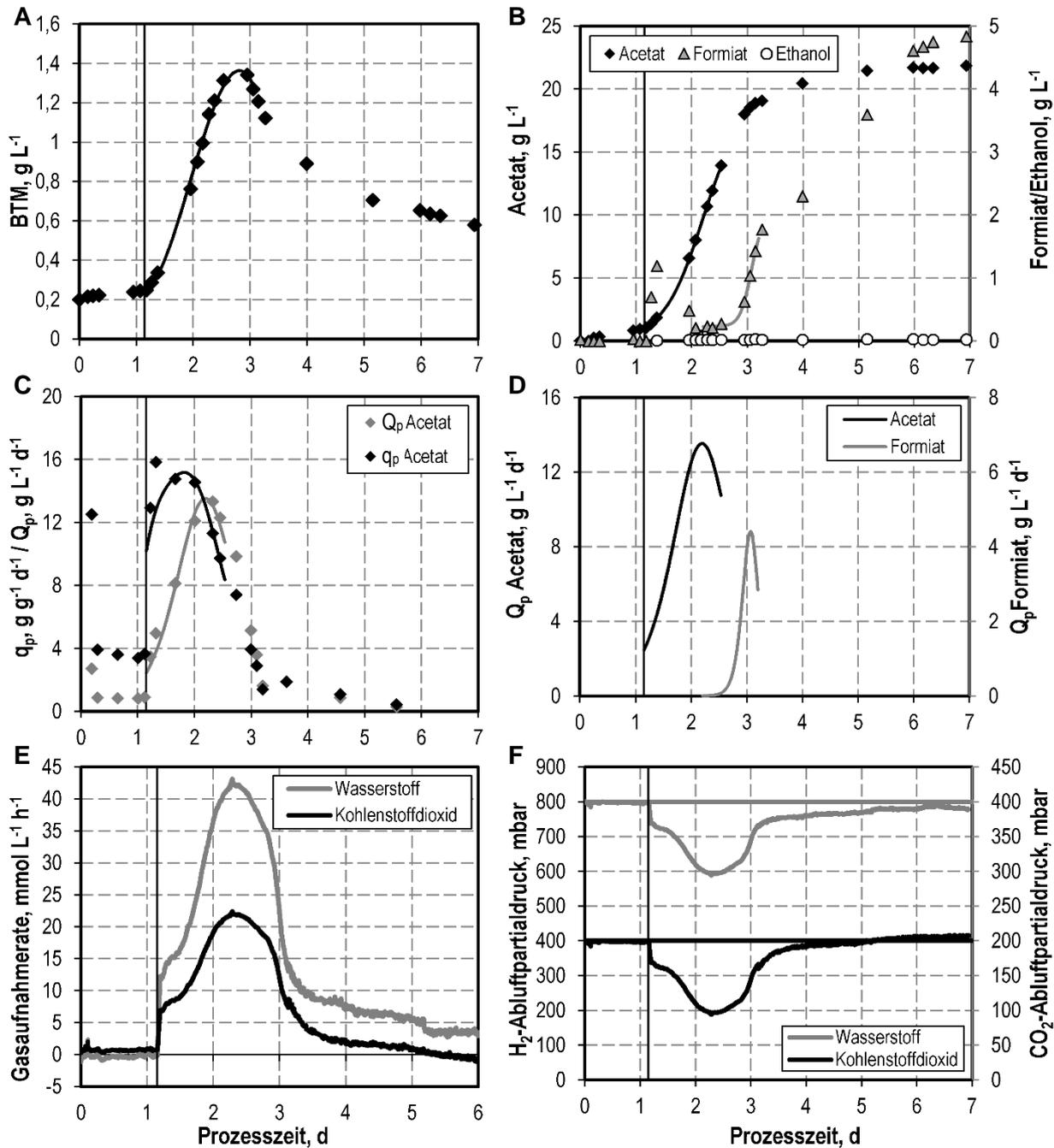
Die in diesem Absatz dargestellten Ergebnisse belegen die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *A. fimetarium* in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung. Anhand der zu 102,7 % geschlossenen integralen Kohlenstoffbilanz kann gefolgert werden, dass alle gebildeten Produkte detektiert wurden.

Der negative Einfluss der Erhöhung der Rührerdrehzahl auf die Biotrockenmasse- und Formiatbildung deutet auf eine Sensitivität von *A. fimetarium* gegenüber hohen Scherkräften hin. Kotsyurbenko et al. (1995) gaben Acetat als einziges Produkt der autotrophen Satzkultivierung von *A. fimetarium* an. Im Gegensatz zu dieser Literaturangabe konnte im oben dargestellten Satzprozess zusätzlich die Akkumulation des Intermediates Formiat beobachtet werden. Formiat wird im Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs im ersten Schritt des Methylzweigs gebildet (vergleiche Kapitel 3.1.2), wobei für die weitere Umsetzung dieses Zwischenprodukts Energie benötigt. Steht zu wenig ATP zur Verfügung kommt es zu einer Akkumulation von Formiat in der Zelle und beim Überschreiten einer kritischen Konzentration zu einem Ausschleusen dieses Intermediates (Peters et al. 1999). Die Bildung von Formiat deutet folglich auf eine Störung des Energiestoffwechsels von *A. fimetarium* hin. Die lineare Acetatproduktion während des gesamten Satzversuchs bestätigt diese These zusätzlich. Durch den Mangel an ATP kann Formiat nur in begrenztem Maß weiter umgesetzt werden, wodurch es zu einer Limitierung des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs und damit auch zu einer Limitierung der Acetatbildung kommt.

### 5.3.3 *Acetobacterium wieringae*

*A. wieringae* ist ein gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium das neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid auch Kohlenstoffmonoxid als Substrat für den autotrophen Metabolismus nutzen kann (Braun und Gottschalk 1982). In Abbildung 5.7 ist die autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* im 1 L-Rührkesselreaktor mit einer kontinuierlichen Begasung durch H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> dargestellt.

Innerhalb des ersten Tages der Satzkultivierung, bei einer Rührerdrehzahl von 200 rpm, konnten nur sehr geringe Wachstums- und Produktbildungsrate detektiert werden. Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl nach 1,1 Tagen führte zu einem sofortigen starken Anstieg der Gasaufnahme, sowie der Wachstumsrate, wobei die maximale Wachstumsrate von 1,76 d<sup>-1</sup> innerhalb kürzester Zeit nach der Drehzahlerhöhung erreicht wurde. Nach einer Prozesszeit von 3 Tagen wurde die maximale Biotrockenmassekonzentration von 1,36 g L<sup>-1</sup> detektiert bevor die Biotrockenmasse wieder abnahm und am Ende des Satzprozesses eine Konzentration von 0,6 g L<sup>-1</sup> erreichte.



**Abbildung 5.7:** Autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,4. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Abdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

Die Erhöhung der Rührerdrehzahl führte ebenfalls zu einem Anstieg der Acetatproduktion und der Bildung von Formiat und Ethanol. Ethanol wurde während des gesamten Satzprozesses kontinuierlich in kleinen Mengen gebildet und erreichte nach 7 Tagen eine Konzentration von  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu wurde Formiat innerhalb des ersten Tages nach der Drehzahlerhöhung wieder verstoffwechselt. Nach 2 Tagen kam es zu einer erneuten Bildung von Formiat, wobei am Ende der Satzkultivierung eine Konzentration von  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde. Die maximale volumetrische Acetatbildungsrate von  $13,51 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde nach einer Prozesszeit von etwa 2 Tagen detektiert und korrelierte mit den Maxima der  $\text{H}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Aufnahmeraten ( $42,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $22,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Nach 5 Tagen wurde eine maximale Acetatkonzentration von  $21,9 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Während des gesamten Satzprozesses wurden  $891,1 \text{ mmol}$  Kohlenstoff in Biomasse und Produkten fixiert. Die daraus berechnete integrale Kohlenstoffbilanz war zu  $101,8 \%$  geschlossen.

### Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung. Der abrupte Anstieg der Gasaufnahme-, Wachstums- und Produktbildungsrate nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl deutet auf eine starke Gaslimitierung während der anfänglich niedrigen Rührerdrehzahl von 200 rpm hin. Die maximale Wachstumsrate von  $1,76 \text{ d}^{-1}$  war annähernd identisch zu der von Braun und Gottschalk (1982) angegebenen Wachstumsrate ( $1,66 \text{ d}^{-1}$ ), was die Eignung der festgelegten Standardkultivierungsbedingungen für die autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* im Rührkesselreaktor beweist.

Mit einer Endkonzentration von  $21,9 \text{ g L}^{-1}$  wurde Acetat als Hauptprodukt identifiziert. Die Korrelation der maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate und der maximalen Gasaufnahmeraten stützt die Beobachtung, dass Acetat das Hauptprodukt der autotrophen Satzkultivierung von *A. wieringae* ist. Zudem entspricht das 2:1 Verhältnis der Wasserstoffaufnahme zur Kohlenstoffdioxidaufnahmerate dem stöchiometrischen Verhältnis der Acetatproduktion aus eben diesen Substraten (Ragsdale und Pierce 2008). Neben Acetat wurde in dem oben gezeigten Satzversuch auch die Bildung von Formiat und Ethanol detektiert. Da bis dato lediglich Acetat als Produkt der autotrophen Satzkultivierung von *A. wieringae* beschrieben wurde (Braun und Gottschalk 1982), muss das autotrophe Produktspektrum von *A. wieringae* auf Grund des gezeigten Satzprozesses um Formiat und Ethanol erweitert werden. Eine Produktion von weiteren, nicht detektierten Produkten kann anhand der geschlossenen Kohlenstoffbilanz ausgeschlossen werden. Das starke Absinken der Biotrockenmassenkonzentration ab Tag 3 der Satzkultivierung deutet auf eine Störung des autotrophen Stoffwechsels von *A. wieringae* hin. Wird zusätzlich die simultane Bildung von Formiat und die

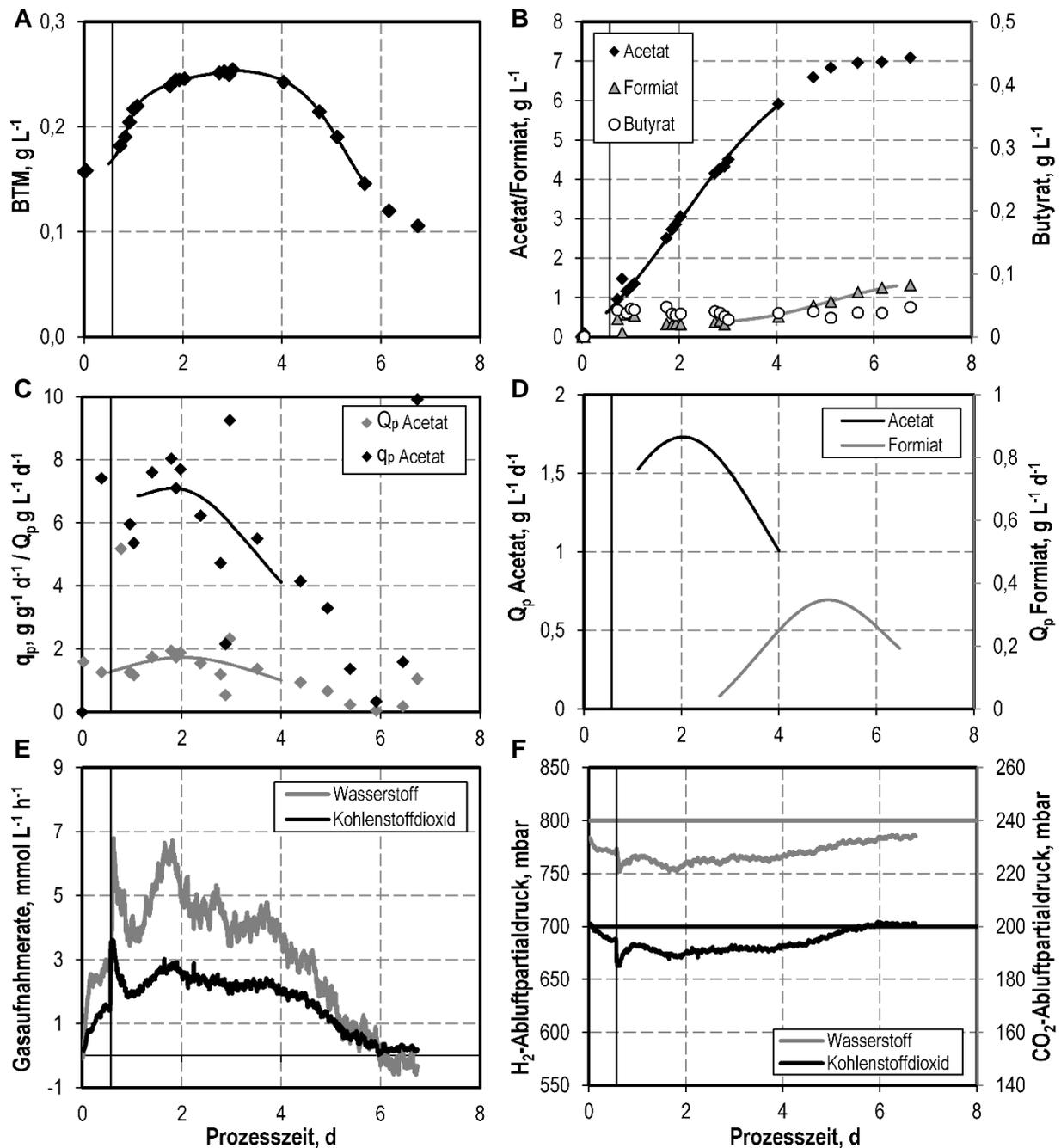
Stagnation der Acetatbildung mit beachtet, so kann auf einen Mangel an ATP geschlossen werden. Für die Umsetzung des Intermediates Formiat im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg wird Energie benötigt, ist zu wenig ATP vorhanden kommt es folglich zu einer Akkumulation von Formiat und einer Unterbrechung des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs und somit zu einem Abbruch der Acetatbildung (Peters et al. 1999).

#### 5.3.4 *Blautia hydrogenotrophica*

*B. hydrogenotrophica* ist ein gram-positiver Kokko-Bacillus dessen Fähigkeit zur Nutzung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als Substrate 1996 von Bernalier et al. nachgewiesen wurde. Bis dato wurde *B. hydrogenotrophica* lediglich in Anaerobflaschen kultiviert. Abbildung 5.8 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit etablierte autotrophe Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor.

Die maximale Wachstumsrate von  $0,64 \text{ d}^{-1}$  wurde kurze Zeit nach der automatisierten Erhöhung der Rührerdrehzahl (0,57 Tagen) beobachtet. Nach etwa 3 Tagen kam es bei einer maximalen Konzentration von  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  zu einer Stagnation der Biomassezunahme und anschließenden bis zum Ende des Satzprozesses zu einer kontinuierlichen Abnahme. Bis zum Ende des Satzversuchs sank die Biomassekonzentration auf  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  und lag damit unter der Konzentration nach der Inokulation.

Acetat, Formiat und Butyrat wurden als Produkte der autotrophen Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* identifiziert. Abbildung 5.8 C zeigt die gute Vergleichbarkeit der Daten für die zellspezifische und volumetrische Acetatbildung die zum einen anhand der offline gemessenen Konzentrationen und zum anderen anhand der nicht linearen Interpolation der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentration berechnet wurden. Die maximale volumetrische Acetatbildungsrate von  $1,74 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde nach etwa 2 Tagen beobachtet und korrelierte mit dem Zeitpunkt an dem die maximale Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidaufnahmerate von  $6,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $2,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht wurde. Die höchste Formiatbildungsrate wurde erst während der Abnahme der Biotrockenmassekonzentration beobachtet. Am Ende des Satzprozesses wurde eine Formiatkonzentration von  $1,3 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. In der Anfangsphase der Satzkultivierung, bei einer Rührerdrehzahl von 200 rpm, wurden zudem geringe Mengen an Butyrat gebildet ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ). Mit der Erhöhung der Rührerdrehzahl kam es zu einer Stagnation der Butyratbildung. Über den gesamten Zeitraum der autotrophen Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* wurden 278,1 mmol Kohlenstoff in Biomasse und Produkten fixiert. Die anhand dieses Wertes und der Gasaufnahmearten berechnete integrale Kohlenstoffbilanz, war zu 102,5 % geschlossen.



**Abbildung 5.8:** Autotrophe Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 37°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Butyratkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

## Diskussion

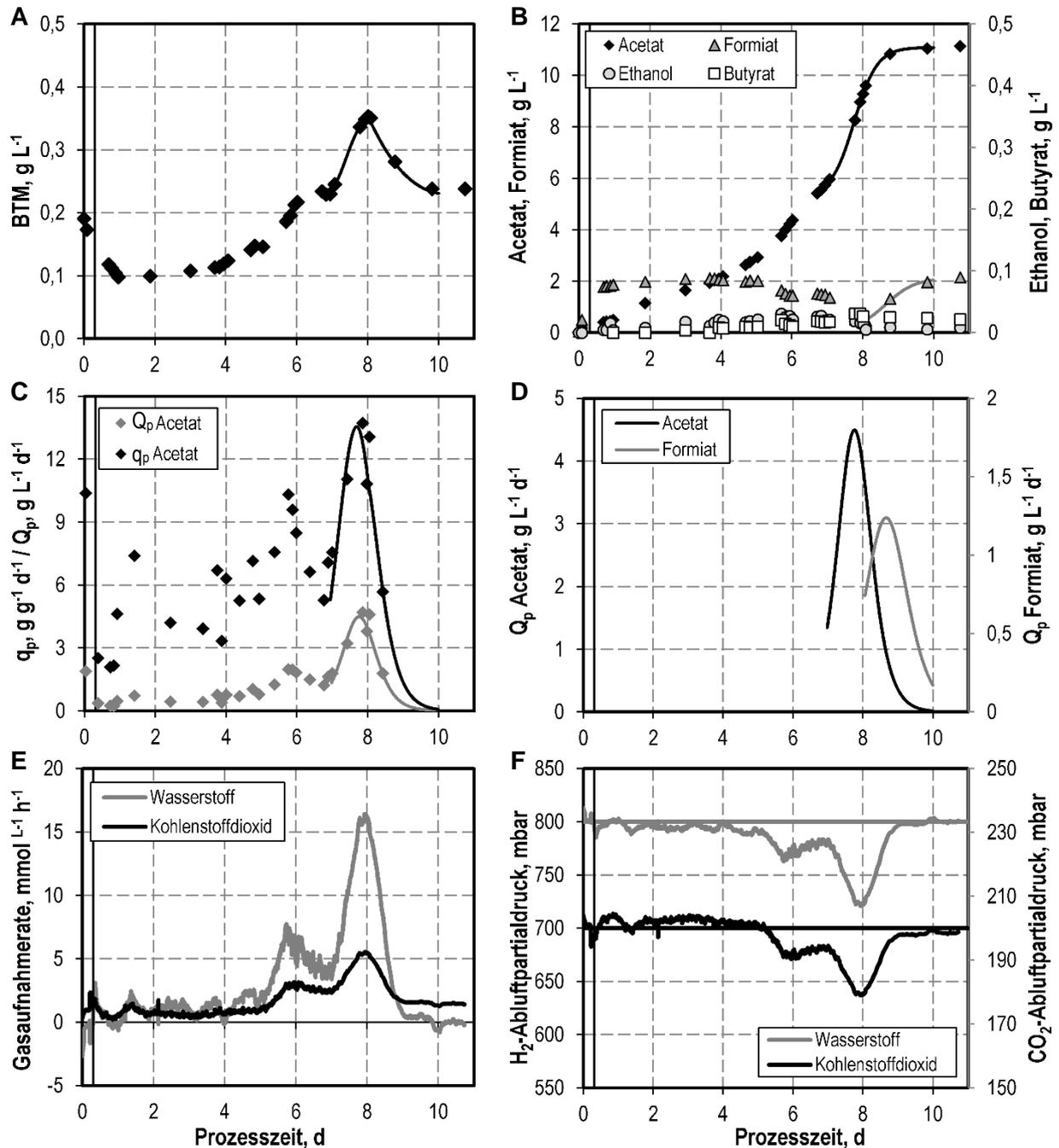
Die dargestellten Ergebnisse zeigen die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung. Die maximale beobachtete Wachstumsrate von  $0,64 \text{ d}^{-1}$  ist vergleichbar mit der von Bernalier et al. (1996) detektierten Wachstumsrate von  $0,63 \text{ d}^{-1}$  und bestätigt die Eignung der festgelegten Standardkultivierungsbedingungen für die autotrophe Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* im Rührkesselreaktor. Die starke Abnahme der Biotrockenmassekonzentration am Ende der Satzkultivierung deutet auf einen Störung des autotrophen Stoffwechsels von *B. hydrogenotrophica* hin. Die zusätzliche Bildung von Formiat und die Stagnation der Acetatbildung während der Abnahme der Biomasse lässt auf einen Mangel an ATP schließen, da für die weitere Umsetzung dieses Intermediates Formiat im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg Energie benötigt wird. Ist zu wenig ATP vorhanden kommt es zu einer Akkumulation von Formiat und einem Abbruch der Acetatbildung (Peters et al. 1999).

Im Gegensatz zu Literaturangaben, welche Acetat als einziges Produkt der autotrophen Satzkultivierung von *B. hydrogenotrophica* beschreiben (Bernalier et al. 1996), wurde in dem oben dargestellten Satzversuch zusätzlich die Bildung von Formiat und Butyrat beobachtet, weshalb das autotrophe Produktspektrum von *B. hydrogenotrophica* erweitert werden muss. Die geschlossene Kohlenstoffbilanz bestätigt die Identifizierung und korrekte Konzentrationsbestimmung aller gebildeten Produkte.

### 5.3.5 *Clostridium magnum*

*C. magnum* ist ein sporenbildendes Bakterium, bei dem die Gramfärbung trotz einer fehlenden gram-negativen Zellwand, ein gram-negatives Ergebnis zeigte (Schink 1984). Die Fähigkeit zur Nutzung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als alleinige Substrate für Wachstum und Produktbildung wurde 1991 von Bomar et al. nachgewiesen. In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse einer autotrophen Satzkultivierung von *C. magnum* in einem 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardkultivierungsbedingungen dargestellt.

Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl erfolgte bereits nach 0,31 Tagen und wurde durch die anfänglich starke Produktion von Formiat initiiert. Nach der Drehzahlerhöhung blieb die Formiatkonzentration konstant bei etwa  $2 \text{ g L}^{-1}$ , während die Acetatkonzentration leicht anstieg. Formiat wurde ab Tag 5 bis zum Erreichen der maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate von  $4,45 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Tag 8) wieder verstoffwechselt. Mit dem Absinken der Acetatbildung folgte ein erneuter Anstieg der Formiatproduktion bis zu einer Konzentration von erneut  $2 \text{ g L}^{-1}$ .



**Abbildung 5.9:** Autotrophe Satzkultivierung von *C. magnum* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat-, Ethanol- und Butyratkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

Die maximale Biotrockenmassekonzentration von  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  wurde wie die maximale Gasaufnahme- und Acetatbildungsrate ebenfalls nach 8 Tagen erreicht. Anschließend erfolgte während der Bildung von Formiat eine starke Abnahme der Biotrockenmassekonzentration. Die höchste Wachstumsrate von  $0,53 \text{ d}^{-1}$  wurde an Tag 7 beobachtet. Neben Acetat und Formiat wurden auch geringe Mengen an Ethanol und Butyrat gebildet. Ethanol wurde innerhalb der ersten 7 Tage bis zu einer Konzentration von  $0,03 \text{ g L}^{-1}$  produziert und anschließend teilweise wieder verstoffwechselt. Die Bildung von Butyrat wurde erst nach 3 Tagen beobachtet und erreichte eine maximale Konzentration von  $0,025 \text{ g L}^{-1}$  an Tag 8. Die integrale Kohlenstoffbilanz war zu 97,8 % geschlossen

## Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse belegen die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *C. magnum* in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung. Im Gegensatz zu Literaturangaben (Bomar et al. 1991) wurde in diesem Satzversuch neben Acetat auch die autotrophe Bildung von Formiat, Ethanol und Butyrat durch *C. magnum* nachgewiesen. Die geschlossene Kohlenstoffbilanz bestätigt die korrekte Detektion aller gebildeten Produkte. Der Wellenförmige Verlauf der Biomasse- und Acetatkonzentration, der sich auch deutlich in den Gasaufnahmezeiten widerspiegelt, wurde bis jetzt noch bei keinem anderen acetogenen Mikroorganismus detektiert, wurde aber innerhalb einer weiteren autotrophen Satzkultivierung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Der Einbruch der Biomasse- und Produktbildung, sowie der Gasaufnahmezeiten zwischen 6 und 7 Tagen deutet auf eine vorübergehende Limitierung des autotrophen Stoffwechsels von *C. magnum* hin. Da alle Produkte und Intermediate betroffen sind, könnte es sich um eine Limitierung der Reduktionsäquivalente handeln, welche durch NADH oder Ferredoxin bereitgestellt werden und bei verschiedenen Reaktionen im gesamten Acetyl-CoA-Stoffwechselweg benötigt werden (Ragsdale und Wood 2008). Der Mangel an Reduktionsäquivalenten bedeutet folglich, dass die Konzentrationsverhältnisse von oxidiertem zu reduziertem NADH und Ferredoxin gestört sind. Da die Energiegewinnung bei Acetogenen durch einen komplexen Ablauf von verschiedenen Elektronenübertragungen bewerkstelligt wird, führt diese Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse zwangsläufig zudem zu einer Störung der Energiegewinnung und damit zu einer geringeren Verfügbarkeit von ATP (Schuchmann und Müller 2014). Durch einen Mangel an ATP kann wiederum die abrupte Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und die Stagnation der Acetatbildung bei gleichzeitiger Akkumulation von Formiat zum Ende der Satzkultivierung erklärt werden. Steht kein ATP mehr zur Verfügung, kann Formiat nicht zu Formyl-THF umgesetzt werden (vergleiche Kapitel 3.1.2) wodurch es zu einem Abbruch des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs und einer Akkumulation von Formiat kommt. Da auch der Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr aufrechterhalten werden kann, erfolgt zudem eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration.

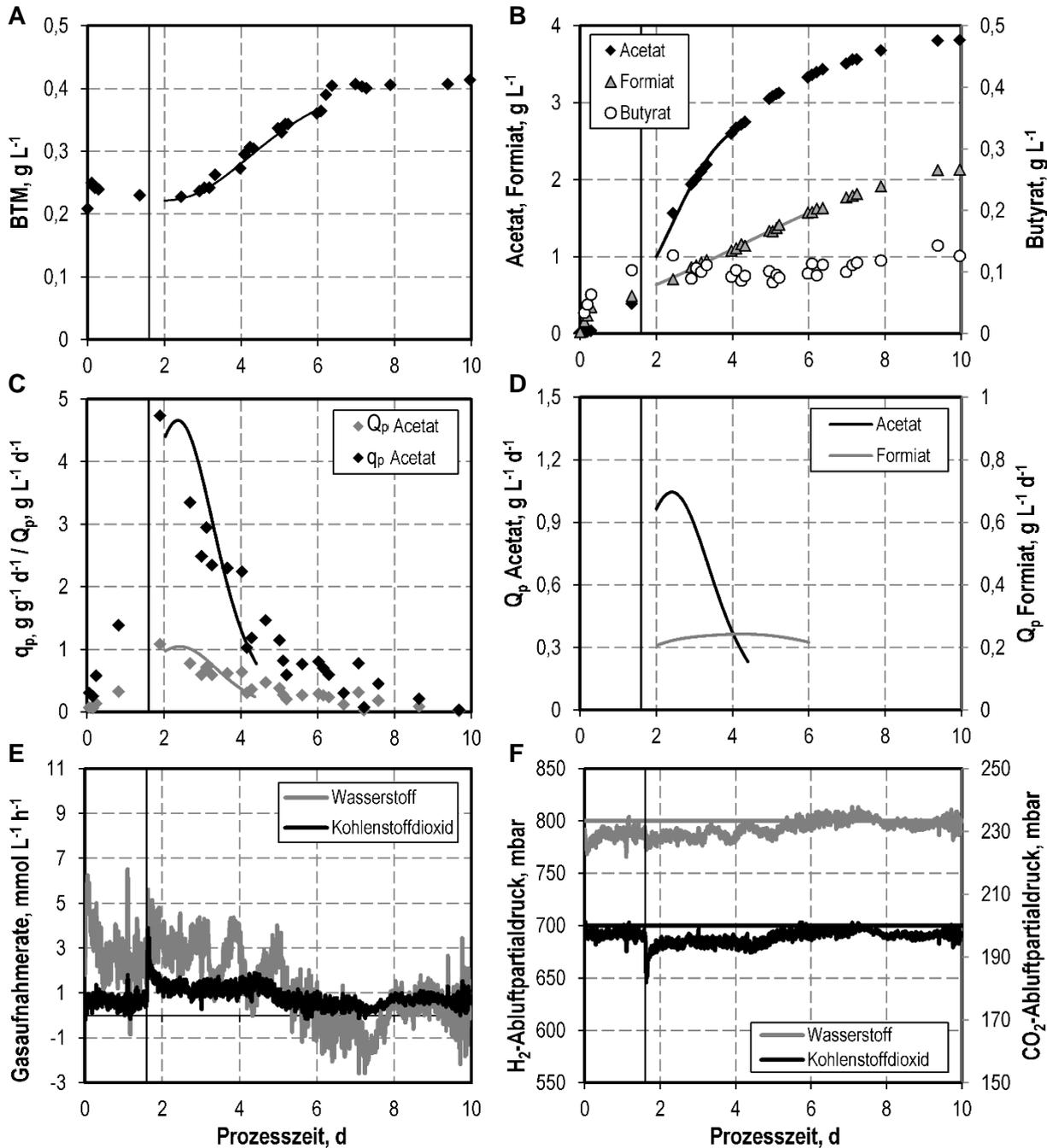
### 5.3.6 *Eubacterium aggregans*

Die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung des gram-positiven und nicht Sporen bildenden acetogenen Bakteriums *E. aggregans* sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Die Fähigkeit dieses Bakterium zur Nutzung von  $H_2$  und  $CO_2$  als alleinige Energie- und Kohlenstoffquellen wurde 1998 von Mechichi et al. nachgewiesen. Innerhalb der ersten beiden Tage der Satzkultivierung konnte nahezu kein Wachstum detektiert werden. Bei einer Konzentration von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Acetat,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Formiat und  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat erfolgte die automatisierte Drehzahlerhöhung auf 600 rpm. Nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl kam es zu einem langsamen Anstieg der Wachstumsrate, wobei ein Maximum von  $0,18 \text{ d}^{-1}$  erreicht wurde. Die finale Biotrockenmassekonzentration von  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  wurde nach 6 Tagen nachgewiesen. Bis zum Ende der Satzkultivierung nach 10 Tagen wurde keine erneute Abnahme der Biomassekonzentration verzeichnet.

Formiat wurde während des gesamten Satzversuchs annähernd linear gebildet und erreichte eine maximale Konzentration von  $2,1 \text{ g L}^{-1}$ , was 55 % der maximal gemessenen Acetatkonzentration ( $3,8 \text{ g L}^{-1}$ ) entspricht. Neben Acetat und Formiat wurden auch kleine Mengen an Butyrat nachgewiesen ( $0,14 \text{ g L}^{-1}$ ), wobei die Butyratbildung hauptsächlich innerhalb der ersten 2 Tage des Versuchs erfolgte. Die integrale Kohlenstoffbilanz war zu 103,5 % geschlossen.

### Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse belegen die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *E. aggregans* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor. Die fehlende Zunahme der Biotrockenmassekonzentration innerhalb der ersten beiden Tage und die konstante Biotrockenmasse am Ende des Satzversuchs können eventuell auf die starke Neigung zur Aggregatbildung von *E. aggregans* zurückgeführt werden (Mechichi et al. 1998). Da Aggregate im Photometer zu einer anderen Absorption als einzelne Zellen führen und die Biotrockenmassekonzentration über einen Korrelationsfaktor anhand der optischen Dichte berechnet wird, kann eine Aggregatbildung folglich zu einer Verfälschung der detektierten Biotrockenmassekonzentration führen.



**Abbildung 5.10:** Autotrophe Satzkultivierung von *E. aggregans* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 37°C; pH 7,2. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Butyratkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

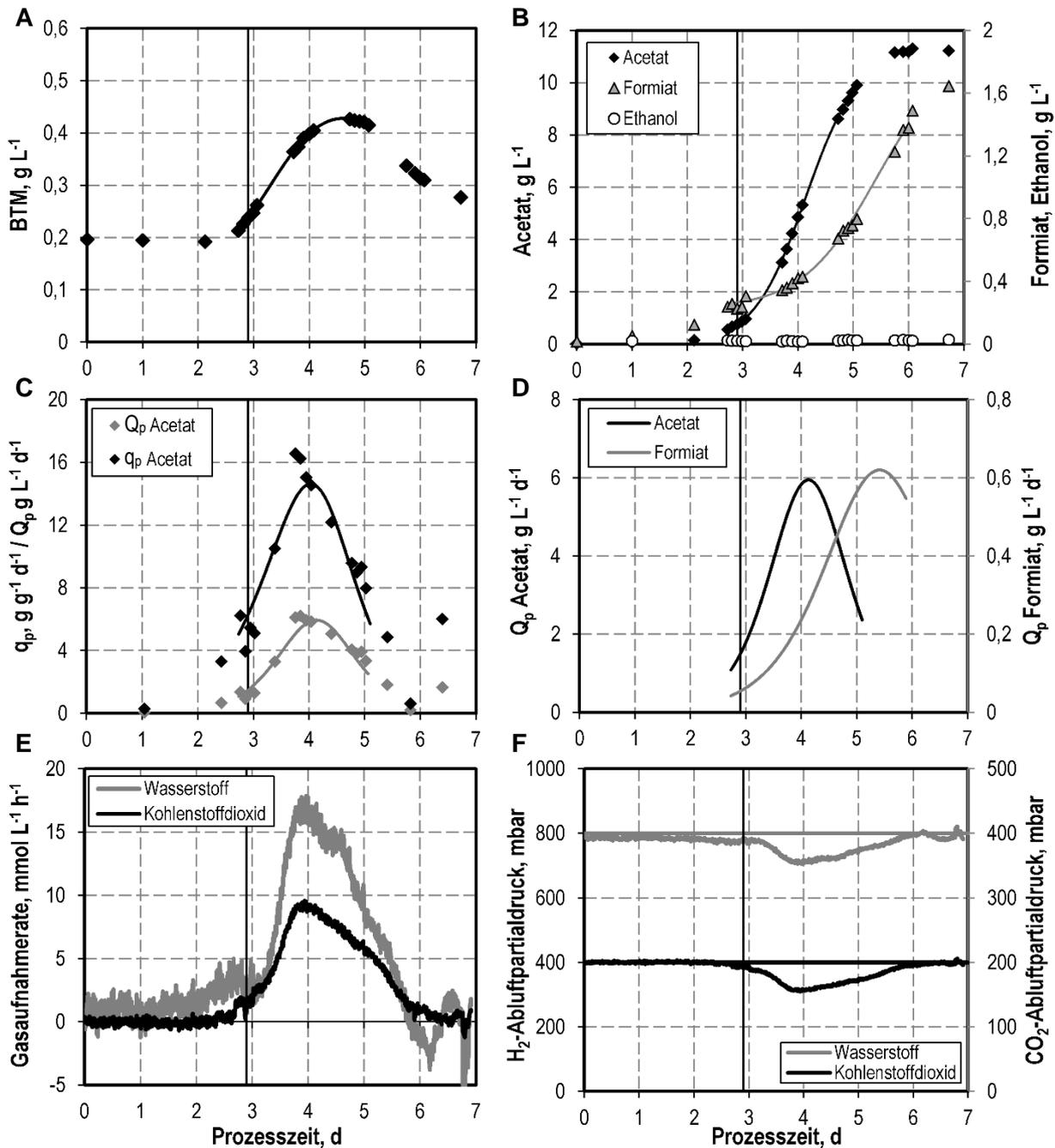
Die starke Akkumulation von Formiat mit einer maximalen Konzentration von  $2,1 \text{ g L}^{-1}$  deutet auf eine Störung des autotrophen Metabolismus beziehungsweise des Energiemetabolismus von *E. aggregans* hin. Durch diese Störung ist die weitere ATP-abhängige Umsetzung des Intermediates Formiat, welches im ersten Schritt des Methylzweigs entsteht, nur langsam möglich, weshalb es zu einer Akkumulation von Formiat kommt (Peters et al. 1999). Ein negativer Einfluss der im Rührkesselreaktor vorherrschenden Scherkräfte kann ausgeschlossen werden, da auch in Satzversuchen in Anaerobflaschen eine hohe Formiatkonzentration detektiert wurde (Daten nicht gezeigt)

Die geschlossene Kohlenstoffbilanz beweist, dass alle gebildeten Produkte detektiert wurden, wobei die autotrophe Bildung des C4-Moleküls Butyrat durch *E. aggregans* bislang noch nicht in der Literatur beschrieben war (Mechichi et al. 1998).

### 5.3.7 *Sporomusa acidovorans*

*S. acidovorans* ist ein gram-negatives und sporenbildendes Bakterium dessen Fähigkeit zur Nutzung von  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als alleinige Energie- und Kohlenstoffquellen 1985 von Ollivier et al. nachgewiesen wurde. Abbildung 5.11 zeigt die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *S. acidovorans* in einem 1 L-Rührkesselreaktor.

Innerhalb der ersten beiden Tage des Satzprozesses konnte kein Wachstum beobachtet werden. Die automatisierte Drehzahlerhöhung auf 600 rpm erfolgte erst nach 2,9 Tagen, wobei etwa zu diesem Zeitpunkt auch die maximale Wachstumsrate von  $0,59 \text{ d}^{-1}$  detektiert wurde. Unverzüglich nach der Drehzahlerhöhung erfolgte ein Anstieg der Gasaufnahme- und Produktbildungsraten. Die maximalen Gasaufnahme- und Acetatbildungsraten waren mit den maximalen Formiatbildungsraten assoziiert und wurden nach einer Prozesszeit von etwa 4 Tagen detektiert. Die maximale volumetrische Formiatbildungsrate wurde erst nach einer Prozesszeit von 5,5 Tagen beobachtet. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde im Zeitraum zwischen den beiden Produktbildungsmaxima erreicht. Acetat war das Hauptprodukt der autotrophen Satzkultivierung von *S. acidovorans*, wobei eine finale Konzentration von  $11,3 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt wurde. Formiat wurde bis zu einer maximalen Konzentration von  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  gebildet und auch die Bildung von geringen Mengen an Ethanol ( $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ) konnte nachgewiesen werden. Die integrale Kohlestoffbilanz war zu 102,4 % geschlossen.



**Abbildung 5.11:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. acidovorans* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 37°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat- und Formiatbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

## Diskussion

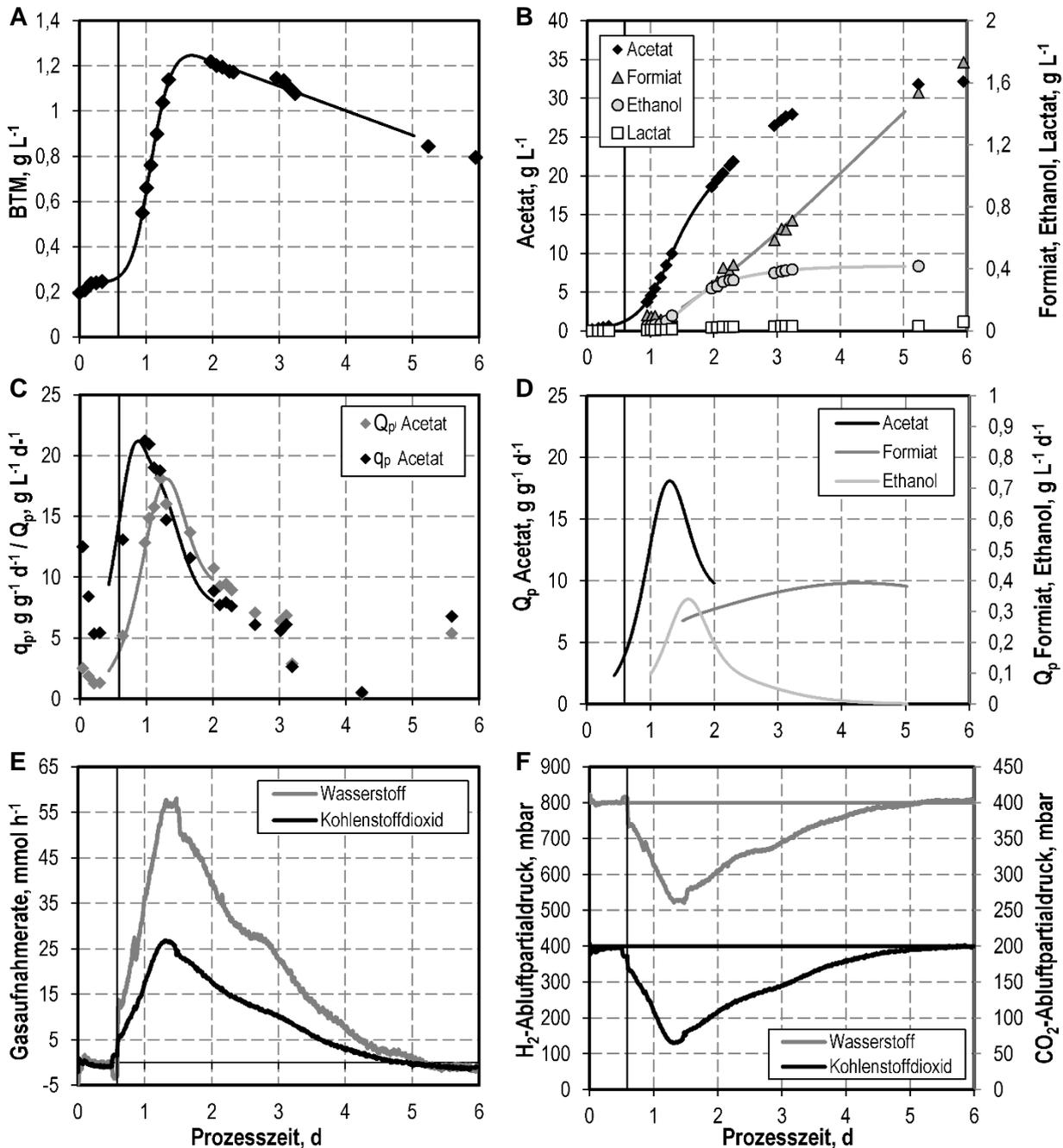
Die dargestellten Ergebnisse zeigen die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *S. acidovorans* in einem 1 L-Rührkesselreaktor. Die automatisierte Drehzahlerhöhung erfolgte erst nach 2,9 Tagen, was darauf hindeutet, dass *S. acidovorans* nur vergleichsweise langsam dazu in der Lage ist seinen Stoffwechsel von den heterotrophen Bedingungen der Vorkultur auf die autotrophen Bedingungen im Rührkesselreaktor umzustellen. Diese Beobachtung wurde auch bei autotrophen Satzkultivierungen von *S. acidovorans* in Anaerobflaschen gemacht (Daten nicht gezeigt). Der starke Anstieg der Formiatkonzentration bei einer gleichzeitigen Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und Stagnation der Acetatbildung ab 5 Tagen, lässt auf eine Störung des Energiemetabolismus von *S. acidovorans* und folglich auf einen Mangel an ATP schließen. Steht kein ATP mehr zu Verfügung kann das Zwischenprodukt Formiat nicht weiter umgesetzt werden, wodurch es zu einem Abbruch des Acetyl-CoA-Stoffwechsels und zu einer Akkumulation von Formiat kommt (Peters et al. 1999). Reicht die Energie selbst für den Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr aus, führt dies zudem zur beobachteten Abnahme der Biotrockenmassekonzentration.

In der Literatur wurde bis jetzt lediglich Acetat als Produkt der autotrophen Satzkultivierung von *S. acidovorans* nachgewiesen (Ollivier et al. 1985). Im hier gezeigten Satzversuch konnte jedoch zudem die Akkumulation von Formiat und die autotrophe Bildung von Ethanol nachgewiesen werden. Die geschlossene Kohlenstoffbilanz belegt, dass kein weiteres Produkt gebildet wurde.

### 5.3.8 *Sporomusa ovata*

Die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata*, einem gram-negativen, sporenbildenden acetogenen Bakterium in einem 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung sind in Abbildung 5.12 dargestellt. In der Anfangsphase des Satzprozesses, bei einer Drehzahl von 200 rpm, wurden lediglich geringe Wachstums- und Gasaufnahmeleistungen detektiert. Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl erfolgte nach 0,59 Tagen und führte zu einer sofortigen Erhöhung der Gasaufnahme-, Wachstums- und Acetatbildungsleistungen.

Die maximale Wachstumsrate von  $2,94 \text{ d}^{-1}$  wurde bereits kurz nach der Drehzahlerhöhung beobachtet. Die maximale volumetrische Acetatbildungsleistung korrelierte mit dem Erreichen der maximalen Gasaufnahmeleistungen und der maximalen Biomassekonzentration ( $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ) nach 1,4 Tagen. Während der restlichen Prozesszeit sank die Biotrockenmasse stetig linear ab. Die maximale volumetrische Ethanolbildungsleistung wurde etwas verzögert, nach 1,6 Tagen gemessen. Formiat wurde während des gesamten Satzversuchs mit einer annähernd konstanten Rate gebildet.



**Abbildung 5.12:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentration; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen; C) zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate; D) volumetrische Acetat-, Formiat- und Ethanolbildungsrate; Die durchgezogenen Linien in C) und D) wurden anhand der nicht linearen Interpolation der Biomasse- und Produktkonzentrationen abgeschätzt; E) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten; F) H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Abgas. Die schwarze vertikale Linie gibt jeweils den Zeitpunkt der automatisierten Drehzahlerhöhung an.

Das Hauptprodukt der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* war Acetat mit einer finalen Konzentration von  $32,2 \text{ g L}^{-1}$ , gefolgt von Formiat mit einer Konzentration von  $1,73 \text{ g L}^{-1}$  und Ethanol mit einer maximalen Konzentration von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$ . Zudem wurde während des gesamten Satzprozesses eine geringe Menge an Lactat gebildet, wobei eine Endkonzentration von  $0,06 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde. Die integrale Kohlenstoffbilanz war zu 99,9 % geschlossen.

## Diskussion

Der dargestellte Satzversuch belegt die erfolgreiche autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem Rührkesselreaktor. Der steile Anstieg der Gasaufnahme, sowie der Biomasse- und Produktbildungsraten nach der Drehzahlerhöhung deutet auf eine starke gas-flüssig Massentransportlimitierung bei der anfänglich niedrigen Drehzahl von 200 rpm hin.

Mit einer Endkonzentration von  $32,2 \text{ g L}^{-1}$  wurde Acetat als Hauptprodukt der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* identifiziert. Die Korrelation der maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate und der maximalen Gasaufnahme belegen diese Beobachtung. Zudem entspricht das 2:1 Verhältnis der Wasserstoffaufnahme zur Kohlenstoffdioxidaufnahme dem stöchiometrischen Verhältnis der Acetatproduktion aus eben diesen Substraten (Ragsdale und Pierce 2008).

Die zellspezifische Acetatbildungsrate erreichte ihren Maximalwert bereits nach etwa 1 Tag und einer zugehörigen Acetatkonzentration von etwa  $5 \text{ g L}^{-1}$  und sank anschließend kontinuierlich ab. Ab einer Konzentration von ungefähr  $12 \text{ g L}^{-1}$  Acetat konnte zudem eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und eine Akkumulation von Formiat detektiert werden. Die beschriebenen Beobachtungen lassen dabei auf eine Produktinhibierung des autotrophen Metabolismus von *S. ovata* durch Acetat schließen, was bereits auch für verschiedenen anderen acetogenen Mikroorganismen nachgewiesen wurde. So wurde beispielsweise für *A. woodii* bei der Überschreitung einer Acetatkonzentration von  $8 - 12 \text{ g L}^{-1}$  ebenfalls ein inhibierender Effekt auf die Produktbildung festgestellt (Kantzow et al. 2015). Braus-Stromeyer et al. (1997) zeigten zudem, dass die Aktivität der Carboanhydrase aus *A. woodii* bei einer zellinternen Acetatkonzentration von  $6,6 \text{ g L}^{-1}$  um 50 % erniedrigt ist. Eine Hemmung der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase und der Acetatkinase durch hohe Acetatkonzentrationen konnte bislang lediglich für *Thermoanaerobacter kivui* nachgewiesen werden (Klemps et al. 1987). Neben dem Acetation hat jedoch auch die undissoziierte Essigsäure einen inhibierenden Einfluss auf die Bakterienzellen. Für *M. thermoacetica* wurde in diesem Zusammenhang dokumentiert, dass schon eine Essigsäurekonzentration von  $2,4 - 3,0 \text{ g L}^{-1}$  zu einer vollständigen Unterdrückung des Wachstums führt (Wang und Wang 1984). Bei erhöhten Konzentrationen gelangt die undissoziierte Essigsäure durch Diffusion vermehrt ins Zellinnere. Da acetogene Bakterien den zellinternen pH in der Regel  $0,6 - 0,8 \text{ pH-Einheiten}$  alkalischer halten als den externen pH,

kommt es zur Dissoziation der Essigsäure in Acetat und Proton und dadurch zu einer Entkopplung des transmembranen Protonengradienten, was wiederum zu einer Störung des Energiestoffwechsels führt (Baronofsky et al. 1984). Auf Grund des hierdurch hervorgerufenen ATP-Mangels kann Formiat innerhalb des Acety-CoA-Stoffwechselweg nicht weiter umgesetzt werden, wodurch es, wie im Fall von *S. ovata*, zur Akkumulation und beim Erreichen einer bestimmten Konzentration zur Ausschleusung dieses Intermediates aus der Bakterienzelle kommt (Peters et al. 1999).

Neben Acetat wurde bei der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* im Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung außerdem die Bildung von Ethanol und Lactat beobachtet, wohingegen in der Literatur bis jetzt lediglich Acetat und Ethanol als Produkte der autotrophen Kultivierung von *S. ovata* beschrieben waren (Möller et al. 1984). Die geschlossene integrale Kohlenstoffbilanz belegt, dass alle gebildeten Produkte detektiert wurden.

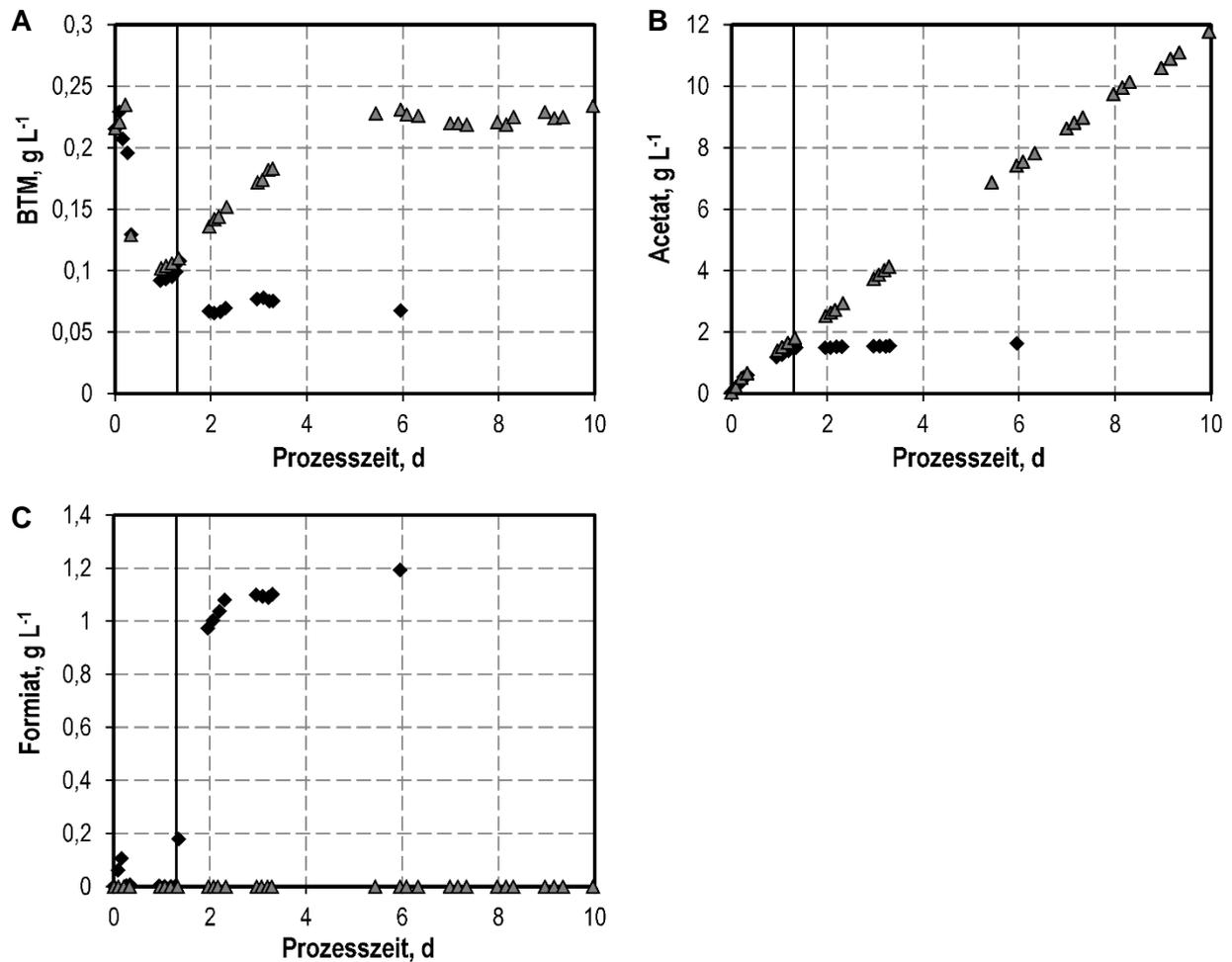
### 5.3.9 *Terrisporobacter mayombe*

*T. mayombe* ist ein gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, das 1991 von Kane et al. als *Clostridium mayombe* aus dem Darm der bodenverwertenden afrikanischen Termiten *Cubitermes speciosus* isoliert wurde. Die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *T. mayombe* in einem 1 L-Rührkesselreaktor unter den in Kapitel 5.2 festgelegten Standardbedingungen sind in Abbildung 5.13 anhand der schwarzen Rauten dargestellt.

Kurz nach der Inokulation fiel die Biotrockenmassekonzentration auf  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  ab. Ab 1 Tag konnte anschließend ein Wachstum von *T. mayombe* beobachtet werden. Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl erfolgte nach einer Prozesszeit von 1,3 d und resultierte in einem Abbruch der Acetatbildung. Des Weiteren führte die Erhöhung der Drehzahl zu einer erneuten Abnahme der Biotrockenmassekonzentration und einem starken Anstieg der Formiatbildung.

Um die Auswirkung der Drehzahlerhöhung zu detektieren wurde ein weiterer autotropher Satzprozess bei konstant 200 rpm durchgeführt (graue Dreiecke). Die anfängliche Prozessleistung war die gleiche wie im Satzversuch mit Drehzahlerhöhung. Nach 1,3 Tagen, dem Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung der Vergleichskultivierung, kam es jedoch zu Unterschieden in der Biomasse- und Produktbildung. Im Satzversuch mit konstant 200 rpm wurde eine kontinuierliche Biomassebildung bis Tag 5 beobachtet, während es im Vergleichsversuch zu einer Abnahme der Biotrockenmassekonzentration kam. In der Satzkultivierung mit konstant 200 rpm wurde zudem während des gesamten Versuchszeitraums eine lineare Acetatproduktion bis zu einer Konzentration von  $12 \text{ g L}^{-1}$  und keine Formiatbildung

detektiert. In der Vergleichskultivierung hingegen stagnierte die Acetatbildung ab dem Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung.



**Abbildung 5.13:** Autotrophe Satz Kultivierung von *T. mayombeii* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Drehzahlen. Alle anderen Bedingungen entsprachen den Standardbedingungen. Temperatur 30°C; pH 7,0. Die grauen Dreiecke (▲) stellen die Ergebnisse eines Prozesses bei konstant 200 rpm dar. Die schwarzen Rauten (◆) zeigen einen Prozess mit automatisierter Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 600 rpm, wobei die vertikale schwarze Linie jeweils den Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung anzeigt. A) Biotrockenmassekonzentration (BTM); B) Acetatkonzentration; C) Formiatkonzentration.

## Diskussion

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass *T. mayombeii* scherkraftempfindlich ist und eine autotrophe Satz Kultivierung dieses acetogenen Mikroorganismus im Rührkesselreaktor bei einem erhöhten Leistungseintrag nicht möglich ist. Eine Sensitivität gegenüber hohen Scherkräften wird auch für das nahe verwandte Acetogen *C. aceticum* (Braun 1981), sowie für andere anaerobe Mikroorganismen beschrieben (Kadic 2010; Yerushalmi und Volesky 1985). Die lineare Acetatproduktion im Satzversuch mit konstant 200 rpm muss auf eine gas-flüssig

Massentransferlimitierung im Rührkesselreaktor bei niedrigem Leistungseintrag zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der Satzkultivierung von *T. mayombei* belegen zudem auch die Wichtigkeit und den Vorteil der in Kapitel 5.2 festgelegten Standardkultivierungsbedingungen. Durch die automatisierte Drehzahlerhöhung bei  $1 \text{ g L}^{-1}$  produzierten Carbonsäuren, reicht ein Experiment aus um zu identifizieren, ob die autotrophe Satzkultivierung eines bestimmten acetogenen Mikroorganismus im Rührkesselreaktor prinzipiell möglich ist und ob die Satzkultivierung auch bei Leistungseinträgen durchgeführt werden kann, die genügend hoch sind um eine gas-flüssig Massentransportlimitierung auszuschließen.

### 5.3.10 Vergleich der untersuchten acetogenen Mikroorganismen

Die maximal erreichten Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen, sowie die Produktbildungsraten und die Gasaufnahmezeiten aller untersuchten acetogenen Mikroorganismen sind in Tabelle 5.3 vergleichend zusammengefasst.

In den Satzversuchen mit *A. fimetarium*, *E. aggregans* und *S. acidovorans* erfolgte die automatisierte Drehzahlerhöhung, die durch das Erreichen einer Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Carbonsäuren im Kulturmedium gesteuert wird, erst nach 1,9, 1,6 und 2,9 Tagen, wohingegen die Erhöhung der Rührerdrehzahl bei den Satzkultivierungen mit allen anderen acetogenen Bakterien zwischen 0,3 und 1,1 Tagen stattfand. Im Fall von *A. fimetarium* und *E. aggregans* wurde die vergleichsweise lange Dauer der ersten Kultivierungsphase durch die geringen Produktbildungsraten hervorgerufen. Im Gegensatz dazu deutet die verzögerte Drehzahlerhöhung bei der Satzkultivierung von *S. acidovorans* auf eine nur langsam stattfindende Umstellung des Stoffwechsels von heterotrophen auf autotrophe Bedingungen hin.

Durch die Erhöhung des Leistungseintrags während der Satzkultivierungen wurde für *A. fimetarium* und *T. mayombei* eine Sensitivität gegenüber hohen Scherkräften sichtbar. Während die Erhöhung der Rührerdrehzahl bei *A. fimetarium* lediglich eine Erniedrigung der Biotrockenmasse- und Produktbildungsrate nach sich zog, führte sie bei *T. mayombei* zu einem vollständigen Abbruch des autotrophen Metabolismus. *A. wieringae*, *B. hydrogenotrophica*, *C. magnum*, *E. aggregans*, *S. acidovorans* und *S. ovata* hingegen waren unempfindlich gegenüber hohen Scherkräften.

Sollen bei autotrophen Satzprozessen hohe volumetrische Produktbildungsraten erreicht werden, sind hohe Wachstumsraten und Biomassekonzentrationen unumgänglich. *A. wieringae* und *S. ovata* zeigten bei weitem die höchsten Wachstumsraten und auch die höchsten maximalen Biotrockenmassekonzentrationen innerhalb der untersuchten Acetogenen. Die

maximale Wachstumsrate von *S. ovata* war dabei sogar 1,5 mal höher als die Wachstumsrate, welche für den Referenzstamm *A. woodii* detektiert wurde. Die maximalen Biotrockenmassenkonzentrationen von *A. wieringae* und *S. ovata* waren  $1,36 \text{ g L}^{-1}$  und  $1,25 \text{ g L}^{-1}$  und damit höher als die von *A. woodii*.

Das Hauptprodukt aller bis dato isolierter acetogener Mikroorganismen ist Acetat (Drake et al. 2008). Die höchste volumetrische ( $17,96 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und zellspezifische Acetatbildungsrate ( $21,03 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) der hier untersuchten Bakterienstämme wurde jeweils während der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* beobachtet. Beide Acetatbildungsraten waren in der gleichen Größenordnung wie die des Referenzstamms *A. woodii* ( $20,37 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und  $24,52 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). *A. wieringae*, *C. magnum* und *S. acidovorans* zeigten sehr ähnliche zellspezifische Acetatbildungsraten mit Werten um  $14 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Auf Grund der höheren maximalen Biotrockenmassenkonzentration von *A. wieringae*, waren die detektierte volumetrische Acetatbildungsrate und die finale Acetatkonzentration dieses Bakterienstamms im Vergleich zu *C. magnum* und *S. acidovorans* jedoch sehr viel höher. In allen autotrophen Satzprozessen, außer denen mit *A. fimetarium* und *E. aggregans*, wurden 85 % – 95 % des während des gesamten Versuchs fixierten Kohlenstoffs im Hauptprodukt Acetat wiedergefunden. Daher ist es nur logisch, dass eine Anordnung der untersuchten acetogenen Mikroorganismen von der höchsten zu niedrigsten maximal detektierten Acetatkonzentration die gleiche Abfolge ergibt wie eine Anordnung gemäß der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff oder der höchsten maximalen Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten: *A. woodii* > *S. ovata* > *A. wieringae* > *S. acidovorans* > *C. magnum* > *B. hydrogenotrophica* > *E. aggregans* > *A. fimetarium*.

In allen durchgeführten autotrophen Satzexperimenten wurde die Akkumulation von mindestens  $1 \text{ g L}^{-1}$  Formiat beobachtet, wobei in der Satzkultivierung von *A. wieringae* mit  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Formiatkonzentration detektiert wurde. *A. fimetarium* produzierte mit  $2,04 \text{ g L}^{-1}$  als einziger Stamm etwas mehr Formiat als Acetat ( $1,9 \text{ g L}^{-1}$ ).

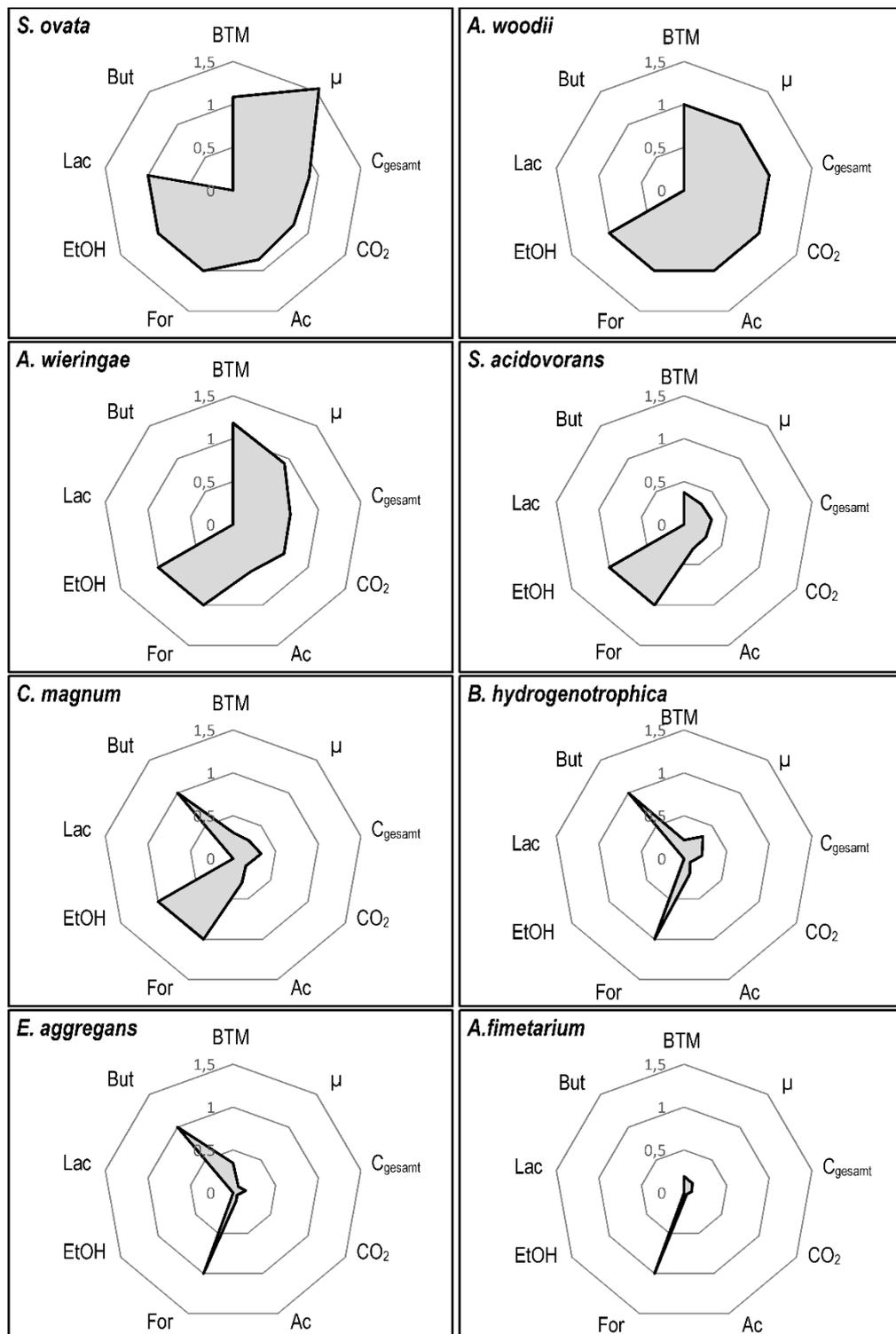
Geringe Mengen an Ethanol wurden von 4 der untersuchten acetogenen Bakterien (*A. wieringae*, *C. magnum*, *S. acidovorans* und *S. ovata*) und auch vom Referenzstamm *A. woodii* gebildet. *S. ovata* produzierte dabei mit  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Ethanolkonzentration.

Butyrat wurde in geringen Mengen von 3 der untersuchten Bakterien gebildet. (*C. magnum*, *B. hydrogenotrophica* und *E. aggregans*). *E. aggregans* produzierte dabei mit  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Butyratkonzentration.

Eine autotrophe Bildung von Lactat ( $0,06 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde lediglich für *S. ovata* nachgewiesen.

**Tabelle 5.3:** Maximale Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen, sowie Produktbildungsraten, Gasaufnahme- und Kohlenstoffbilanzen der autotrophen Satzkultivierung verschiedener acetogener Mikroorganismen in einem kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die höchsten Werte der wichtigsten Parameter sind dabei fett hervorgehoben.

		Einheit	A. <i>woodii</i>	A. <i>fimetarium</i>	A. <i>wieringae</i>	B. <i>hydrogenotrophica</i>	C. <i>magnum</i>	E. <i>aggregans</i>	S. <i>acidovorans</i>	S. <i>ovata</i>
<b>Drehzahlerhöhung</b>		<b>d</b>	0,85	1,85	1,1	0,57	0,31	1,6	2,9	0,59
<b>BTM</b>	<b>C<sub>BTM,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	1,15	0,22	<b>1,36</b>	0,25	0,35	0,4	0,43	1,25
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	47,9	9,2	56,7	10,4	14,6	16,6	17,9	52,1
	<b>μ<sub>max</sub></b>	<b>d<sup>-1</sup></b>	1,90	0,28	1,76	0,64	0,53	0,18	0,59	<b>2,94</b>
<b>Acetat</b>	<b>C<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	37,4	1,9	21,9	7,1	11,2	3,8	11,3	<b>32,2</b>
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	1243,3	63,3	729,4	236,7	373,3	126,7	376,6	1073,3
	<b>Q<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	20,37	0,22	13,51	1,74	4,45	1,03	5,87	<b>17,96</b>
	<b>q<sub>p,max</sub></b>	<b>g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	24,52	1,04	15,13	7,1	13,5	4,6	14,56	<b>21,03</b>
<b>Formiat</b>	<b>C<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	1,12	2,04	<b>4,8</b>	1,32	2,15	2,1	1,4	1,73
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	24,3	44,3	104,3	28,7	46,7	45,6	30,4	37,6
	<b>Q<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	1,01	0,35	<b>3,37</b>	2,09	1,24	0,24	0,41	0,39
	<b>q<sub>p,max</sub></b>	<b>g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	0,90	2,33	4,33	1,66	<b>4,36</b>	1,00	0,98	0,43
<b>Ethanol</b>	<b>C<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	0,17	-	0,03	-	0,03	-	0,03	<b>0,42</b>
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	7,4	-	0,7	-	0,7	-	0,7	18,3
	<b>Q<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,34</b>
	<b>q<sub>p,max</sub></b>	<b>g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,28</b>
<b>Butyrat</b>	<b>C<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	-	-	-	0,05	0,025	<b>0,14</b>	-	-
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	-	-	-	2,3	1,1	6,4	-	-
<b>Lactat</b>	<b>C<sub>p,max</sub></b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,06</b>
	<b>C<sub>Kohlenstoff</sub></b>	<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>1,3</b>
<b>c<sub>Kohlenstoff</sub> (Produkt+BTM)</b>		<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	1322,9	116,8	891,1	278,1	436,4	195,3	425,6	1182,6
<b>Gasaufnahme- merate<sub>max</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>mmol L h<sup>-1</sup></b>	32,5	1,1	22,1	2,7	5,5	1,7	9,5	26,3
	<b>H<sub>2</sub></b>	<b>mmol L h<sup>-1</sup></b>	67,7	2,5	42,5	6,4	16,2	4,6	17,5	57,9
<b>C-Bilanz</b>		<b>%</b>	98,2	102,7	101,8	102,5	97,8	103,5	102,4	99,9



**Abbildung 5.14:** Graphische Darstellung der autotrophen Prozessleistung der untersuchten acetogenen Bakterien. Je größer die aufgespannte Fläche ist, desto höher ist die autotrophe Prozessleistung. Aufgetragen sind die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen (BTM), die maximalen Wachstumsraten ( $\mu$ ), die Mengen an gesamt fixiertem Kohlenstoff ( $C_{gesamt}$ ), die maximalen  $CO_2$ -Aufnahmeraten und die maximale Acetatkonzentration (Ac), wobei die Werte dieser Parameter für *A. woodii* auf 1 normiert wurden. Die Werte der anderen Bakterienstämme wurden dementsprechend kalkuliert. Zudem sind die Produkte Formiat (For), Ethanol (EtOH), Lactat (Lac) und Butyrat (But) aufgetragen, wobei deren Detektion stets mit 1 bewertet wurde. Waren die Produkte nicht vorhanden wurden die Parameter mit 0 bewertet.

In Abbildung 5.14 ist die autotrophe Prozessleistung der einzelnen acetogenen Bakterien anhand von ausgewählten Prozessparametern graphisch in Netzdiagrammen dargestellt, wobei gilt, je größer die aufgespannte Fläche des Diagramms ist, desto größer ist auch die autotrophe Prozessleistung des zugehörigen Bakteriums. Eine Anordnung von der größten aufgespannten Fläche zur kleinsten und damit eine Anordnung der zugehörigen Bakterienstämme von der höchsten autotrophen Prozessleistung zur geringsten autotrophen Prozessleistung ergibt dabei folgende Aufreihung: *S. ovata* > *A. woodii* > *A. wieringae* > *S. acidovorans* > *C. magnum* > *B. hydrogenotrophica* > *E. aggregans* > *A. fimetarium*.

## Diskussion

Der Vergleich der untersuchten acetogenen Mikroorganismen zeigt *S. ovata* als Bakterium mit der besten autotrophen Prozessleistung (vergleiche Tabelle 5.3 und Abbildung 5.14). Die hohe Wachstumsrate und maximal detektierte Biotrockenmassekonzentration ( $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ), welche deutlich höher ist als beispielsweise die maximal erreichten Biotrockenmassekonzentrationen mit *C. aceticum* oder *C. ragsdalei* (Kundiyana et al. 2011; Sim et al. 2007) sind wichtige Voraussetzungen um hohe volumetrische Produktbildungsraten zu erreichen. Die maximal detektierte volumetrische und zellspezifische Acetatbildungsrate von *S. ovata* liegen in der gleichen Größenordnung wie die von *A. woodii*, dem acetogenen Bakterium mit der bis dato höchsten beschriebenen Acetatbildungsleistung (Daniell et al. 2012). Neben dem C2-Molekül Acetat ( $32,2 \text{ g L}^{-1}$ ) ist *S. ovata* zudem fähig Ethanol zu bilden ( $0,42 \text{ g L}^{-1}$ ), was dieses acetogene Bakterium für eine industrielle Anwendung interessant macht, da Ethanol als Biokraftstoff und Kraftstoffzusatz verwendet wird. In der Literatur wird für *C. ragsdalei* beispielsweise eine Ethanolkonzentration von  $6,1 \text{ g L}^{-1}$  während der autotrophen Satzkultivierung in einem Rührkesselreaktor mit  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{CO}$  als Substrate beschrieben (Maddipati et al. 2011). Im Vergleich dazu sind die, in dem gezeigten Satzversuch mit *S. ovata* produzierte Ethanolkonzentration verhältnismäßig gering, jedoch kann die Ethanolproduktion von acetogenen Bakterien durch die Optimierung beispielsweise des Fermentations-pH oder auch der Spurenelementkonzentrationen deutlich gesteigert werden (Kundiyana et al. 2011; Saxena und Tanner 2011). Neben Acetat und Ethanol wurde in der durchgeführten autotrophen Satzkultivierung mit *S. ovata* zudem die Bildung von geringen Mengen des C3-Moleküls Lactat detektiert. Bis dato wurde die autotrophe Bildung von Lactat lediglich mit 3 Acetogenen der Gattung *Clostridium* beschrieben (Köpke et al. 2011b). Neben der beschriebenen hohen autotrophen Prozessleistung bietet *S. ovata* als einziges der untersuchten acetogenen Bakterien zusätzlich den Vorteil eines sequenzierten Genoms. Diese Tatsache macht *S. ovata* zusätzlich zu einem attraktiven Organismus für die Anwendung molekularbiologischer Methoden

und Methoden der synthetischen Biologie um auch nicht natürliche C<sub>2</sub>- und C<sub>4</sub>-Moleküle herstellen zu können. Für *S. acidovorans* wurde ebenfalls eine hohe zellspezifische Acetatbildungsrate (14,56 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) und die Produktion von Ethanol detektiert, weshalb man davon ausgehen kann, dass *Sporomusa* eine vielversprechende Gattung für die Identifizierung von acetogenen Bakterienstämmen mit hohen autotrophen Prozessleistungen ist.

Für *A. wieringae* wurde eine zellspezifische Acetatbildungsrate von 15,13 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> und für *A. woodii* von 24,52 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> beobachtet. Neben diesen hohen Acetatbildungsleistungen wurden für beide Stämme außerdem hohe Wachstumsraten und die Bildung von Ethanol nachgewiesen, was auch bei *Acetobacterium* auf eine vielversprechende Gattung zur Identifizierung von Acetogenen mit hoher autotropher Prozessleistung hindeutet. Im Gegensatz dazu wurde jedoch bei der autotrophen Satzkultivierung von *A. fimetarium* lediglich eine sehr geringe Biomasse- und Produktbildung festgestellt, weshalb anhand der durchgeführten Versuche keine allgemeingültige Aussage über die Gattung *Acetobacterium* getroffen werden kann.

Für *C. magnum* wurde das gleiche autotrophe Produktspektrum wie für die nahe verwandten *C. drakei* und *C. scatologenes* (Gössner et al. 2008; Küsel et al. 2000; Liou et al. 2005) nachgewiesen, was auf einen sehr konservierten Metabolismus innerhalb der Gattung *Clostridium* hindeutet. Die natürliche Bildung von C<sub>4</sub>-Molekülen macht diese Gattung interessant für eine industrielle Anwendung, besonders wenn molekularbiologische Methoden und Methoden der synthetischen Biologie angewandt werden um nicht natürliche C<sub>4</sub>-Moleküle herzustellen. Innerhalb des phylogenetischen Stammbaums ist die Gattung *Clostridium* jedoch in zwei Zweige aufgeteilt. Der zweite Zweig beinhaltet die Stämmen *C. aceticum*, *A. noterae*, *C. glycolicum* und *T. mayombeii*, wobei eine autotrophe Produktion von C<sub>4</sub>-Molekülen bis jetzt für keines dieser acetogenen Bakterien nachgewiesen wurde. Für *C. aceticum* wurde jedoch, wie bei *T. mayombeii*, eine Sensitivität gegenüber hohen Scherkräften beobachtet (Braun 1981).

*E. aggregans* zeigte eine relativ geringe Biomasse- und Acetatbildung, wies jedoch das gleiche autotrophe Produktspektrum wie *E. limosum* auf (Jeong et al. 2015) und bildete die höchste Butyratkonzentration (0,14 g L<sup>-1</sup>) innerhalb der untersuchten Acetogenen. Im Vergleich zu Literaturdaten ist diese Butyratkonzentration jedoch niedrig. Die maximal detektierten Butyratkonzentrationen für *C. carboxidivorans* und *B. methylotrophicum* beispielsweise betragen 0,45 g L<sup>-1</sup> und 1,48 g L<sup>-1</sup> (Grethlein et al. 1991; Ramió-Pujol et al. 2014).

Mit *B. hydrogentorophica* wurde zum ersten Mal die autotrophe Bildung von Butyrat innerhalb der Gattung *Blautia* nachgewiesen, wobei diese Gattung und die acetogene Bakterienstämme des zugehörigen Zweiges des phylogenetischen Stammbaums bis jetzt nur sehr wenig untersucht wurden.

Bei allen untersuchten acetogenen Bakterienstämmen wurden mehr autotrophe Produkte detektiert, als bis dato in der Literatur beschrieben waren (vergleiche Tabelle 5.4).

**Tabelle 5.4:** Auflistung aller erstmalig identifizierten Stoffwechselprodukte der autotrophen Satzkultivierung verschiedener acetogener Mikroorganismen im 1 L- Rührkesselreaktor.

<b>Erstmalig identifizierte Produkte</b>	
<b><i>A. fimetarium</i></b>	Formiat
<b><i>A. wieringae</i></b>	Formiat, Ethanol
<b><i>A. woodii</i></b>	Ethanol
<b><i>B. hydrogenotrophica</i></b>	Formiat, Butyrat
<b><i>C. magnum</i></b>	Formiat, Ethanol, Butyrat
<b><i>E. aggregans</i></b>	Formiat, Butyrat
<b><i>S. acidovorans</i></b>	Formiat, Ethanol
<b><i>S. ovata</i></b>	Formiat, Lactat

Die in der Literatur angegebenen Daten zur Produktbildung wurden alle anhand von Satzversuchen in Anaerobflaschen bestimmt. In solchen Versuchen steht den Bakterien lediglich das Gas im Kopfraum der Anaerobflaschen als Substrat zur Verfügung, weshalb man davon ausgehen kann, dass stets eine Substratlimitierung auftritt. In den, in diesem Kapitel beschriebenen Satzkultivierungen erfolgte hingegen eine kontinuierliche Versorgung der acetogenen Mikroorganismen mit gasförmigen Substraten  $H_2$  und  $CO_2$ . Da in diesen Satzversuchen folglich keine Substratlimitierung auftrat, konnte ein erweitertes Produktspektrum nachgewiesen werden.

## 6 Autotrophe Satzkultivierungen in definiertem Medium

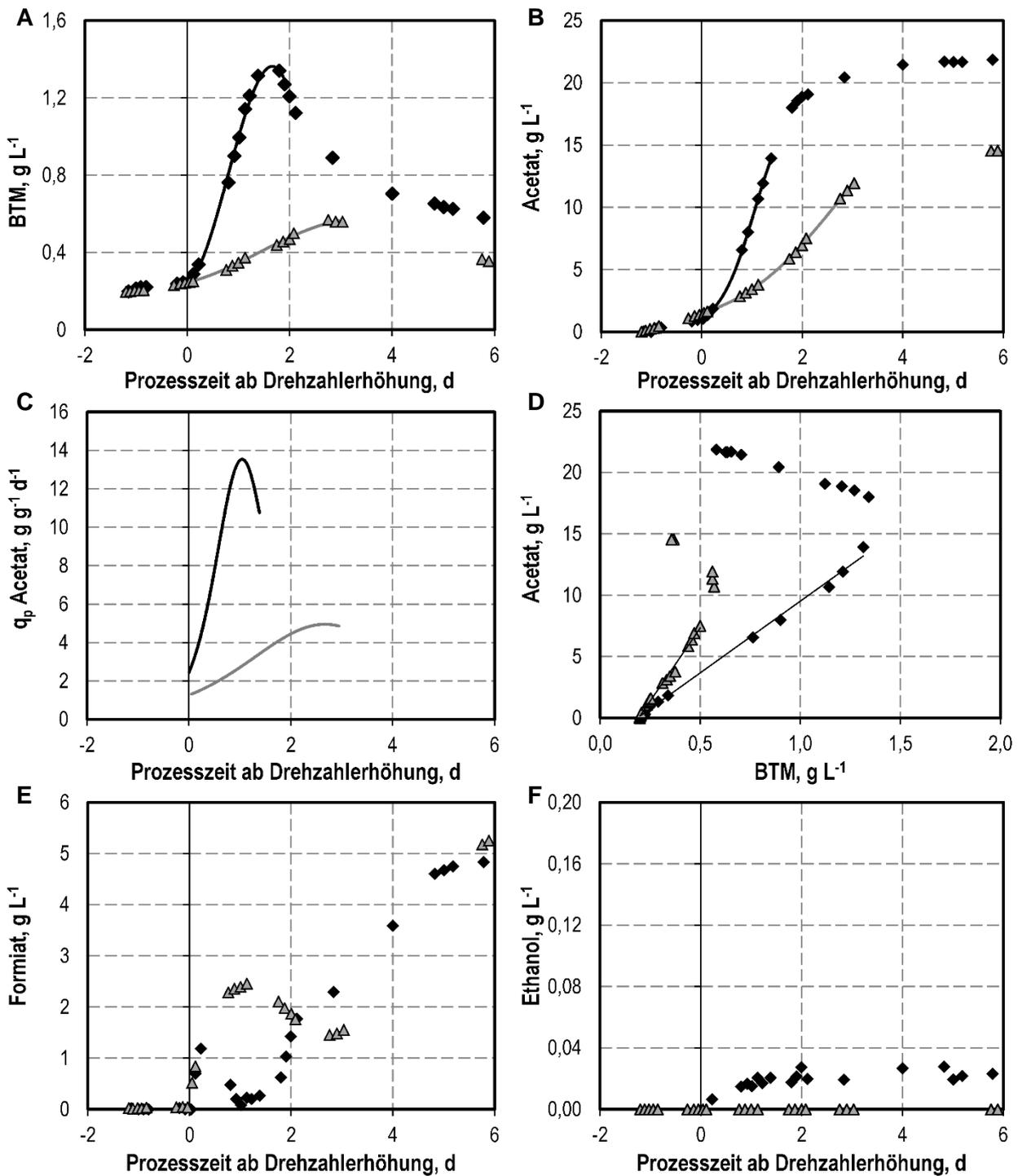
Der Einsatz von komplexen Medienbestandteilen wie beispielsweise Hefeextrakt stellt eine einfache Methode dar, um den Nährstoffbedarf anspruchsvoller Mikroorganismen zu decken. Da Hefeextrakt jedoch ein heterogenes Gemisch ist, dessen Zusammensetzung je nach Bezugsquelle und Charge variiert, wird bei industriellen Anwendungen häufig versucht definierte Kultivierungsmedien einzusetzen. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieses Kapitels untersucht werden, ob eine autotrophe Satzkultivierung der acht ausgewählten acetogenen Bakterienstämme (vergleiche Kapitel 5.1) auch in definiertem Medium möglich ist.

Eine zunächst durchgeführte autotrophe Satzkultivierung in Anaerobflaschen in GA-Medium ohne Hefeextrakt mit  $H_2$  und  $CO_2$  als Substrat zeigte, dass eine autotrophe Satzkultivierung von *A. fimetarium*, *B. hydrogenotrophica*, *E. aggregans*, *S. acidovorans* und *T. mayombeii* in definiertem GA-Medium nicht möglich ist. *A. wieringae*, *C. magnum* und *S. ovata* hingegen konnten in Anaerobflaschen erfolgreich in definiertem Medium kultiviert werden. Um die autotrophe Prozessleistung dieser drei Acetogenen in definiertem Medium genauer zu untersuchen, wurden anschließend zudem Satzkultivierungen im kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen durchgeführt.

### 6.1.1 *Acetobacterium wieringae*

Abbildung 6.1 zeigt den Vergleich der autotrophen Satzkultivierung von *A. wieringae* in GA-Medium und definiertem Medium (GA-Medium ohne Hefeextrakt). Um einen genauen Vergleich zu gewährleisten, wurde die Angabe der Prozesszeit auf den Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung bezogen.

In beiden Versuchen wurden vor der Drehzahlerhöhung nur geringe Wachstums- und Produktbildungsrate detektiert. Nach der Erhöhung der Drehzahl auf 600 rpm, die in beiden Satzkultivierungen nach etwa 1,1 Tagen erfolgte, kam es in beide Fällen zu einer deutlichen Zunahme der Wachstumsrate, wobei in GA-Medium mit Hefeextrakt eine maximale Wachstumsrate von  $1,76\text{ d}^{-1}$  und in GA-Medium ohne Hefeextrakt lediglich von  $0,38\text{ d}^{-1}$  erreicht wurde. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde in der Satzkultivierung mit GA-Medium etwa 1,5 Tage früher als im Vergleichsversuch detektiert und war mehr als doppelt so hoch. In beiden Satzkultivierungen führte die Drehzahlerhöhung ebenfalls zu einem starken Anstieg der Acetatbildungsrate.



**Abbildung 6.1:** Autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen in GA-Medium (◆) und in GA-Medium ohne Hefeextrakt (▲). Temperatur 30°C; pH 7,4. A) Biotrockenmassenkonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Acetatkonzentrationen; C) zellspezifische Acetatbildungsrate; D) Auftragung der Acetat- gegen die Biotrockenmassenkonzentration. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Regression; E) Formiatkonzentrationen; F) Ethanolkonzentrationen.

Das Maximum der zellspezifischen Acetatbildungsrate war im Satzversuch mit definiertem Medium deutlich niedriger als in der Vergleichskultivierung und wurden erst etwa 1,5 Tage später erreicht. Die finale Acetatkonzentration war in der Satzkultivierung ohne Hefeextrakt um  $7 \text{ g L}^{-1}$  niedriger.

Die Auftragung der der Acetatkonzentration gegen die Biotrockenmassekonzentration ergibt für die Satzkultivierung in definiertem Medium ein Acetat-Biomasse-Verhältnis von  $23,7 \text{ g g}^{-1}$  und für die Kultivierung mit Hefeextrakt von  $11,6 \text{ g g}^{-1}$ .

In beiden Versuchen kam es nach der Drehzahlerhöhung zu einer Formiatbildung, wobei das gebildete Formiat anschließend teilweise wieder metabolisiert wurde. 6 Tage nach der Drehzahlerhöhung wurde in beiden Versuchen eine annähernd gleiche Formiatkonzentration von etwa  $5 \text{ g L}^{-1}$  detektiert. Die Produktion von Ethanol konnte lediglich in der Satzkultivierung mit Hefeextrakt nachgewiesen werden.

## Diskussion

Die niedrigen Wachstums- und Produktbildungsraten zu Beginn der Versuche, bei 200 rpm, deuten in beiden Fällen auf eine gas-flüssig Massentransportlimitierung bei niedrigen Drehzahlen hin. Die automatisierte Erhöhung der Rührerdrehzahl erfolgte in beiden Satzkultivierungen etwa zum gleichen Zeitpunkt, was beweist, dass das Fehlen des Hefeextrakts keinen negativen Einfluss auf die Adaption von *A. wieringae* an die autotrophen Bedingungen im Rührkesselreaktor hatte. Im Anschluss an die Drehzahlerhöhung zeigte sich für beide Satzkultivierungen ein unterschiedliches Bild. Im Satzversuch mit GA-Medium wurde eine mehr als 4-fach höhere Wachstumsrate und eine mehr als 2-fach höhere maximale Biotrockenmassekonzentration detektiert, was auf die, durch den Hefeextrakt bereitgestellten zusätzlichen heterotrophen Kohlenstoffquellen zurückgeführt werden muss. Eine deutliche Reduktion der Wachstumsrate und maximale Biotrockenmassekonzentration durch die Verwendung definierter Medien wurde auch für verschiedene andere acetogene Mikroorganismen, wie beispielsweise *M. thermoacetica* und *E. limosum* nachgewiesen (Lundie und Drake 1984; Chang et al. 1999). Die autotrophe Satzkultivierung in definiertem Medium führte außerdem zu einer deutlich niedrigeren Acetatbildung, was durch die mehr als 2-fach erniedrigten zellspezifischen Acetatbildungsrate verdeutlicht wird. Zudem wurde die maximale Acetatkonzentration im Satzversuch mit definiertem Medium erst 2 Tage später detektiert als im Vergleichsversuch mit Hefeextrakt. Durch das Eliminieren des Hefeextrakts wurde das Nährstoffangebot des Kultivierungsmediums reduziert. Da viele Vitamine und Spurenelemente jedoch wichtige Bestandteile von Enzymen des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs sind (Ragsdale und Wood 2008), führte das Weglassen des Hefeextrakts im Fall von *A. wieringae* zu einer negativen Auswirkung auf die autotrophe Prozessleistung. Dies wiederum bedeutet, dass der

Nährstoffbedarf von *A. wieringae* durch die im GA-Medium ohne Hefeextrakt enthaltenen Vitamine und Spurenelemente nicht gedeckt wird.

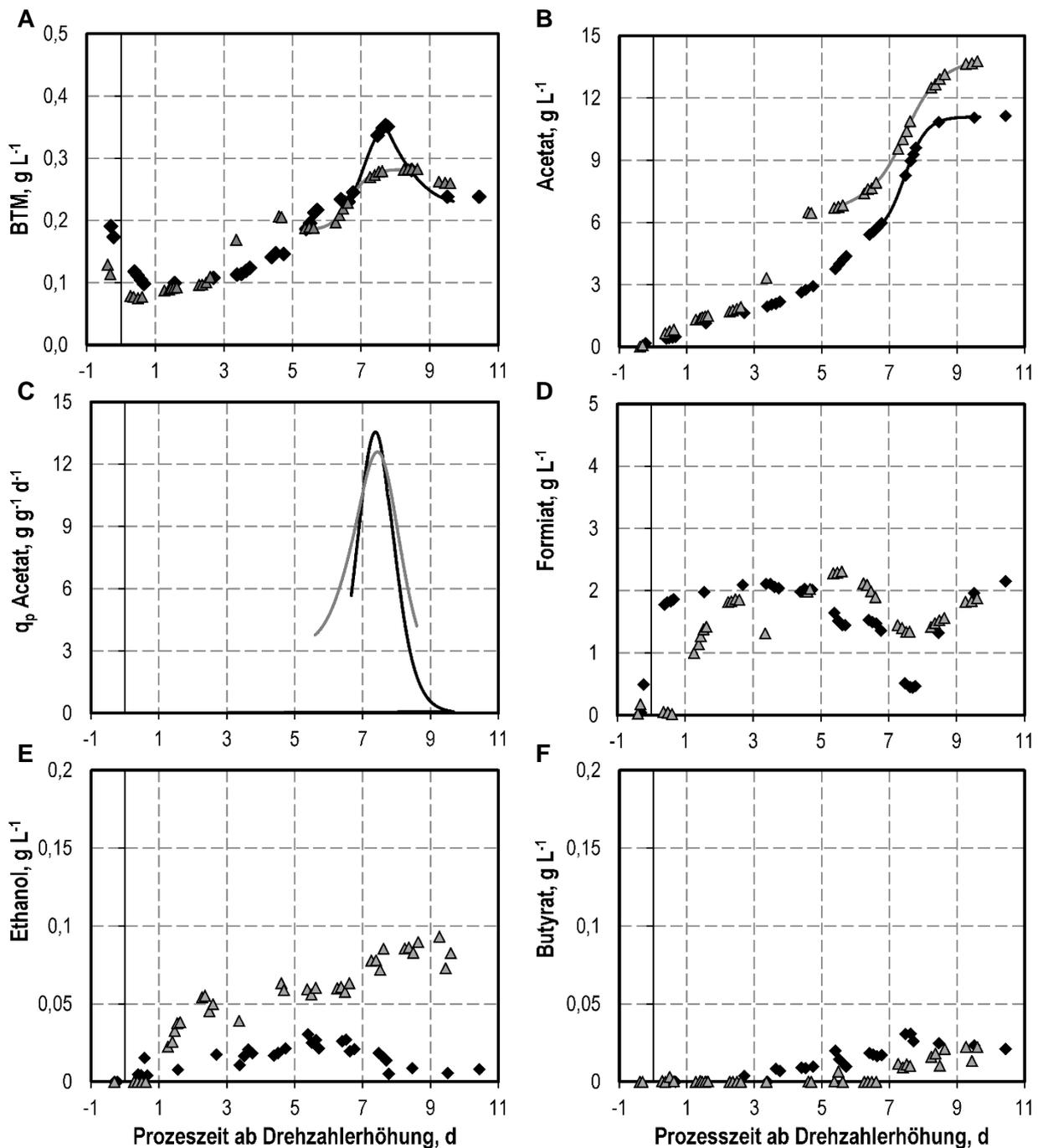
Betrachtet man das Verhältnis der Acetatkonzentration zur Biotrockenmassekonzentration, so zeigt sich, dass durch die Satzkultivierung in definiertem Medium ein höheres Acetat-Biomasse-Verhältnis erreicht wurde. Da die Energiegewinnung und die Biomassebildung unter autotrophen Bedingungen an den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg gekoppelt sind (Schuchmann und Müller 2014; Ragsdale und Pierce 2008), ist das Verhältnis von gebildetem Acetat zu gebildeter Biomasse eine direkte Reflexion der Zellenergetik. Ein erhöhtes Acetat-Biomasse-Verhältnis lässt demzufolge auf einen erhöhten Energiebedarf der Zelle schließen (Daniel et al. 1990). Eine Steigerung des Acetat zu Biomasse Verhältnisses unter definierten Kultivierungsbedingungen wurde ebenfalls für *M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* beschrieben (Savage und Drake 1986; Daniel et al. 1990).

Ganzheitlich betrachtet zeigt der Vergleich der beiden Satzversuche, dass eine autotrophe Satzkultivierung von *A. wieringae* in definiertem Medium möglich ist. Obwohl die Eliminierung von Hefeextrakt zu einer deutlich erniedrigten Acetatkonzentration führte, ist diese im Kontrast zur den maximal erreichten Acetatkonzentration mit beispielsweise *A. fimetarium* oder *E. aggregans* in Medium mit Hefeextrakt (vergleiche Kapitel 5.3) trotzdem vergleichsweise hoch.

### 6.1.2 *Clostridium magnum*

Die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *C. magnum* im Rührkesselreaktor in definiertem Medium (GA-Medium ohne Hefeextrakt) sind in Abbildung 6.2 im Vergleich zu einer Satzkultivierung in Medium mit Hefeextrakt (GA-Medium) dargestellt. Um einen genauen Vergleich zu gewährleisten, wurde die Angabe der Prozesszeit auf den Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung bezogen.

In beiden Satzversuchen wurde vor der automatisierten Drehzahlerhöhung, welche nach etwa 0,5 Tagen erfolgte, zunächst eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration detektiert. Ein Wachstum setzte erst etwa 1 Tag nach der Drehzahlerhöhung ein, wobei die maximalen Wachstumsraten von  $0,53 \text{ d}^{-1}$  (GA-Medium) und  $0,28 \text{ d}^{-1}$  (definiertes Medium) erst nach 7 beziehungsweise 6 Tagen gemessen wurden. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde in beiden Satzkultivierungen nach etwa 7,5 Tagen erreicht und war im Satzversuch mit Hefeextrakt um 25 % höher als in der Satzkultivierung in definiertem Medium.



**Abbildung 6.2:** Autotrophe Satzkultivierung von *C. magnum* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen in GA-Medium (◆) und in GA-Medium ohne Hefeextrakt (▲). Temperatur 30°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Acetatkonzentrationen; C) zellspezifische Acetatbildungsrate; D) Formiatkonzentrationen; E) Ethanolkonzentrationen; F) Butyratkonzentrationen.

Wie die Biomassebildung erfolgte auch die Acetat- und Formiatbildung in beiden Satzkultivierungen wellenförmig. Die ermittelten zellspezifischen Acetatbildungsraten waren annähernd gleich. Die maximal detektierte Acetatkonzentration war im Satzversuch mit definiertem Medium sogar um  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  höher als im Satzversuch mit Hefeextrakt. Die Bildung von Formiat war in beiden Satzkultivierungen etwa vergleichbar, genauso wie die Produktion von Butyrat. Die maximal erreichte Ethanolkonzentration war in der Satzkultivierung in definiertem Medium  $0,09 \text{ g L}^{-1}$  und damit etwa 3-fach höher als im Satzversuch mit Hefeextrakt.

## Diskussion

Die Erhöhung der Rührerdrehzahl erfolgte in beiden Satzkultivierungen zum etwa gleichen Zeitpunkt, was zeigt, dass ein Weglassen des Hefeextrakts keinen negativen Einfluss auf die Adaption von *C. magnum* an die autotrophen Kultivierungsbedingungen im Rührkesselreaktor hatte. Die Wachstumsrate und die maximale Biotrockenmassekonzentration waren bei der Satzkultivierung in Medium mit Hefeextrakt etwas höher als im Satzversuch in definiertem Medium. Der Grund hierfür waren vermutlich die zusätzlichen heterotrophen Kohlenstoffquellen, die durch den zugegebenen Hefeextrakt bereitgestellt wurden. Eine Reduktion der Wachstumsrate und maximale Biotrockenmassekonzentration durch das Weglassen von komplexen Medienbestandteilen wurde auch für verschiedene andere Acetogene wie beispielsweise *M. thermoacetica* und *E. limosum* nachgewiesen (Lundie und Drake 1984; Chang et al. 1999). Wie auch im Versuch mit *A. wieringae*, ergab die Satzkultivierung in definiertem Medium ein höheres Acetat-Biomasse-Verhältnis als die Satzkultivierung in GA-Medium, was auf einen erhöhten Energiebedarf der Zellen in definiertem Medium schließen lässt (vergleiche Kapitel 6.1.1). Sowohl in definiertem als auch in Medium mit Hefeextrakt, wurde eine maximale zellspezifische Acetatbildungsrate von etwa  $13 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht. Entgegen den Erwartungen führte eine Eliminierung von Hefeextrakts zu einer deutlich erhöhten maximalen Acetat- und Ethanolkonzentration. Zum einen beweist dies, dass die im GA-Medium ohne Hefeextrakt vorhandenen Vitamine und Spurenelemente den Nährstoffbedarf von *C. magnum* komplett decken. Auf der anderen Seite deutet diese Tatsache jedoch auch darauf hin, dass durch den Hefeextrakt eingebrachte Moleküle, Verbindungen oder Ionen einen negativen Einfluss auf die Produktbildung von *C. magnum* haben. Für *C. ragsdalei* wurde beispielsweise nachgewiesen, dass eine erhöhte Kupferkonzentration im Medium zu einer erniedrigten Acetat- und Ethanolproduktion führt (Saxena und Tanner 2011).

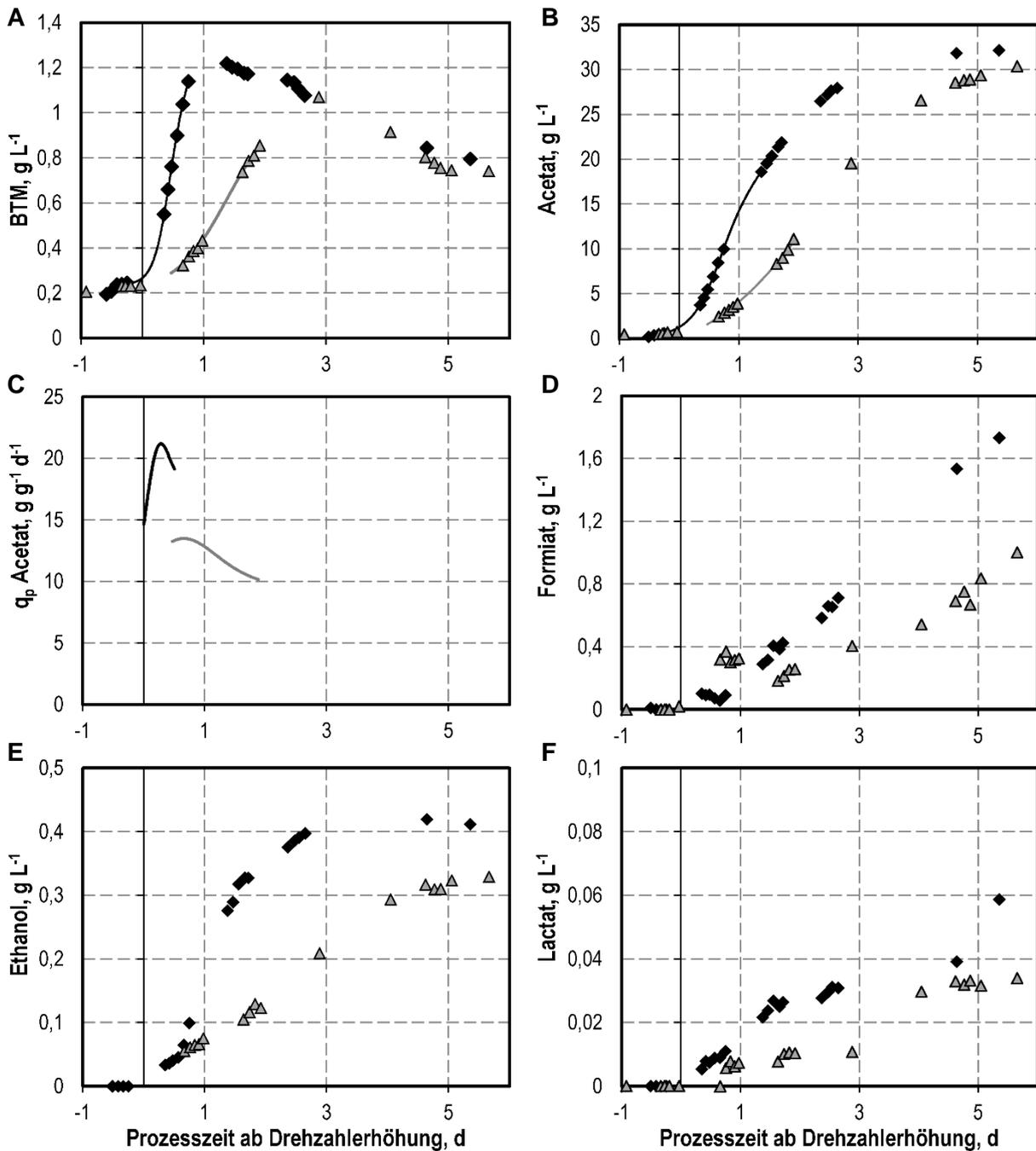
Betrachtet man alle Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *C. magnum* in Medium mit und ohne Hefeextrakt, zeigt sich, dass eine Satzkultivierung in definiertem Medium eine positive Auswirkung auf die autotrophe Prozessleistung von *C. magnum* hat und einer Satzkultivierung mit Hefeextrakt vorgezogen werden sollte.

### 6.1.3 *Sporomusa ovata*

Abbildung 6.3 zeigt den Vergleich der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* in GA-Medium und definiertem Medium (GA-Medium ohne Hefeextrakt). Um einen genauen Vergleich der erhaltenen Daten zu gewährleisten, wurde die Angabe der Prozesszeit auf den Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung bezogen.

Vor der automatisierten Drehzahlerhöhung, die in beiden Satzkultivierungen etwa zur gleichen Zeit erfolgte, wurden nur geringe Wachstums- und Acetatbildungsraten verzeichnet. Nach der Erhöhung der Drehzahl kam es zu einem schnellen Anstieg der Wachstumsrate, wobei in GA-Medium eine maximale Wachstumsrate von  $1,94 \text{ d}^{-1}$  und in definiertem Medium von  $0,92 \text{ d}^{-1}$  detektiert wurde. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde im Ansatz ohne Hefeextrakt erst 2 Tage später als in der Vergleichskultivierung erreicht und war um  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  niedriger.

Auch der Verlauf der Acetatbildung erfolgte in definiertem Medium zeitlich verzögert im Vergleich zur Satzkultivierung in Medium mit Hefeextrakt. So wurde die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate in Medium ohne Hefeextrakt erst etwa 0,5 Tage später als im Vergleichsversuch erreicht. Die finalen Acetatkonzentrationen waren mit  $32,2 \text{ g L}^{-1}$  und  $30,4 \text{ g L}^{-1}$  in etwa vergleichbar. Wie die Biomasse- und Acetatbildung erfolgten auch die Formiat-, Ethanol- und Lactatbildung in definiertem Medium langsamer und auch die final bestimmten Konzentrationen an Formiat ( $1,00 \text{ g L}^{-1}$ ), Ethanol ( $0,33 \text{ g L}^{-1}$ ) und Lactat ( $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ) waren etwas niedriger als in der Satzkultivierung in Medium mit Hefeextrakt.



**Abbildung 6.3:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen in GA-Medium (◆) und in GA-Medium ohne Hefeextrakt (▲). Temperatur 30°C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; Die durchgezogenen Linien in A) und B) sind das Resultat einer nicht linearen Interpolation auf der Basis der offline gemessenen Biomasse- und Acetatkonzentrationen; C) zellspezifische Acetatbildungsraten; D) Formiatkonzentrationen; E) Ethanolkonzentrationen; F) Lactatkonzentrationen.

## Diskussion

Die geringen Wachstums- und Produktbildungsraten zu Beginn beider Satzkultivierungen deuten auf eine gas-flüssig Massentransportlimitierung bei niedrigen Drehzahlen hin. Da die Erhöhung der Rührerdrehzahl in beiden Satzkultivierungen etwa zum gleichen Zeitpunkt erfolgte, hatte das Weglassen des Hefeextrakts demnach keinen negativen Einfluss auf die Adaption von *S. ovata* an die autotrophen Bedingungen im Rührkesselreaktor. Die erhöhte Wachstumsrate und maximale Biomassekonzentration im Ansatz mit Hefeextrakt muss wie bei *A. wieringae* und *C. magnum* auf die durch den Hefeextrakt zusätzlich zu Verfügung stehenden heterotrophen Kohlenstoffquellen zurückgeführt werden. Eine Reduktion der Wachstumsrate und der maximale Biotrockenmassekonzentration durch das Weglassen von Komplexbestandteilen wurde bereits auch für *M. thermoacetica* und *E. limosum* beschrieben (Lundie und Drake 1984; Chang et al. 1999). Die verringerten Produktbildungsraten in definiertem Medium weisen darauf hin, dass die Vitamine und Spurenelemente des GA-Mediums ohne Hefeextrakt den Nährstoffbedarf von *S. ovata* nicht komplett decken. Durch das Entfernen des Hefeextrakts wurden die bereitgestellten Nährstoffe reduziert und somit der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg, für dessen Enzyme Vitamine und Spurenelemente eine wichtige Rolle spielen (Ragsdale und Wood 2008), verlangsamt.

Allgemein zeigt der Vergleich der beiden Satzversuche, dass eine autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in definiertem Medium möglich ist. Obwohl die Wachstums- und Produktbildungsraten ohne Hefeextrakt niedriger ausfielen, wurde in definiertem Medium eine vergleichbar hohe maximale Acetatkonzentration wie in Medium mit Hefeextrakt erreicht und auch die finale Ethanolkonzentration war lediglich um  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  erniedrigt.

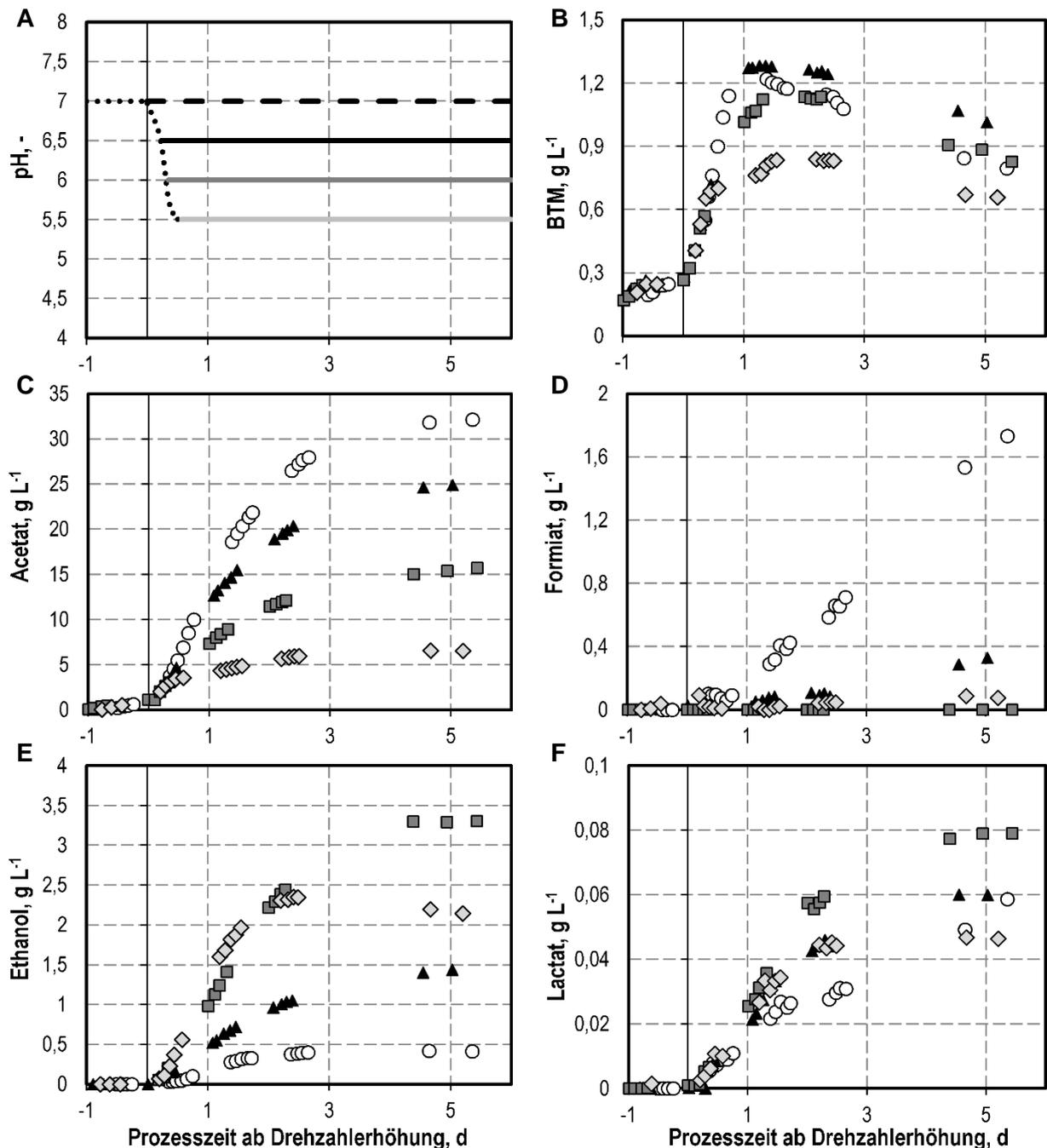
## 7 Weiterführende reaktionstechnische Analyse von *Sporomusa ovata*

Da sich *S. ovata* im Rahmen des reaktionstechnischen Vergleichs der autotrophen Prozessleistung der acht ausgewählten acetogenen Mikroorganismen als leistungsfähigster Stamm herausgestellt hat (vergleiche Kapitel 5.3), sollte die reaktionstechnische Analyse dieses Bakteriums weitergeführt werden. Es sollten dabei vor allem die Veränderung des Produktspektrums (erhöhte Ethanolbildung) und die Nutzung von Kohlenstoffmonoxid als Substrat untersucht werden.

### 7.1 Untersuchungen zur Ethanolbildung

Da Ethanol durch seinen Einsatz als Kraftstoff und Kraftstoffzusatz eine wichtige Rolle spielt, lag der Fokus der Synthesegas-Forschung in den letzten Jahren vor allem auf der Produktion dieses Alkohols. Auf Grund seines Effekts auf die Produktzusammensetzung, hat sich der pH als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Aktivität der acetogenen Mikroorganismen herausgestellt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Erniedrigung des Fermentations-pH zu einer Verschiebung von der Acidogenese hin zur Solventogenese führt und somit eine gesteigerte Bildung von Alkoholen und anderen höher reduzierten Produkten erlaubt (Phillips et al. 1993; Grethlein et al. 1990). Der optimale pH ist dabei stark abhängig vom verwendeten acetogenen Mikroorganismus. Bei *C. autoethanogenum* beispielsweise liegt der optimale pH für die Produktion von Ethanol bei 4,74 (Guo et al. 2010), wohingegen für *C. ragsdalei* gezeigt wurde, dass ein pH unter 6 zu keiner erhöhten Ethanolbildung führt (Kundiya et al. 2011).

Auf Grund der beschriebenen Literaturdaten sollte im Rahmen dieses Kapitels untersucht werden, ob sich eine Erniedrigung des pH positiv auf die Ethanolbildung durch *S. ovata* auswirkt. Hierfür wurde *S. ovata* autotroph im Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen (vergleiche Kapitel 5.2) kultiviert, wobei gleichzeitig mit der automatisierten Drehzahlerhöhung der pH-Sollwert von pH 7,0 auf pH 6,5, pH 6,0 oder pH 5,5 erniedrigt wurde. Das Absinken des pH erfolgte dabei durch die Produktion von Acetat und den Verzicht auf eine Gegentitration bis zum Erreichen des pH-Sollwerts. In Abbildung 7.1 sind die durchgeführten Satzkultivierungen vergleichend zu einer autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* bei pH 7,0 dargestellt. Um einen genauen Vergleich zu gewährleisten, wurde die Angabe der Prozesszeit jeweils auf den Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung bezogen.



**Abbildung 7.1:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen in GA-Medium. Der pH wurde nach der Drehzahlerhöhung entweder auf pH 7,0 (○/---), pH 6,5 (▲/—), pH 6,0 (■/—) oder pH 5,5 (◇/—) geregelt. Temperatur 30°C. A) pH-Verläufe; B) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); C) Acetatkonzentrationen; D) Formiatkonzentrationen; E) Ethanolkonzentrationen; F) Lactatkonzentrationen.

In der ersten Kultivierungsphase, bei 200 rpm, wurde der pH in allen Satzversuchen auf pH 7,0 geregelt, weshalb sich für diesen Zeitraum keine Unterschiede ergaben. Mit der Erhöhung der Rührerdrehzahl wurde der pH-Sollwert auf pH 6,5, pH 6,0, oder pH 5,5 erniedrigt, wobei das

Absinken des pH in Teilabbildung 7.1 A) dargestellt ist. Während der ersten 0,5 Tage nach der pH-Umstellung, zeigten die Biotrockenmassekonzentrationen einen annähernd gleichen Verlauf. Anschließend kam es zu Abweichungen. Verglichen mit der Referenzkultivierung bei pH 7,0, führte ein Kultivierungs-pH von 6,5 zu einer annähernd gleichen maximalen Biotrockenmassekonzentration, im Anschluss daran aber zu einer geringeren Absterberate. Im Satzprozess mit einem pH von 6,0 war die maximale Biotrockenmassekonzentration im Gegensatz zum Satzversuch mit pH 7,0 leicht erniedrigt. Der größten Unterschiede zur Referenzkultivierung ergab sich jedoch bei pH 5,5. In dieser Satzkultivierung wurde die maximale Biotrockenmassekonzentration erst etwa 2 Tage nach der Drehzahlerhöhung detektiert und erreichte lediglich 65 % der maximalen Biotrockenmassekonzentration der Satzkultivierung bei pH 7,0.

Die Verläufe der Acetatkonzentrationen spannen einen Fächer auf: Je niedriger der Fermentations-pH war, desto geringer war auch die finale Acetatkonzentration, wobei sich die maximale Acetatkonzentrationen pro pH-Stufe um jeweils 7 - 9 g L<sup>-1</sup> verringerte. Im Referenzprozess mit pH 7,0 war die finale Acetatkonzentration mit 32,16 g L<sup>-1</sup> fünfmal höher als in der Satzkultivierung mit pH 5,5. Für Formiat ergab sich ein ähnliches Bild: Je niedriger der Kultivierungs-pH war, desto weniger Formiat wurde gebildet, wobei bei einem pH von pH 6,0 und pH 5,5 lediglich Formiatkonzentrationen von unter 0,10 g L<sup>-1</sup> detektiert werden konnten. Die maximalen Ethanolkonzentrationen verhielten sich gegensätzlich zu den Acetat- und Formiatkonzentrationen: Je niedriger der pH während der Satzkultivierung war, desto mehr Ethanol wurde durch *S. ovata* produziert, wobei im Satzversuch mit pH 6,0 mit 3,30 g L<sup>-1</sup> eine 8-fach höhere finale Ethanolkonzentration erreicht wurde als im Referenzprozess. Einzige Ausnahme war die Satzkultivierung bei pH 5,5. In diesem Satzversuch brach die Ethanolbildung 2 Tage nach der Drehzahlerhöhung ein, weshalb die maximale Ethanolkonzentration lediglich einen Wert von 2,19 g L<sup>-1</sup> erreichte. Die höchste Lactatkonzentration von 0,08 g L<sup>-1</sup> wurde im Satzprozess mit pH 6,0 gemessen, die niedrigste im Satzprozess mit einem Kultivierungs-pH von 5,5 (0,05 g L<sup>-1</sup>).

## Diskussion

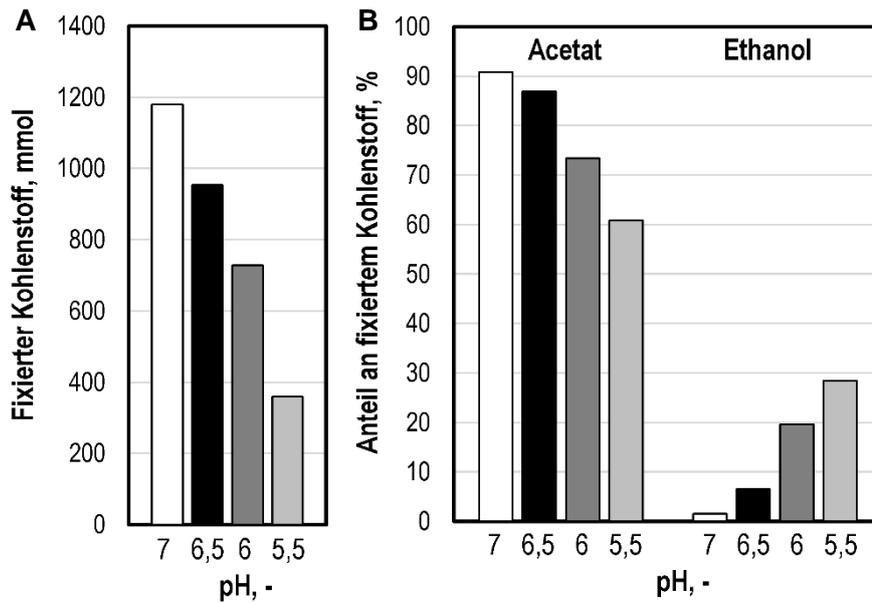
Der Vergleich der autotrophen Satzkultivierungen zeigt, dass die Einstellung des Fermentations-pH auch bei *S. ovata* einen starken Einfluss auf die resultierende Produktbildung hat. Eine Erniedrigung des Fermentations-pH hatte nicht nur eine Verringerung der maximalen Acetatkonzentration und eine Erhöhung der maximalen Ethanolkonzentration zur Folge, sondern wirkte sich in gleichem Maße auf die zugehörigen zellspezifischen und auch volumetrischen Produktbildungsraten aus (vergleiche Tabelle 7.1).

**Tabelle 7.1:** Vergleich der Wachstumsraten, sowie der volumetrischen und zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsrate der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen pH-Einstellungen.

pH	$\mu, \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Acetat}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Acetat}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
7,0	2,94	17,96	21,03	0,34	0,28
6,5	2,34	14,90	16,96	0,64	0,65
6,0	1,99	7,44	11,03	1,37	1,84
5,5	2,09	2,45	8,73	1,94	2,73

Ein erniedrigter pH führte bei der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* zu einer Verschiebung der Acidogenese hin zur Solventogenese und so zu einer Veränderung des prozentualen Kohlenstoffanteils der Produkte am gesamt fixierten Kohlenstoff (vergleiche Abbildung 7.2 B). Während bei einem pH von 7,0 90,8 % des autotroph fixierten Kohlenstoffs in Acetat und nur 1,5 % in Ethanol wiedergefunden werden konnten, wurden bei einem pH von 5,5 nur 60,9 % des aufgenommenen Kohlenstoffs in Acetat und 28,4 % in Ethanol fixiert. Die Verschiebung des Produktspektrums durch die Erniedrigung des pH hin zu Ethanol wurde ebenfalls für verschiedene Acetogene der Gattung *Clostridium* gezeigt (Abubackar et al. 2016b; Guo et al. 2010; Phillips et al. 1993). Es wird angenommen, dass die Mikroorganismen durch die verstärkte Produktion von Alkoholen dem niedrigen extrazellulären pH entgegenwirken, da es bei einem niedrigen extrazellulären pH zur Rückdiffusion von sekretierter undissoziierter Säure ins Zytoplasma kommt. Wegen dem basischeren intrazellulären pH kommt es anschließend zur Dissoziation dieser Säuren, was ohne Gegenmaßnahme zu einer Eliminierung des Protonengradienten, welcher für die Energiegewinnung genutzt wird, und somit zu einem zwangsläufigen Zelltod führen würde (Dürre 2005).

Neben der Verschiebung des Produktspektrums führte die schrittweise Erniedrigung des Kultivierungs-pH jedoch auch zu einer Verringerung der Menge an Kohlenstoff, die während der gesamten Satzkultivierung durch *S. ovata* fixiert wurde (vergleiche Abbildung 7.2 A). Besonders stark war dabei der Unterschied zwischen den Satzkultivierungen mit pH 6,0 auf pH 5,5. Während im Referenzversuch (pH 7,0) 1180 mmol Kohlenstoff aus dem gasförmigen Substrat  $\text{CO}_2$  fixiert wurden, betrug der Wert bei einem pH von 5,5 mit 359 mmol lediglich 30 % davon. Die Verringerung der fixierten Kohlenstoffmenge durch die Erniedrigung des Fermentations-pH zeigt deutlich, dass das pH-Optimum von *S. ovata* im neutralen Bereich liegt.



**Abbildung 7.2:** Graphische Darstellung der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff (A) und der prozentualen Anteile des Kohlenstoffs in den Produkten Acetat und Ethanol am gesamt fixiertem Kohlenstoff (B) während der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* im Rührkesselreaktor bei pH 7,0, pH 6, pH 6,0 und pH 5,5. Temperatur: 30°C.

Im Vergleich zu den Produktbildungsrate wurden die maximal detektierten Wachstumsraten (vergleiche Tabelle 7.1) durch die Erniedrigung des Kultivierungs-pH nur wenig beeinflusst. Diese Tatsache ist darin begründet, dass die maximale Wachstumsrate in allen Satzkultivierungen innerhalb der ersten 0,3 Tage nach Erhöhung der Rührerdrehzahl detektiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der pH der einzelnen Satzkultivierungen noch im Absinken und die erniedrigten pH-Sollwerte waren noch nicht erreicht, weshalb die Auswirkung des pH auf die Wachstumsraten relativ gering ausfiel.

Die Absenkung des pH auf pH 5,5 führte zunächst zu einer starken Ethanolproduktion und der höchsten Ethanolbildungsrate der vier dargestellten Satzversuche. Etwa 2 Tage nach Erhöhung der Rührerdrehzahl kam es jedoch zu einer Stagnation des Wachstums und zu einem abrupten Abbruch der Ethanol- und Lactatbildung. Gemäß Literaturangaben liegt der pH-Bereich von *S. ovata* in dem Wachstum beobachtet werden kann zwischen 5,0 und 8,1, wobei sich die Angaben auf heterotrophe Bedingungen beziehen (Möller et al. 1984). Der hier dargestellte Satzversuch zeigt jedoch deutlich, dass *S. ovata* seinen autotrophen Stoffwechsel bereits bei einem pH von 5,5 nur noch für begrenzte Zeit aufrechterhalten kann.

Die im Rahmen dieses Kapitels durchgeführten Satzkultivierungen führen zu dem Ergebnis, dass der optimale pH für die autotrophe Produktion von Ethanol durch *S. ovata* bei pH 6,0 liegt. Durch die Erniedrigung des pH von 7,0 auf 6,0 konnte die maximale Ethanolkonzentration um 680 % auf 3,30 g L<sup>-1</sup> gesteigert werden.

## 7.2 Kohlenstoffmonoxid als Substrat

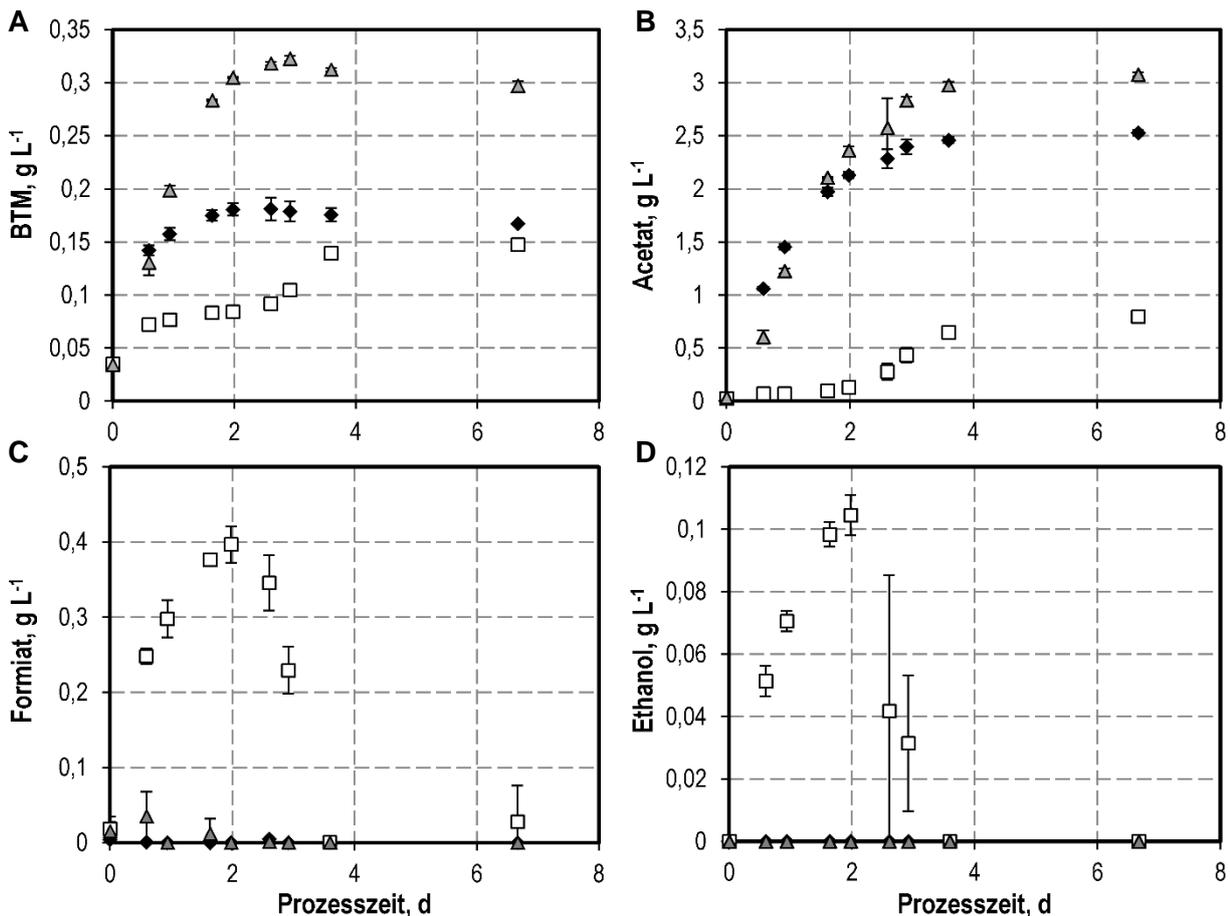
Synthesegas, welches hauptsächlich durch die Vergasung landwirtschaftlicher Reststoffe, wie beispielsweise Stroh, oder durch die Vergasung von kommunalen Abfällen hergestellt wird, besteht neben  $H_2$  und  $CO_2$  auch, abhängig vom Ausgangsmaterial, zu 5 % - 60 % aus CO (Tirado-Acevedo et al. 2010; Liew et al. 2013). Für viele Acetogene, wie beispielsweise *A. woodii*, *B. methylotrophicum*, *C. carboxidivorans*, *C. ljundahlii* und *M. thermoacetica*, wurde neben der Fähigkeit zur Nutzung von  $H_2$  und  $CO_2$  als alleinige Energie- und Kohlenstoffquellen auch die Eignung von CO als Substrat nachgewiesen (Bertsch und Müller 2015; Liou et al. 2005; Tanner et al. 1993; Kerby und Zeikus 1983). Für *S. ovata* wurde in der Literatur bislang lediglich die Metabolisierung von  $H_2$  und  $CO_2$  beschrieben (Möller et al. 1984), zur Nutzung von CO als Substrat gibt es bislang keine Untersuchungen.

Im Rahmen dieses Kapitels sollte deshalb die Fähigkeit von *S. ovata* zur Nutzung von CO als Substrat geprüft werden. Sollte eine Verstoffwechslung von CO durch *S. ovata* möglich sein, sollte außerdem der Einfluss des CO-Partialdrucks und die Auswirkungen einer Erniedrigung des Fermentations-pH auf die autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* mit  $H_2$ ,  $CO_2$  und CO als Substrat untersucht werden.

### 7.2.1 Variation der Substratzusammensetzung

Neben Gasmischungen aus  $H_2$ ,  $CO_2$  und CO wurden für verschiedene acetogene Mikroorganismen, wie beispielsweise *A. bacchi*, *C. carboxidivorans* und *C. scatologenes* auch Gasmischungen aus lediglich  $CO_2$  und CO als mögliches Substrat für den autotrophen Metabolismus beschrieben (Allen et al. 2010; Liou et al. 2005). Wenige Acetogene, wie zum Beispiel *C. autoethanogenum*, *M. thermoacetica* oder *B. producta* sind sogar in der Lage CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Abrini et al. 1994; Kerby und Zeikus 1983; Geerligs et al. 1987).

Das autotrophe Substratspektrum von *S. ovata* sollte zunächst anhand von autotrophen Satzkultivierungen in Anaerobflaschen untersucht werden. Vor der Inokulation wurden die Anaerobflaschen mit verschiedenen Gasmischungen begast und mit einem Absolutdruck von 2 bar beaufschlagt. In Abbildung 7.3 sind die Ergebnisse der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* mit  $H_2/CO_2$  ( $p_{H_2}$  800 mbar,  $p_{CO_2}$  400 mbar,  $p_{N_2}$  800 mbar),  $H_2/CO_2/CO$  ( $p_{H_2}$  800 mbar,  $p_{CO_2}$  400 mbar,  $p_{CO}$  200 mbar,  $p_{N_2}$  600 mbar) und  $CO_2/CO$  ( $p_{CO_2}$  400 mbar,  $p_{CO}$  200 mbar,  $p_{N_2}$  1400 mbar) als Substrate vergleichend dargestellt.

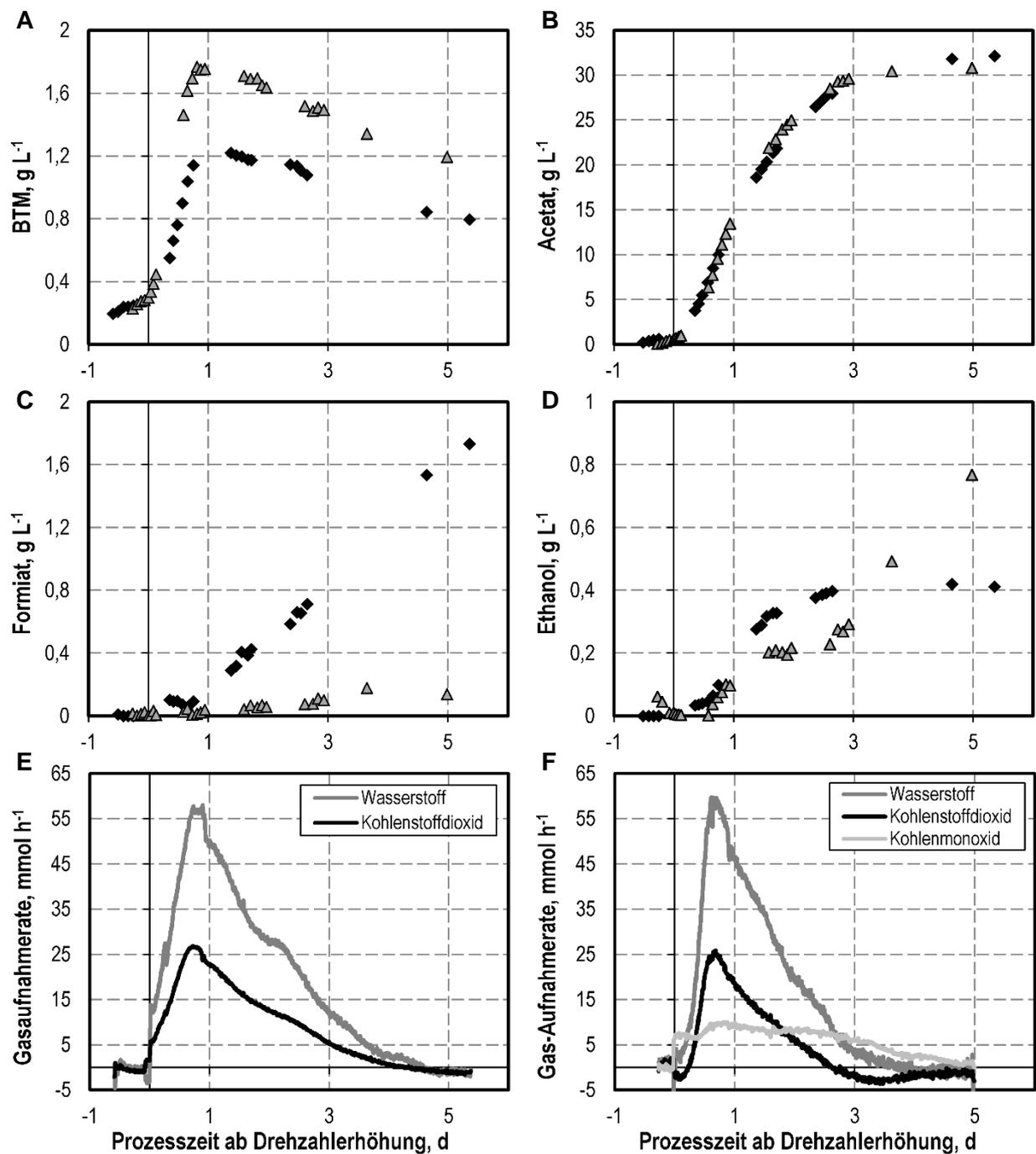


**Abbildung 7.3:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in begasten Anaerobflaschen bei unterschiedlichen Substratzusammensetzungen in GA-Medium. (◆) H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>; (▲) H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO; (□) CO<sub>2</sub>/CO. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; C) Formiatkonzentrationen; D) Ethanolkonzentrationen. Temperatur: 30 °C. Start-pH: 7,0.

In allen drei Satzkultivierungen wurde von Beginn an ein Wachstum beobachtet. Die höchste Biotrockenmassekonzentration wurde im Satzversuch mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO als Substrat detektiert (0,32 g L<sup>-1</sup>), die niedrigste in der Satzkultivierung mit CO<sub>2</sub>/CO (0,15 g L<sup>-1</sup>). Das gleiche Bild zeigte sich für die maximalen Acetatkonzentrationen. Im Gegensatz zum Wachstum trat eine signifikante Acetatbildung in der Satzkultivierung mit CO<sub>2</sub>/CO jedoch nicht von Beginn an auf, sondern wurde erst nach etwa 2 Tagen beobachtet. Die Produktion von Formiat und Ethanol trat lediglich in der Satzkultivierung mit der Gasmischung CO<sub>2</sub>/CO auf. Die Bildung der beiden Produkte erfolgte dabei innerhalb der ersten 2 Tage. Anschließend kam es mit dem Einsetzen der Acetatproduktion zu einer erneuten Metabolisierung von Formiat und Ethanol durch *S. ovata*.

Auf Grund der guten Ergebnisse des Ansatzes mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO als Substrat wurde zudem eine Satzkultivierung mit diesem Substratspektrum in einem kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor durchgeführt, wobei die zugeführte Gasmischung wie folgt zusammengesetzt war: 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO. In Abbildung 7.4 sind die Ergebnisse dieser

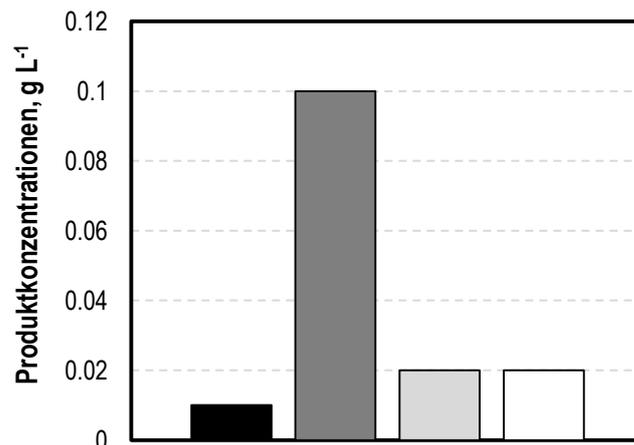
Satzkultivierung im Vergleich zu einer Satzkultivierung mit  $H_2/CO_2$  (800 mbar  $H_2$ , 200 mbar  $CO_2$ ) als Substrat dargestellt.



**Abbildung 7.4:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen mit verschiedenen Gaszusammensetzungen. (♦) 800 mbar  $H_2$  und 200 mbar  $CO_2$ ; (Δ) 750 mbar  $H_2$ , 150 mbar  $CO_2$  und 100 mbar  $CO$ . Begasungsrate: 5 L h<sup>-1</sup>; Temperatur 30 °C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Acetatkonzentrationen; C) Formiatkonzentrationen; D) Ethanolkonzentrationen; E) Gasaufnahme der Satzkultivierung mit  $H_2/CO_2$  als Substrat; F) Gasaufnahme der Satzkultivierung mit  $H_2/CO_2/CO$  als Substrat.

In beiden Satzversuchen setzte sofort nach der Drehzahlerhöhung ein starkes Wachstum ein. Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen wurden in beiden Satzkultivierungen zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Im Satzversuch mit zusätzlich CO als Substrat war die maximal gemessene Biotrockenmassekonzentration mit  $1,77 \text{ g L}^{-1}$  jedoch deutlich höher als im Vergleichsversuch ( $1,22 \text{ g L}^{-1}$ ). Der Verlauf der Acetatkonzentration war in beiden Satzkultivierungen annähernd identisch, wobei maximale Konzentrationen von  $32,16 \text{ g L}^{-1}$  (ohne CO) und  $30,81 \text{ g L}^{-1}$  (mit CO) detektiert wurden. Während im Satzversuch mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  über den gesamten Prozesszeitraum eine kontinuierliche Formiatproduktion bis zu einer Konzentration von  $1,75 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet werden konnten, wurden im Satzversuch mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$  als Substrat lediglich  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  Formiat gebildet. Betrachtet man die Verläufe der Ethanolkonzentrationen so zeigt sich, dass die zusätzliche Begasung mit CO einen positiven Effekt auf die erreichte Endkonzentration an Ethanol hatte. In der Satzkultivierung mit CO wurde etwa doppelt so viel Ethanol ( $0,77 \text{ g L}^{-1}$ ) produziert wie im Vergleichsprozess. Durch die Gegenüberstellung der während der Satzversuche ermittelten Gasaufnahmearten wird ersichtlich, dass in beiden Satzkultivierungen näherungsweise die gleichen maximalen  $\text{H}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Aufnahmeraten erreicht wurden. Für den Satzprozess mit CO zeigt die Darstellung der Gasaufnahmearten, dass das zugeführte CO parallel zu  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  von *S. ovata* verstoffwechselt wurde. Zum Ende des Satzversuches konnte zudem eine  $\text{CO}_2$ -Bildung verzeichnet werden.

Lactat wurde im Satzversuch mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$  als Substrat nur bis zu einer finalen Konzentration von  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  gebildet (vergleiche Abbildung 7.5), wohingegen im Satzversuch ohne CO eine Lactatkonzentration von  $0,06 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde.



**Abbildung 7.5:** Konzentrationen an Lactat (schwarz), Pyruvat (dunkelgrau), Acetoin (hellgrau) und 2,3-Butandiol (weiß) bei der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich mit  $\text{H}_2$  (750 mbar),  $\text{CO}_2$  (150 mbar) und CO (100 mbar) begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Temperatur:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH: 7,0.

Aus Abbildung 7.5 ist zudem ersichtlich, dass während der Satzkultivierung mit CO zusätzlich zu Acetat, Formiat, Ethanol und Lactat auch die Bildung von Pyruvat, Acetoin und 2,3-Butandiol durch *S. ovata* beobachtet wurde.

## Diskussion

Die autotrophen Satzkultivierungen in Anaerobflaschen haben gezeigt, dass *S. ovata* sowohl eine Mischung aus H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO als auch eine Gasmischung aus lediglich CO<sub>2</sub> und CO als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Die Metabolisierung von reinem CO wurde ebenfalls untersucht (Daten nicht gezeigt). Da den Bakterien auf Grund des verwendeten Natriumhydrogencarbonat-Puffers jedoch zusätzlich CO<sub>2</sub> im Medium zur Verfügung stand, konnten die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes nicht auf die Nutzung von CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zurückgeführt werden.

Die erhöhte Biotrockenmasse- und Acetatkonzentration im Ansatz mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO als Substrat im Gegensatz zur Satzkultivierung mit lediglich H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> muss auf den, durch das CO zusätzlich bereitgestellten Kohlenstoff zurückgeführt werden. Im Ansatz mit CO<sub>2</sub>/CO wurde die geringste Biotrockenmasse- und Acetatkonzentration detektiert. Die maximale Acetatkonzentration war dabei etwa 70 % niedriger als in den beiden Vergleichskultivierungen. Zudem deutet die ausgeprägte Formiatbildung innerhalb der ersten beiden Tage dieses Satzversuchs auf eine Störung des autotrophen Energiestoffwechsels von *S. ovata* unter diesen Bedingungen hin (Peters et al. 1999).

Für die Satzkultivierung von *S. ovata* im Rührkesselreaktor mit H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO als Substrat wurde der Kohlenstoffmonoxidpartialdruck in der zugeführten Gasmischung im Gegensatz zur Satzkultivierung in Anaerobflaschen auf 100 mbar reduziert. In der Literatur ist beschrieben, dass hohe Kohlenstoffmonoxidpartialdrücke teilweise zu einer Inhibierung des autotrophen Metabolismus von acetogenen Bakterien führen (Liew et al. 2013). Da im Rührkesselreaktor durch den erhöhten Leistungseintrag eine höhere Kohlenstoffmonoxideintragsrate als in Anaerobflaschen erreicht wird, sollte durch die Reduktion des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks auf 100 mbar eine Inhibierung von *S. ovata* durch CO verhindert werden.

In Tabelle 7.2 werden die Wachstumsraten, sowie die zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsraten der Satzkultivierung mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO als Substrat mit denen der Satzkultivierung mit lediglich H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> als Substrat verglichen. Im Vergleich zum Satzprozess ohne CO wurden in der Satzkultivierung mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/CO eine höhere Wachstumsrate und eine um 40 % erhöhte maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht. Obwohl die Acetatbildung in beiden Satzversuchen annähernd identisch verlief, wurde auf Grund der erhöhten Biomassebildung für die Satzkultivierung mit CO eine erniedrigte zellspezifische Acetatbildungsrate ermittelt. Die zusätzliche Bereitstellung von CO hatte demnach zwar einen

positiven Effekt auf die Biomassebildung, auf die Acetatbildung hingegen nicht. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen jedoch auch, dass ein Kohlenstoffmonoxidpartialdruck von 100 mbar bei einem Leistungseintrag von  $1,5 \text{ W L}^{-1}$  und die damit verbundene Kohlenstoffmonoxideintragsrate keinen negativen Einfluss auf die autotrophe Prozessleistung von *S. ovata* hat.

Obwohl in der Literatur durch den Einsatz des höher reduzierten CO als Substrat für acetogene Bakterien eine verstärkte Bildung von Ethanol beschrieben wurde (Köpke et al. 2011a), führte die Begasung mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$  bei der Satzkultivierung von *S. ovata* zu keiner Steigerung der zellspezifischen Ethanolbildungsrate und lediglich zu einer geringen Erhöhung der maximalen Ethanolkonzentration.

**Tabelle 7.2:** Vergleich der Wachstumsraten, sowie zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsraten der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Substratzusammensetzungen.

Substrat	$\mu, \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Acetat}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
$\text{H}_2, \text{CO}_2$	2,94	21,03	0,28
$\text{H}_2, \text{CO}_2, \text{CO}$	3,29	13,61	0,14

Auf der anderen Seite wurde durch das zusätzlich zur Verfügung stehende Substrat CO jedoch zum ersten Mal die Produktion von Pyruvat, Acetoin und 2,3-Butandiol und damit die autotrophe Bildung von C4-Molekülen durch *S. ovata* detektiert. Die Satzkultivierung von *S. ovata* mit den Substraten  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  hatte bislang lediglich zur Produktion von Formiat, Acetat, Ethanol und Lactat geführt (vergleiche Kapitel 5.3.8 und 7.1). Die detektierten Produkte Pyruvat und Acetoin sind Intermediate des Stoffwechselwegs zur Bildung von 2,3-Butandiol ( $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ), wohingegen 2,3-Butandiol ein Endprodukt des autotrophen Stoffwechsels acetogener Mikroorganismen darstellt (vergleiche Kapitel 3.1.3). Die Bildung der hochwertigen Chemikalie 2,3-Butandiol durch acetogene Bakterien wurde bislang lediglich für drei Vertreter der Gattung *Clostridium*, namentlich *C. autoethanolgenum*, *C. ljundahlii* und *C. ragsdalei* nachgewiesen, wobei Konzentrationen von bis zu  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  berichtet wurden (Köpke et al. 2011b).

Die Abgasanalytik der Satzkultivierungen zeigte, dass *S. ovata* CO parallel zu  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  metabolisiert. Durch den Vergleich der maximalen Gasaufnahmezeiten der beiden Satzkultivierungen wird zudem ersichtlich, dass *S. ovata*  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  im Versuch mit CO in gleichem Maß verstoffwechselte wie im Vergleichsversuch. Das zur Verfügung stehende CO wurde als zusätzliches Substrat verwendet, wobei die dadurch bereitgestellten Reduktions- und Kohlenstoffäquivalente fast ausschließlich für den Aufbau von Biomasse, sowie Pyruvat, Acetoin

und 2,3-Butandiol genutzt wurden. Die beobachtete CO<sub>2</sub>-Bildungsrate zum Ende des Satzversuchs muss auf die CO-Dehydrogenase zurückgeführt werden, welche CO zu CO<sub>2</sub> umsetzt (vergleiche Kapitel 3.1.2). Zum Ende der Satzkultivierung waren die Bakterienzellen nicht mehr in der Lage das gebildete CO<sub>2</sub> vollständig zu verstoffwechseln, weshalb eine CO<sub>2</sub>-Bildung detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse dieses Kapitels belegen, dass *S. ovata* in der Lage ist CO als Substrat zu verwenden. Neben Gasmischungen aus H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO können dabei auch Mischungen aus lediglich CO<sub>2</sub> und CO eingesetzt werden. Die Bereitstellung des höher reduzierten Substrats CO führte dabei zur Bildung von zusätzlichen Produkten, wobei besonders das C<sub>4</sub>-Molekül 2,3-Butandiol zu beachten ist.

### 7.2.2 Variation des Kohlenstoffmonoxid-Partialdrucks

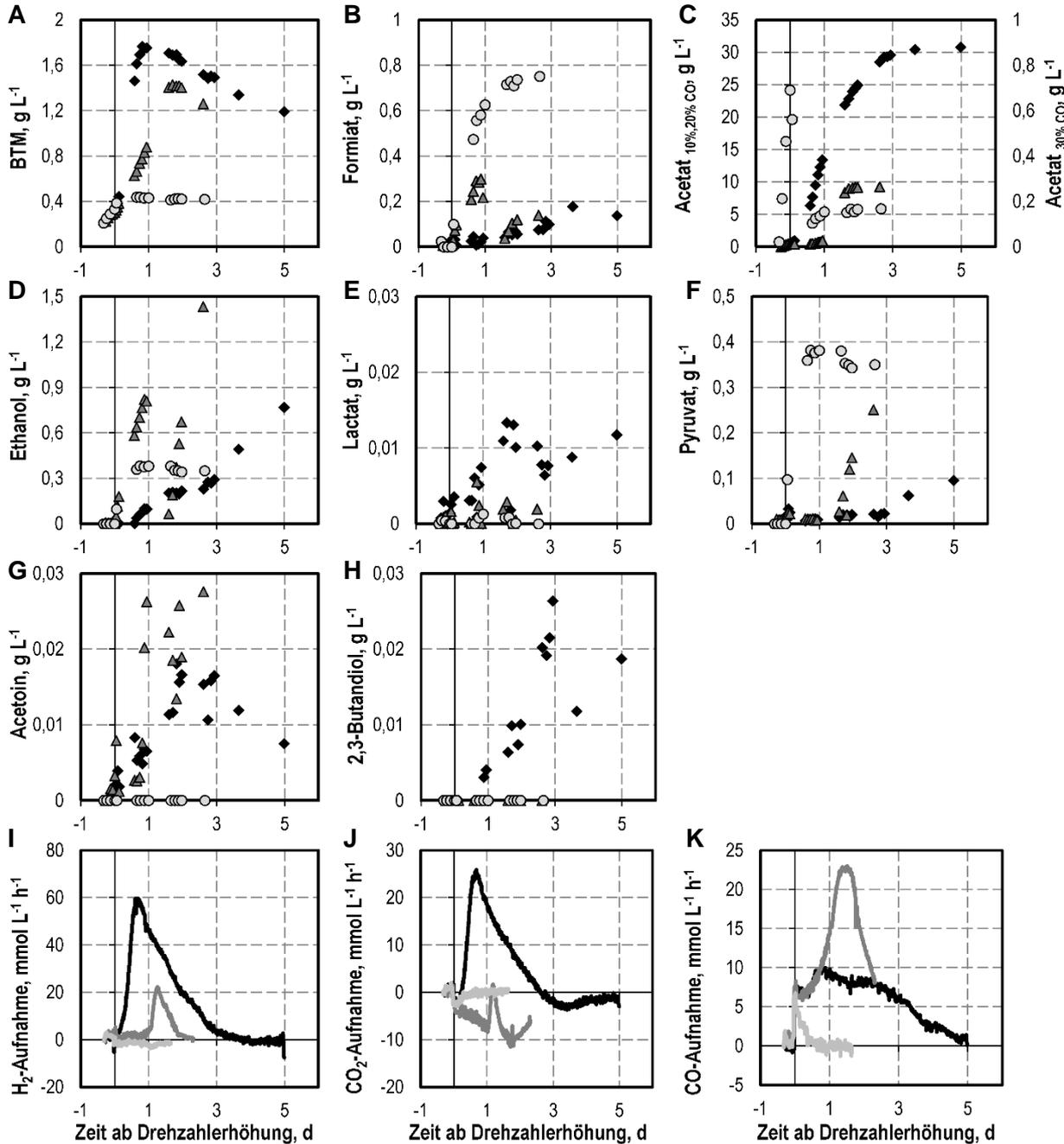
Da in Synthesegasmischungen, je nach vergastem Ausgangssubstrat, bis zu 60 % CO enthalten sind (Tirado-Acevedo et al. 2010), sollte im Rahmen dieses Kapitels untersucht werden, in wie weit sich eine Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks der Substrat-Gasmischung auf die autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* auswirkt.

In Abbildung 7.6 sind die Ergebnisse dreier autotropher Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen vergleichend dargestellt, wobei der Kohlenstoffmonoxidpartialdruck im zugeführten Gasvolumenstrom 100 mbar, 200 mbar oder 300 mbar betrug.

Vor der Erhöhung der Rührerdrehzahl waren die Verläufe der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen sowie der Gasaufnahmeraten in allen drei Versuchen annähernd gleich. Die Drehzahlerhöhung auf 600 rpm führte jedoch zu großen Unterschieden zwischen den einzelnen Satzkultivierungen. In der Satzkultivierung mit dem höchsten Kohlenstoffmonoxidpartialdruck wurde ab diesem Zeitpunkt keine Biomassebildung mehr beobachtet. Im Satzversuch mit 200 mbar CO verlief das Wachstum linear und erreichte eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 1,41 g L<sup>-1</sup>. Das größte Wachstum wurde in der Satzkultivierung mit lediglich 100 mbar CO detektiert. Die maximale Biotrockenmassekonzentration lag hier bei 1,70 g L<sup>-1</sup>.

Die Formiatbildung setzte in allen Versuchen erst nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl ein. Je höher der zugeführte Kohlenstoffmonoxidpartialdruck war, desto höher war auch die Formiatproduktion. Acetat wurde in allen Satzprozessen von Beginn an gebildet. Während die Drehzahlerhöhung in den Satzkultivierungen mit 200 mbar CO und 300 mbar CO zu einer Metabolisierung des bereits gebildeten Acetats führte, wurde im Satzversuch mit 100 mbar keine

Abnahme der Acetatkonzentration verzeichnet. Eine erneute Acetatproduktion wurde im Versuch mit 200 mbar CO erst wieder 1 Tag nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl detektiert. Die maximal erreichte Acetatkonzentration war umso höher, je niedriger der eingestellte Kohlenstoffmonoxidpartialdruck war.



**Abbildung 7.6:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen mit verschiedenen Substratzusammensetzungen. (◆/—) 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO; (△/—) 650 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 200 mbar CO. (○/—) 600 mbar H<sub>2</sub>, 100 mbar CO<sub>2</sub> und 300 mbar CO. Temperatur 30 °C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Formiatkonzentrationen; C) Acetatkonzentrationen; D) Ethanolkonzentrationen; E) Lactatkonzentrationen; F) Pyruvatkonzentrationen; G) Acetoinkonzentrationen; H) 2,3-Butandiolkonzentrationen; I) Wasserstoffaufnahmeraten; J) Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten; K) Kohlenstoffmonoxidaufnahmeraten.

Die Ethanolproduktion war hingegen nach der Drehzahlerhöhung umso höher, je höher der Kohlenstoffmonoxidpartialdruck war. Bei 300 mbar CO brach die Ethanolbildung jedoch nach 0,5 Tagen abrupt ab, weshalb in diesem Versuch lediglich eine finale Ethanolkonzentration von  $0,38 \text{ g L}^{-1}$  detektiert wurde. In der Satzkultivierung mit 200 mbar CO wurde das gebildete Ethanol zwischen 1 Tag und 1,5 Tagen wieder metabolisiert. Ab 1,5 Tagen wurde anschließend eine erneute Ethanolbildung beobachtet, wobei eine maximale Konzentration von  $1,43 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde. Im Satzversuch mit dem geringsten CO-Partialdruck erfolgte eine annähernd lineare Ethanolproduktion bis zu einer finalen Konzentration von  $0,77 \text{ g L}^{-1}$ .

Lactat wurde in allen drei Satzprozessen lediglich bis zu einer Konzentration von höchstens  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  gebildet. Eine Pyruvatbildung wurde ebenfalls in allen Satzkultivierungen beobachtet, wobei die maximale Konzentration umso höher war, je höher der zugeführte Kohlenstoffmonoxidpartialdruck war. Acetoin wurde nur in den Satzversuchen mit 100 mbar beziehungsweise 200 mbar CO detektiert. Die Bildung von 2,3-Butandiol erfolgte ausschließlich in der Satzkultivierung mit dem niedrigsten Kohlenstoffmonoxidpartialdruck.

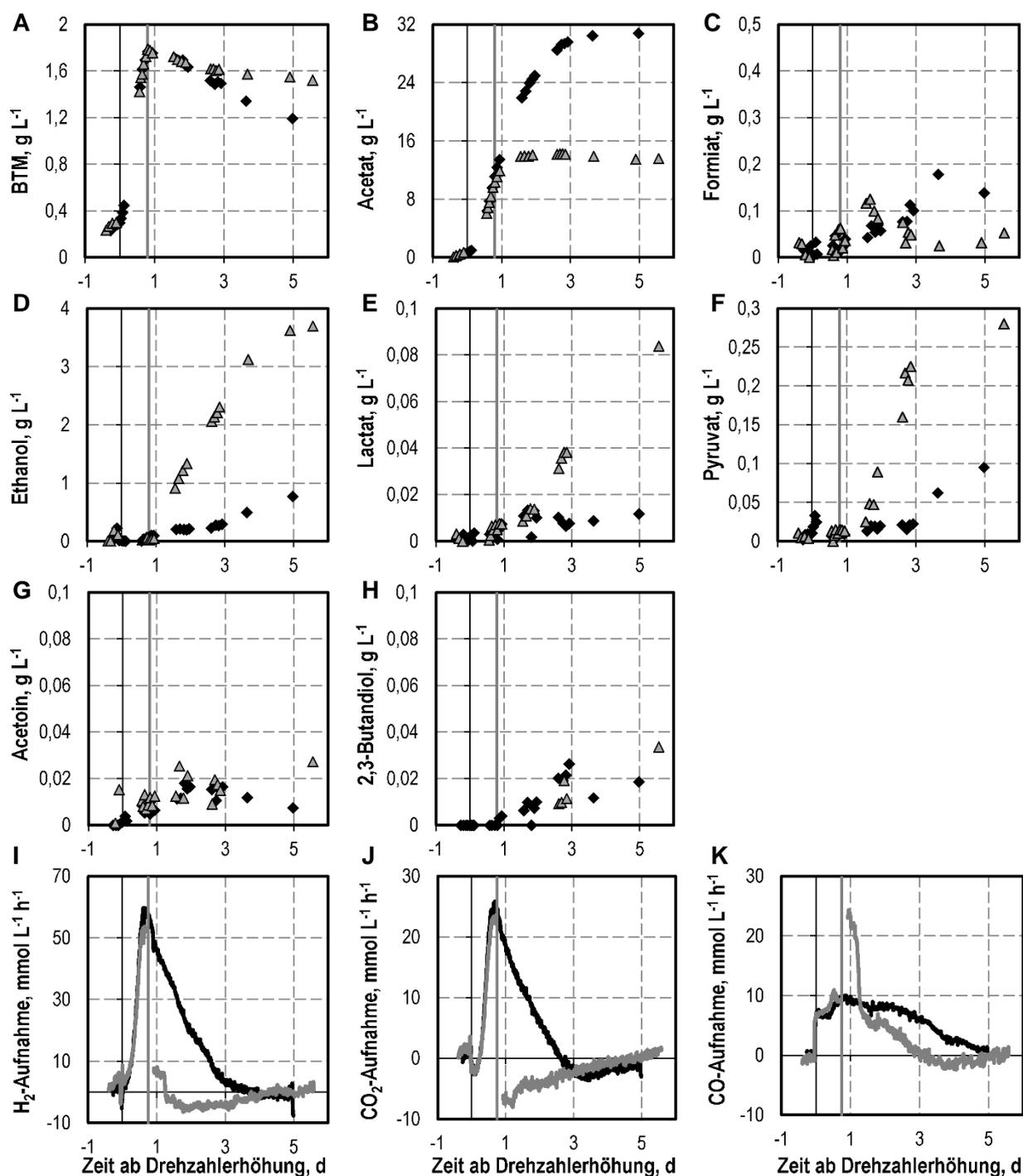
Die Aufnahmeraten für Wasserstoff waren im Satzversuch mit 100 mbar CO am größten. In der Satzkultivierung mit 200 mbar kam es erst einen Tag nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl zu einer signifikanten Wasserstoffaufnahme. Im Satzprozess mit dem höchsten Kohlenstoffmonoxidpartialdruck konnte nach der Drehzahlerhöhung keine Aufnahme von Wasserstoff mehr detektiert werden. In allen Satzkultivierungen konnte nach der Erhöhung der Rührerdrehzahl eine  $\text{CO}_2$ -Bildung detektiert werden. Während bei der Satzkultivierung mit dem niedrigsten CO-Partialdruck kurze Zeit später erneut eine  $\text{CO}_2$ -Aufnahme detektiert wurde, konnte im Versuch mit 300 mbar CO nach 0,2 Tagen weder eine  $\text{CO}_2$ -Aufnahme noch eine  $\text{CO}_2$ -Bildung beobachtet werden. Im Satzprozess mit 200 mbar CO nahm die  $\text{CO}_2$ -Bildung bis 1 Tag nach der Drehzahlerhöhung kontinuierlich ab, bevor es nach einem sprunghaften Abfall erneut zu einer kurzzeitigen und geringen  $\text{CO}_2$ -Aufnahme kam. Bei Kohlenstoffmonoxid führte die Drehzahlerhöhung in allen Satzversuchen zu einem abrupten Anstieg der Aufnahmerate auf etwa  $7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . In der Satzkultivierung mit dem höchsten CO-Partialdruck sank die CO-Aufnahme anschließend innerhalb von 0,5 Tagen wieder auf null ab. Im Satzversuch mit dem geringsten CO-Partialdruck blieb die CO-Aufnahmerate bis Tag 2 in etwa konstant und sank dann bis Tag 5 auf null ab. Im Satzprozess mit 200 mbar CO hingegen stieg die CO-Aufnahmerate zunächst weiter auf maximal  $23 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  an bevor anschließend ein steiler Abfall erfolgte.

Durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl und der damit einhergehenden Erhöhung der Kohlenstoffmonoxidtransferrate, kam es im Satzversuch mit 300 mbar CO zu einer sofortigen Umsetzung des bereits gebildeten Acetats zu Ethanol. Da zu diesem Zeitpunkt jedoch lediglich

0,7 g L<sup>-1</sup> Acetat vorlagen und die erhöhte Kohlenstoffmonoxidtransferrate einen negativen Einfluss auf den autotrophen Stoffwechsel von *S. ovata* hatte, was vor allem durch die Stagnation des Wachstums verdeutlicht wird, wurden in dieser Satzkultivierung lediglich 0,38 g L<sup>-1</sup> Ethanol gebildet. Um den Effekt der abrupten Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks weiter zu untersuchen und dabei den negativen Einfluss auf den Stoffwechsel von *S. ovata* zu umgehen, wurde ein weiterer Satzprozess durchgeführt. Hierbei wurde zunächst mit einem CO-Partialdruck von 100 mbar begast. Nach dem Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration wurde der CO-Partialdruck abrupt auf 300 mbar gesteigert. In Abbildung 7.7 sind die Ergebnisse des beschriebenen Satzversuchs vergleichend zur Satzkultivierung bei einem konstanten Kohlenstoffmonoxidpartialdruck von 100 mbar dargestellt.

Die abrupte Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks führte im Gegensatz zur Satzkultivierung mit konstant 100 mbar CO zu einer geringeren Abnahme der Biotrockenmassekonzentration bis zum Ende der Satzkultivierung. Bei der Acetatbildung führte die Partialdruckerhöhung von Kohlenstoffmonoxid zur Ausbildung einer annähernd konstanten Acetatkonzentration von etwa 14 g L<sup>-1</sup>. Im Gegensatz dazu kam es nach der Erhöhung des CO-Partialdrucks zu einem starken Anstieg der Ethanolkonzentration bis zu einem finalen Wert von 3,70 g L<sup>-1</sup>. Die Lactat- und Pyruvatbildung wurde ebenfalls positiv beeinflusst, wobei die finale Lactatkonzentration im Gegensatz zum Vergleichsversuch etwa 6-fach erhöht war und die Pyruvatkonzentration etwa 3-fach. Bei der Formiat-, Acetoin- und 2,3-Butandiolbildung konnte kein Einfluss der abrupten Erhöhung des CO-Partialdrucks beobachtet werden.

Bei den Wasserstoff- und Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten führte die Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks zu einem steilen Abfall der Raten. Anschließend konnte sogar die Bildung der beiden Gase detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks für CO zu einem abrupten, kurzzeitigen Anstieg der Gasaufnahme auf bis zu 24 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Abbildung 7.7:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem kontinuierlich begasteten 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen mit verschiedenen Substratzusammensetzungen. (♦/—) 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO; (Δ/—) 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO. Die vertikale durchgezogene graue Linie markiert den Zeitpunkt, an dem in dieser Kultivierung die Gasmischung auf 600 mbar H<sub>2</sub>, 100 mbar CO<sub>2</sub> und 300 mbar CO umgestellt wurde. Temperatur 30 °C; pH 7,0. A) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); B) Formiatkonzentrationen; C) Acetatkonzentrationen; D) Ethanolkonzentrationen; E) Lactatkonzentrationen; F) Pyruvatkonzentrationen; G) Acetoinkonzentrationen; H) 2,3-Butandiolkonzentrationen; I) Wasserstoffaufnahme; J) Kohlenstoffdioxidaufnahme; K) Kohlenstoffmonoxidaufnahme.

## Diskussion

Die Satzkultivierungen bei CO-Partialdrücken von 100 mbar, 200 mbar und 300 mbar zeigen, dass eine Erhöhung des CO-Partialdrucks einen negativen Einfluss auf die autotrophen Wachstums- und Acetatbildungsraten von *S. ovata* hat (vergleiche Tabelle 7.3). Umso höher der eingestellte Partialdruck war, desto niedriger waren die detektierten Wachstums- und Acetatbildungsraten und auch die maximal beobachteten Konzentrationen der angegebenen Prozessgrößen. Im Satzprozess mit 300 mbar CO konnten die Bakterien nach der Drehzahlerhöhung und der damit einhergehenden Erhöhung der Kohlenstoffmonoxid-eintragsrate lediglich noch den Erhaltungsstoffwechsel aufrechterhalten, eine Biomassebildung war nicht mehr möglich. Die maximale Biotrockenmassekonzentration betrug in der Satzkultivierung mit 300 mbar CO nur 5 % der maximalen Biotrockenmassekonzentration des Satzprozesses mit 100 mbar CO. Der finale Wert der Acetatkonzentration betrug sogar nur lediglich 0,6 % der Acetatkonzentration des Satzversuchs mit dem niedrigsten CO-Partialdruck. Neben dem Wachstum und der Acetatbildung hatte die Erhöhung des CO-Partialdrucks auch einen negativen Effekt auf die Lactat- und die 2,3-Butandiolbildung, was wiederum zu einer erhöhten Akkumulation der Intermediate Pyruvat und Acetoin führte. In der Literatur ist beschrieben, dass CO auf Grund seiner chemischen Eigenschaften in der Lage ist stabile Komplexe mit bestimmten Metallbindestellen in Enzymen zu bilden, was CO zu einem starken Inhibitor für verschiedene Metalloenzyme macht (Ragsdale 2004). Da am Acetyl-CoA-Stoffwechselweg mehrere Metalloenzyme, unter anderen die bifunktionelle CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase, die Formiatdehydrogenase, die Hydrogenase sowie die Alkoholdehydrogenase beteiligt sind (Ragsdale und Pierce 2008), ist eine Inhibierung des autotrophen Stoffwechsels von *S. ovata* durch erhöhte CO-Partialdrücke nicht verwunderlich. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen acetogenen Mikroorganismen gemacht. Für *C. carboxidivorans* wurde beispielsweise ebenfalls eine Verringerung der Acetatkonzentration durch Erhöhung des CO-Partialdrucks beschrieben (Hurst und Lewis 2010). Bei *C. ljungdahlii* traten umso längere Verzögerungsphasen bei der Biotrockenmassebildung auf, je höher der CO-Partialdruck war (Vega et al. 1989). Heiskanen et al. (2007) beobachteten, dass *B. methylotrophicum* bei Kultivierungen mit Synthesegasmischungen erst in der Lage war H<sub>2</sub> zu verstoffwechseln, wenn alles CO aufgebraucht war, was auf eine Inhibierung der Hydrogenasen von *B. methylotrophicum* durch CO hindeutet. Auch bei *S. ovata* ist eine Inhibierung der Hydrogenasen durch hohe CO-Konzentrationen denkbar, da es bei den Satzkultivierungen mit 200 mbar und 300 mbar CO durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl und der damit einhergehenden Erhöhung der Kohlenstoffmonoxidtransferrate zu einem, wenn auch nur vorübergehenden Abbruch der H<sub>2</sub>-Aufnahme kam (vergleiche Abbildung 7.7 I). Auch für *C. ljungdahlii* und *E. limosum* konnte

eine Hydrogenaseaktivität lediglich bei geringen CO-Konzentrationen beobachtet werden (Najafpour und Younesi 2006; Genthner und Bryant. 1982).

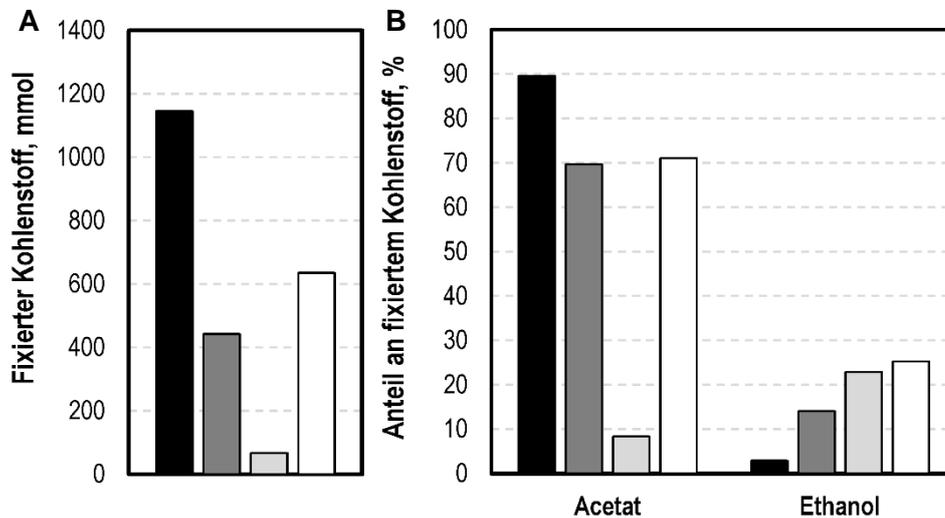
**Tabelle 7.3:** Vergleich der Wachstumsraten, sowie der volumetrischen und zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsraten der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen CO-Partialdrücken.

pCO, mbar	$\mu$ , d <sup>-1</sup>	Q <sub>p,Acetat</sub> , g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	q <sub>p,Acetat</sub> , g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Q <sub>p,Ethanol</sub> , g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	q <sub>p,Ethanol</sub> , g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
100	3,29	21,09	13,61	0,25	0,14
200	1,25	16,09	13,74	1,47	1,04
300	-	0,35	0,82	0,66	1,65
100 → 300	3,23	20,88	13,85	1,23	0,74

Im Kontrast zur Inhibierung der Wachstums- und Acetatbildungsrate führte die Erhöhung des CO-Partialdrucks jedoch auch zu einer Steigerung der Ethanolbildung. Besonders auffallend war hierbei die zellspezifische Ethanolbildungsrate von 1,65 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bei der Satzkultivierung mit 300 mbar CO (vergleiche Tabelle 7.3). Die Erhöhung der Rührerdrehzahl führte in diesem Satzversuch zu einer Umsetzung des gesamten, bis dahin gebildeten Acetats zu Ethanol. Auf Grund der starken Inhibierung von *S. ovata* durch die hohe CO-Konzentration konnte jedoch nach 0,5 Tagen keine weitere Ethanolproduktion mehr beobachtet werden. Eine Steigerung der Ethanolbildung durch einen erhöhten CO-Partialdruck wurde ebenfalls für die acetogenen Mikroorganismen *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii* beobachtet und hatte in beiden Fällen eine Verschiebung des Produktspektrums von Acetat hin zu Ethanol zur Folge (Hurst und Lewis 2010; Najafpour und Younesi 2006). Abbildung 7.8 B verdeutlicht, dass auch bei *S. ovata* durch die Erhöhung des CO-Partialdrucks eine Verschiebung des Produktspektrums von der Acidogenese hin zur Solventogenese erfolgte. Während in der Satzkultivierung mit 100 mbar CO 90 % des während des Satzversuchs fixierten Kohlenstoffs in Acetat und nur lediglich 3 % in Ethanol wiedergefunden werden konnten, wurden im Satzprozess mit 300 mbar CO lediglich 8 % des Kohlenstoffs in Acetat und 23 % in Ethanol fixiert.

Die erhöhte Ethanolbildung beziehungsweise Umsetzung von Acetat zu Ethanol bei erhöhten CO-Partialdrücken kann dabei folgendermaßen erklärt werden. Durch die Steigerung des CO-Partialdrucks im Gasvolumenstrom wird das Gleichgewicht der reversiblen Enzymreaktion der CO-Dehydrogenase weiter auf die Seite der Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> verschoben. Bei der Oxidation von 1 Mol CO entstehen dabei neben 1 Mol CO<sub>2</sub> auch 2 Mol Reduktionsäquivalente (vergleiche Kapitel 3.1.2). Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt, werden bei der Umsetzung

von Acetyl-CoA beziehungsweise Acetat zu Acetaldehyd und weiter zu Ethanol insgesamt 4 Reduktionsäquivalente benötigt. Durch die bei hohen CO-Partialdrücken vermehrt gebildeten Reduktionsäquivalente kann folglich eine gesteigerte Bildung von Ethanol erreicht werden (Hurst und Lewis 2010).



**Abbildung 7.8:** Graphische Darstellung der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff (A) und der prozentualen Anteile des Kohlenstoffs in den Produkten Acetat und Ethanol am gesamt fixiertem Kohlenstoff (B) während der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* im Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen CO-Partialdrücken.  $p_{CO}$  100 mbar (schwarz);  $p_{CO}$  200 mbar (dunkelgrau);  $p_{CO}$  300 mbar (hellgrau);  $p_{CO}$  100 → 300 mbar (weiß).

Neben der Verschiebung des Produktspektrums führte die Erhöhung des CO-Partialdrucks bei der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* jedoch auch zu einer drastischen Abnahme der Gesamtmenge an Kohlenstoff, die während der Prozesse fixiert wurde. Im Versuch mit 300 mbar CO wurde 94 % weniger Kohlenstoff fixiert als in der Vergleichskultivierung mit 100 mbar. Diese Tatsache weist erneut auf eine starke Inhibierung des autotrophen Stoffwechsels von *S. ovata* durch hohe CO-Konzentrationen hin.

Um die Inhibierung von *S. ovata* durch hohe CO-Konzentrationen zu umgehen und trotzdem den Vorteil der Verschiebung des Produktspektrums hin zu Ethanol durch hohe CO-Partialdrücke zu nutzen, wurde ein weiterer Satzversuch durchgeführt. In diesem Satzprozess wurde zu Beginn mit einem CO-Partialdruck von 100 mbar begast. Mit dem Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration wurde der CO-Partialdruck abrupt auf 300 mbar erhöht. Die maximale Wachstums-, sowie Acetat- und Ethanolbildungsrate dieser Satzkultivierung sind ebenfalls in Tabelle 7.3 angegeben. Die Wachstumsrate und die Acetatbildungsrate sind identisch zu den Raten des Satzversuch mit konstant 100 mbar CO, da die Maxima dieser Parameter vor der Erhöhung des CO-Partialdrucks detektiert wurden. Die Erhöhung des CO-Partialdrucks auf 300 mbar führte wie erwartet zu einer Verschiebung des autotrophen Stoffwechsels von *S. ovata* von der Acidogenese hin zur Solventogenese, wobei

eine volumetrische Ethanolbildungsrate von  $1,23 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  detektiert wurde. Die in Abbildung 7.8 dargestellte Menge an gesamt fixiertem Kohlenstoff und die Anteile des Kohlenstoffs in Acetat und Ethanol am Gesamtkohlenstoff zeigen deutlich, dass die angewandte Prozessführungsstrategie zu einer erfolgreichen Verschiebung des Produktspektrums von Acetat hin zu Ethanol führte. Im Vergleich zum Satzprozess mit konstant 100 mbar CO wurde eine um 380 % höhere finale Ethanolkonzentration erreicht. Zudem wurde durch diese Prozessführungsstrategie die Inhibierung von *S. ovata* durch einen hohen CO-Partialdruck reduziert, wodurch während des gesamten Satzversuchs 636 mmol Kohlenstoff fixiert wurden, was einer Steigerung von 44% im Gegensatz zur Satzkultivierung mit konstant 200 mbar CO und 450 % im Gegensatz zum Satzversuch mit konstant 300 mbar CO entspricht.

Wie in den Versuchen mit konstant erhöhten CO-Partialdrücken führte eine erhöhte CO-Konzentration auch in der letzteren Satzkultivierung zur Akkumulation des Intermediates Pyruvat (vergleiche Abbildung 7.6 und Abbildung 7.7). Pyruvat ist ein Zwischenprodukt des Stoffwechselwegs hin zu Lactat, aber auch zu 2,3-Butandiol. Während die Konzentration an Lactat durch die Erhöhung des CO-Partialdruck ebenfalls gesteigert werden konnte, wurde für 2,3-Butandiol keine vermehrte Produktion detektiert. Auch für das letzte Intermediat der Bildung von 2,3-Butandiol, Acetoin, konnten keine erhöhten Konzentrationen gemessen werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass bei *S. ovata* die Enzyme des Stoffwechselwegs von Pyruvat hin zu 2,3-Butandiol, die Acetolactatsynthase, die Acetolactatdecarboxylase und die 2,3-Butandioldehydrogenase, durch hohe CO-Konzentrationen inhibiert werden. Der Abbruch der  $\text{H}_2$ -Aufnahme nach der Erhöhung des CO-Partialdrucks weist wiederum auf eine Inhibierung der Hydrogenasen von *S. ovata* durch hohe CO-Partialdrücke hin.

Zum ersten Mal wurde im Rahmen dieses Versuchs die autotrophe Produktion von Wasserstoff durch *S. ovata* beobachtet. Strikt anaeroben Mikroorganismen gewinnen die Elektronen, welche für die Bildung von Wasserstoff gebraucht werden, aus der Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA und  $\text{CO}_2$ . Anschließend werden die Elektronen auf Ferredoxin und weiter auf eine Hydrogenase übertragen, welche schließlich die Bildung von Wasserstoff katalysiert (Lee et al. 2010).

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die Satzkultivierung von *S. ovata* bei erhöhten CO-Partialdrücken zu einer Verschiebung des Produktspektrums hin zu Ethanol aber auch zu einer starken Inhibierung des autotrophen Stoffwechsels dieses Bakteriums führt. Durch eine geschickte Prozessführung ist es jedoch möglich die Inhibierung zu minimieren und gleichzeitige eine Verschiebung der Acidogenese hin zur Solventogenese zu ermöglichen.

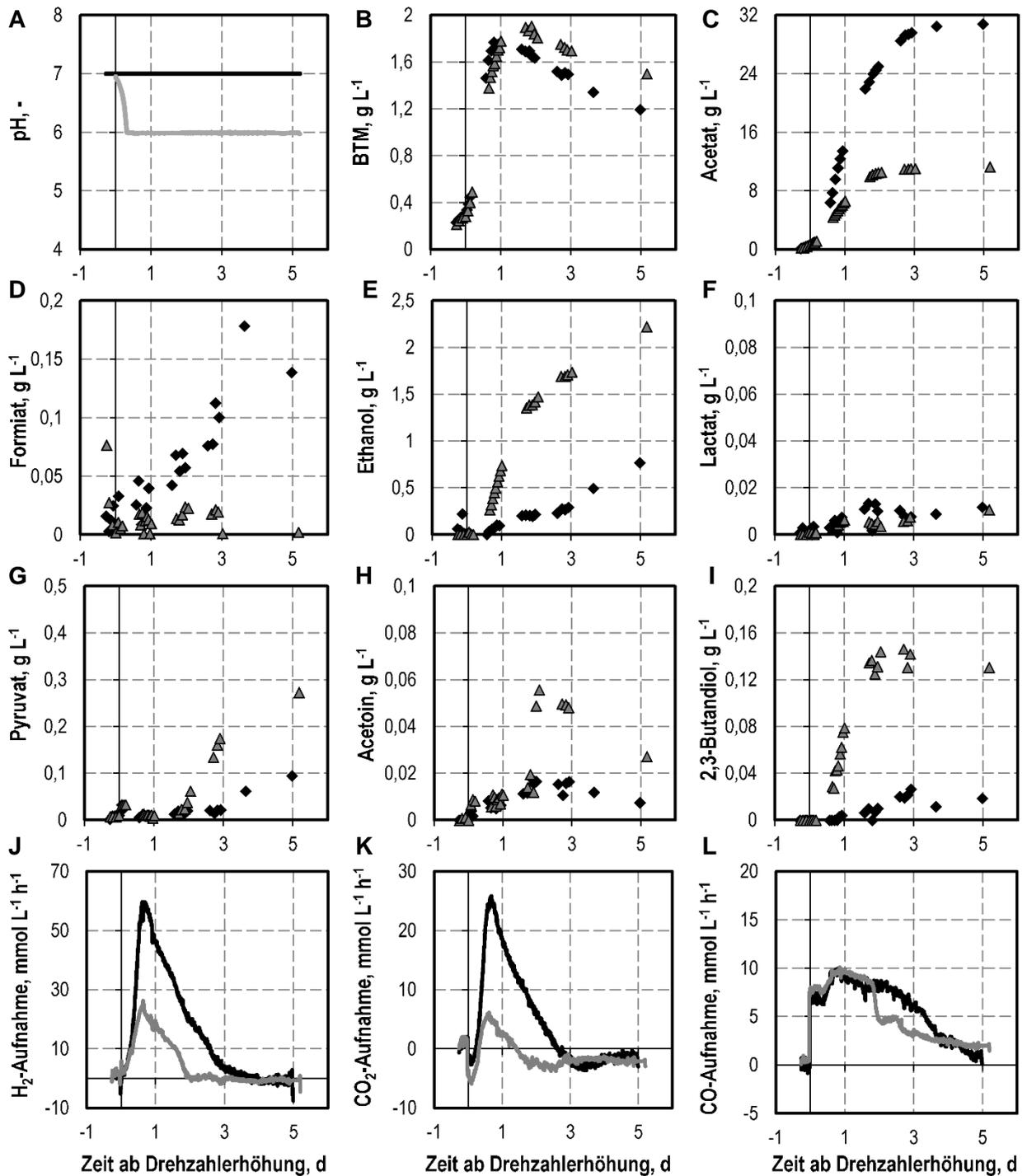
### 7.2.3 Bedeutung des pH

Wie in Kapitel 7.1 bereits gezeigt, führt eine Erniedrigung des Fermentations-pH bei der Satzkultivierung von *S. ovata* zur einer Verschiebung des autotrophen Stoffwechsels von der Acidogenese hin zur Solventogenese und so zu einer erhöhten Ethanolproduktion. Während der Satzkultivierung mit kontinuierlicher Begasung durch  $H_2$  und  $CO_2$  stellte sich ein Fermentations-pH von 6,0 als optimaler pH für die autotrophe Bildung von Ethanol durch *S. ovata* heraus. Durch die Absenkung des Kultivierungs-pH von 7,0 auf 6,0 konnte die maximale Konzentration an Ethanol während der Satzkultivierung von *S. ovata* um 680 % von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  auf  $3,30 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden.

In Kapitel 7.2.1 wurde zudem gezeigt, dass auch die Bereitstellung von CO als zusätzliches Substrat zu einer Steigerung der Ethanolproduktion durch *S. ovata* führt. In der Satzkultivierung mit einer Begasung durch  $H_2$ ,  $CO_2$  und CO wurde im Gegensatz zur Satzkultivierung mit einer Begasung durch lediglich  $H_2$  und  $CO_2$  eine annähernd doppelt so hohe maximale Ethanolkonzentration ( $0,77 \text{ g L}^{-1}$ ) detektiert.

Auf Grund der beschriebenen Beobachtungen, sollte folglich untersucht werden, ob sich eine Erniedrigung des Kultivierungs-pH auch bei einer Begasung mit 750 mbar  $H_2$ , 150 mbar  $CO_2$  und 100 mbar CO positiv auf die Ethanolbildung durch *S. ovata* auswirkt. Hierfür wurde *S. ovata* autotroph im Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen (vergleiche Kapitel 5.2) kultiviert, wobei gleichzeitig mit der automatisierten Drehzahlerhöhung der pH-Sollwert auf 6,0 erniedrigt wurde. Das Absinken des pH in der Fermentationsbrühe erfolgte dabei durch die Produktion von Acetat und den Verzicht auf eine Gegentitration bis zum Erreichen des eingestellten pH-Sollwerts. In Abbildung 7.9 ist der durchgeführte Satzversuch vergleichend zu einer autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* bei pH 7,0 dargestellt.

Die Biotrockenmassebildung verlief in beiden Satzkultivierungen vergleichbar, wobei im Satzversuch mit pH 6,0 eine um  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  höhere Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde. Bei der Acetatbildung führte die Erniedrigung des Fermentations-pH zu einer Verringerung der Produktion und auch die maximal detektierte Acetatkonzentration war mit  $9,8 \text{ g L}^{-1}$  deutlich geringer als in der Vergleichskultivierung ( $30,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Die Akkumulation des Intermediates Formiat wurde in der Satzkultivierung mit pH 6,0 nur in sehr geringen Mengen beobachtet. Im Gegensatz dazu hatte der niedrigere Fermentations-pH einen positiven Effekt auf die Ethanolbildung und führte zu einer maximalen Ethanolkonzentration von  $2,22 \text{ g L}^{-1}$ , wohingegen im Satzversuch mit pH 7,0 nur  $0,77 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol detektiert wurden. Auf die Lactatbildung hatte die Variation des Fermentations-pH keinen Einfluss.



**Abbildung 7.9:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen mit einer kontinuierlichen Begasung durch 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO. Der pH wurde nach der Drehzahlerhöhung entweder auf pH 7,0 (◆/—) oder auf pH 6,0 (△/—) geregelt. Temperatur: 30 °C. A) pH-Verläufe; B) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); C) Formiatkonzentrationen; D) Acetatkonzentrationen; E) Ethanolkonzentrationen; F) Lactatkonzentrationen; G) Pyruvatkonzentrationen; H) Acetoinkonzentrationen; I) 2,3-Butandiolkonzentrationen; J) Wasserstoffaufnahme-raten; K) Kohlenstoffdioxid-aufnahmeraten; L) Kohlenstoffmonoxid-aufnahmeraten.

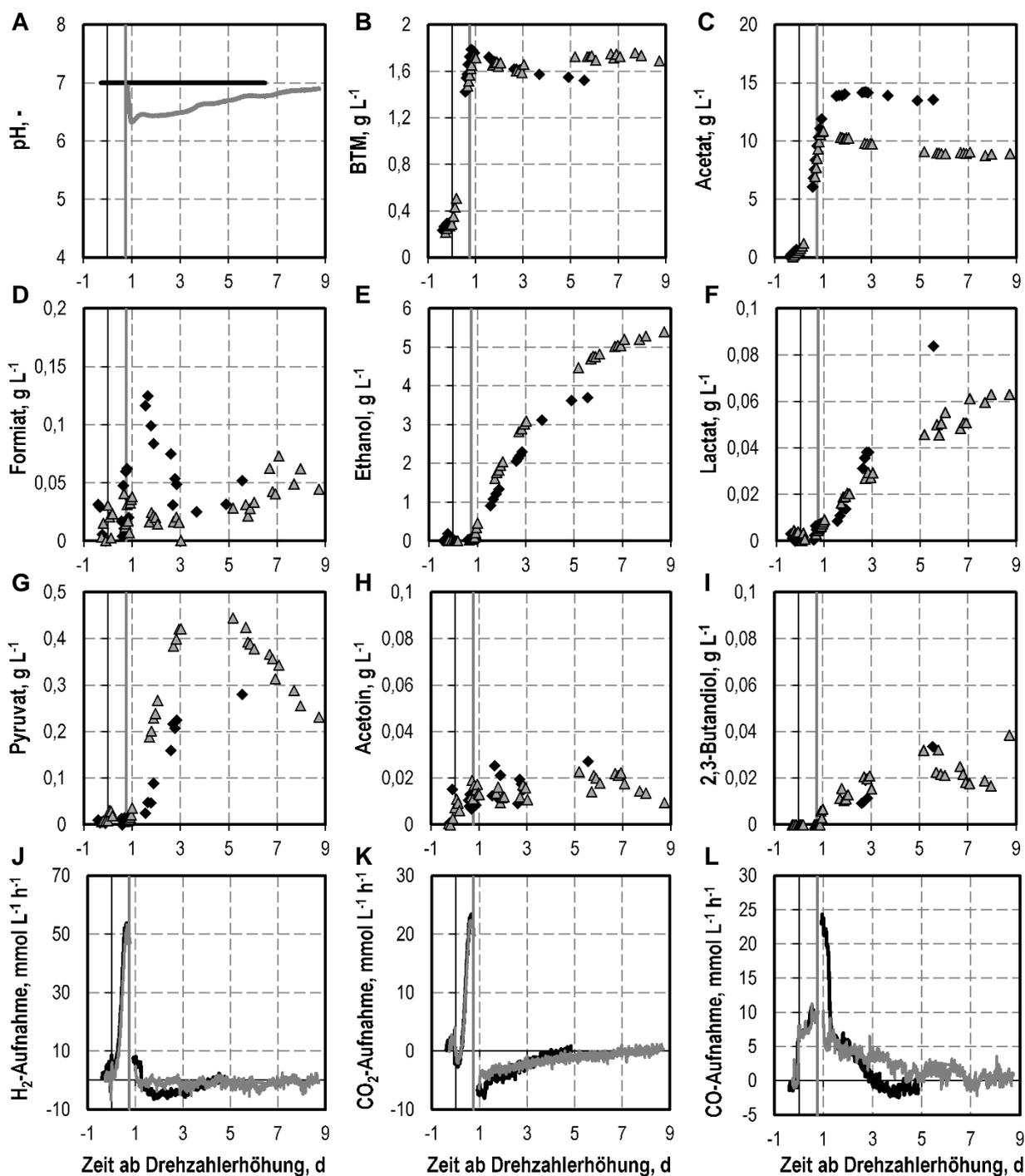
Auch bei den Gasaufnahmeleistungen konnte ein starker Einfluss der pH-Einstellung beobachtet werden. Während ein Fermentations-pH von 6,0 für H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zu stark reduzierten Gasaufnahmeleistungen führte, wurde für CO die gleiche maximale Gasaufnahme detektiert wie im Vergleichsversuch.

Neben dem positiven Einfluss eines erniedrigten Fermentations-pH und der zusätzlichen Bereitstellung des Substrats CO auf die Ethanolbildung durch *S. ovata* wurde in Kapitel 7.2.2 zudem eine alternative Begasungsstrategie zur Produktion von Ethanol etabliert. Bei dieser Strategie wird zunächst mit einem CO-Partialdruck von 100 mbar begast. Beim Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration wird der CO-Partialdruck abrupt auf 300 mbar gesteigert, wodurch eine erhöhte Ethanolbildung hervorgerufen wird. Im Gegensatz zum Satzprozess mit einem konstanten CO-Partialdruck von 100 mbar konnte die maximale Ethanolkonzentration durch diese Prozessführungsstrategie um 380 % auf 3,70 g L<sup>-1</sup> gesteigert werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse sollte weiterhin untersucht werden, ob eine Kombination aus der abrupten Erhöhung des CO-Partialdrucks und einer Erniedrigung des Fermentations-pH zu einer weiteren Steigerung der Ethanolbildung durch *S. ovata* führt.

In Abbildung 7.10 ist eine autotrophe Satz Kultivierung von *S. ovata* dargestellt bei der mit dem Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration der CO-Partialdruck auf 300 mbar erhöht wurde und der pH-Sollwert auf 6,0 erniedrigt wurde. Das Absinken des pH in der Fermentationslösung erfolgte dabei wiederum durch die Produktion von Acetat und den Verzicht auf eine Gegendotration. Der Versuch ist vergleichend zu einer autotrophen Satz Kultivierung von *S. ovata* dargestellt, bei der zwar der CO-Partialdruck beim Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration auf 300 mbar erhöht wurde, der Fermentations-pH jedoch konstant auf 7,0 geregelt wurde.

Im Zeitraum vor der Umstellung des CO-Partialdrucks und damit der Erniedrigung des Fermentations-pH waren die Verläufe aller detektierten Parameter in beiden Satz Kultivierungen gleich. Zudem wurde dieselbe maximale Biotrockenmassekonzentration (etwa 1,70 g L<sup>-1</sup>) erreicht. Nach dem Herabsetzen des Fermentations-pH blieb die Biotrockenmassekonzentration in der zugehörigen Satz Kultivierung konstant, während sie in der Vergleichskultivierung bis zum Ende des Versuchs leicht absank. Im Satzprozess mit pH 7,0 stieg die Acetatkonzentration nach der Umstellung des CO-Partialdrucks zunächst weiterhin an, bevor sich anschließend nach etwa einem Tag eine konstante Acetatkonzentration von ungefähr 14 g L<sup>-1</sup> einstellte.



**Abbildung 7.10:** Autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen. Die kontinuierliche Begasung erfolgte zu Beginn durch eine Mischung aus 750 mbar H<sub>2</sub>, 150 mbar CO<sub>2</sub> und 100 mbar CO. Die vertikale durchgezogene graue Linie markiert den Zeitpunkt, an dem die Gasmischung in beiden Satzkultivierungen auf 600 mbar H<sub>2</sub>, 100 mbar CO<sub>2</sub> und 300 mbar CO umgestellt wurde. Der pH wurde entweder während des gesamten Satzversuchs auf pH 7,0 geregelt (♦/—) oder zum Zeitpunkt der Umstellung der Gasmischung auf pH 6,0 (Δ/—) abgesenkt. Temperatur: 30 °C. A) pH-Verläufe; B) Biotrockenmassekonzentrationen (BTM); C) Formiatkonzentrationen; D) Acetatkonzentrationen; E) Ethanolkonzentrationen; F) Lactatkonzentrationen; G) Pyruvatkonzentrationen; H) Acetoinkonzentrationen; I) 2,3-Butandiol-konzentrationen; J) Wasserstoff-aufnahmeraten; K) Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten L) Kohlenstoffmonoxidaufnahmeraten.

Im Satzprozess mit einem pH-Sollwert von 6,0 konnte kurz nach der Erhöhung des CO-Partialdrucks und der gleichzeitigen Erniedrigung des pH-Sollwerts keine Zunahme der Acetatkonzentration mehr beobachtet werden. Durch den Einbruch der Acetatbildung kam es dabei auch zu einer Stagnation im Absinken des pH, weshalb der niedrigste detektierte pH während dieser Satzkultivierung nur lediglich 6,3 und nicht wie als Sollwert vorgegeben 6,0 betrug. Ab etwa einem Tag wurde eine Metabolisierung von Acetat und der damit verbundene Anstieg des Fermentations-pH bis auf 6,9 zum Ende der Satzkultivierung beobachtet.

Die Formiat-, Acetoin- und 2,3-Butandiolbildung wurden durch die pH-Umstellung nicht beeinflusst. Auf die Ethanolbildung hingegen hatte die Erniedrigung des Fermentations-pH eine deutlich positive Auswirkung. Im Satzversuch mit einem pH-Sollwert von 6,0 wurde eine maximale Ethanolkonzentration von 5,40 g L<sup>-1</sup> erreicht, im Vergleichsprozess nur lediglich eine Konzentration von 3,70 g L<sup>-1</sup>. Die finale Lactatkonzentration war im Satzversuch mit pH-Sollwert 6,0 um 0,05 g L<sup>-1</sup> niedriger als im Vergleichsversuch. Das Intermediat Pyruvat akkumulierte in der Satzkultivierung mit erniedrigtem Fermentations-pH bis zu einer Konzentration von 0,45 g L<sup>-1</sup> und wurde anschließend teilweise wieder metabolisiert. Die maximal detektierte Pyruvatkonzentration im Vergleichsversuch betrug lediglich 0,28 g L<sup>-1</sup>.

Auf die ermittelten Gasaufnahmeleistungen hatte die zusätzliche Absenkung des Kultivierungs-pH nur eine sehr geringe Auswirkung. Kurz nach der Erniedrigung des pH-Sollwerts konnte keine Wasserstoffaufnahme mehr beobachtet werden. Im Vergleichsversuch hingegen sank die Wasserstoffaufnahme nur langsam ab. Im Gegensatz dazu führte der pH-Sollwert von 6,0 zu einer verlängerten CO-Aufnahmerate. Auf die CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate hatte der pH keinerlei Einfluss.

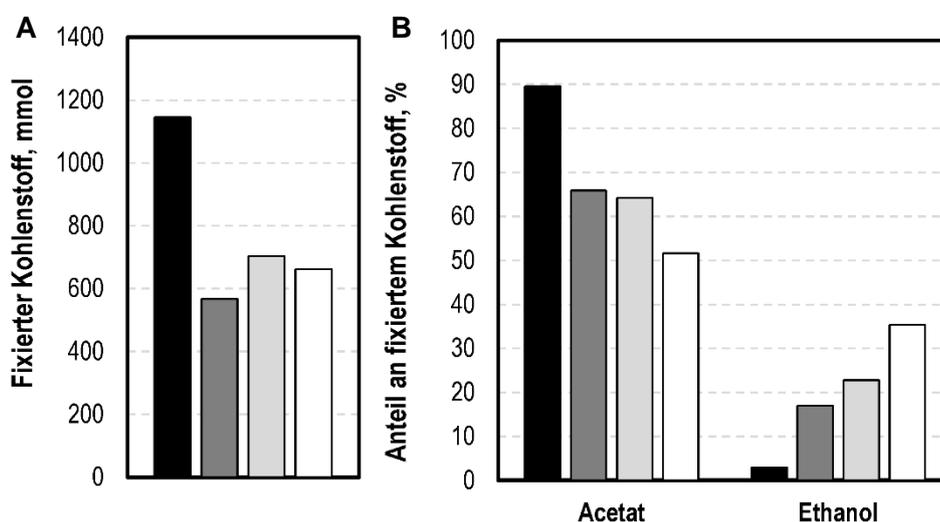
## Diskussion

Der Satzprozess mit einem konstanten CO-Partialdruck von 100 mbar und einem pH von 6,0 zeigt, dass die Einstellung des Kultivierungs-pH auch bei autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* mit CO als zusätzlichem Substrat einen starken Einfluss auf die resultierende Produktbildung hat. Die Erniedrigung des Kultivierungs-pH hatte nicht nur eine Verringerung der maximalen Acetatkonzentration und eine Erhöhung der maximalen Ethanolkonzentration zur Folge, sondern wirkte sich in gleichem Maße auch auf die zugehörigen zellspezifischen und volumetrischen Produktbildungsraten aus (Tabelle 7.4).

**Tabelle 7.4:** Vergleich der Wachstumsraten, sowie der volumetrischen und zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsrate der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei einem Kultivierungs-pH von 7,0 und 6,0 mit CO als zusätzlichem Substrat.

pH	$\mu, \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Acetat}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Acetat}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
7,0	3,29	21,09	13,61	0,25	0,14
6,0	2,72	7,88	10,47	1,57	0,92

Im Gegensatz zur Satzkultivierung mit  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als Substrat wirkte sich die Erniedrigung des Kultivierungs-pH auf 6,0 jedoch nicht gleich stark auf die Ethanolproduktion aus. Während ein Kultivierungs-pH von 6,0 bei der Satzkultivierung mit  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als Substrat im Vergleich zum Satzprozess mit pH 7,0 zu einer Steigerung der Ethanolkonzentration um 680 % auf  $3,30 \text{ g L}^{-1}$  führte, konnte die Ethanolkonzentration durch die Erniedrigung des Fermentations-pH bei der Satzkultivierung mit CO als zusätzlichem Substrat nur um 188 % auf  $2,22 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Wie bei der Satzkultivierung mit  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als alleinigen Substraten (vergleiche Kapitel 7.1) führte ein erniedrigter Kultivierungs-pH auch bei dem Satzprozess mit CO als zusätzlichem Substrat zu einer Verschiebung der Acidogenese hin zur Solventogenese und damit zu einer Verschiebung des prozentualen Kohlenstoffanteils der Produkte am gesamt fixierten Kohlenstoff (vergleiche Abbildung 7.11).



**Abbildung 7.11:** Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff (A) und der prozentualen Anteile des Kohlenstoffs in den Produkten Acetat und Ethanol am gesamt fixiertem Kohlenstoff (B) während der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* im Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen pH-Einstellungen und unterschiedlichen CO-Partialdrücken. pH 7,0, pCO 100 mbar (schwarz); pH 6,0, pCO 100 mbar (dunkelgrau); pH 7,0, pCO 100/300 mbar (hellgrau); pH 6,0, pCO 100/300 mbar (weiß).

Während bei pH 7,0 89,6 % des autotroph fixierten Kohlenstoffs in Acetat und lediglich 2,9 % in Ethanol wiedergefunden werden konnten, wurden bei einem pH von 6,0 nur 65,9 % des aufgenommenen Kohlenstoffs in Acetat und 17,0 % in Ethanol fixiert.

Neben dem positiven Effekt auf die Ethanolbildung zeigte sich zudem, dass ein Absenken des Fermentations-pH zu einer Steigerung der 2,3-Butandiolproduktion führt. Außerdem wurde eine vermehrte Akkumulation der Intermediate Pyruvat und Acetoin, welche bei der Bildung von 2,3-Butandiol auftreten, beobachtet. Die hier detektierte maximale 2,3-Butandiolkonzentration von  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  ist die höchste 2,3-Butandiolkonzentration die jemals bei der autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* erreicht wurde. Zudem ist diese Konzentration vergleichbar zu der höchsten in der Literatur beschriebenen 2,3-Butandiolkonzentration ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ) die anhand der autotrophen Kultivierung eines acetogenen Bakteriums erreicht wurde (Köpke et al. 2011b).

Im Vergleich zu den Produktbildungsraten wurde die maximal detektierte Wachstumsrate (vergleiche Tabelle 7.4) durch die Erniedrigung des Kultivierungs-pH nur wenig beeinflusst. Da die maximale Wachstumsrate innerhalb der ersten 0,3 Tage nach Erhöhung der Rührerdrehzahl detektiert wurde, befand sich der Fermentations-pH zu diesem Zeitpunkt noch im Absinken und der erniedrigte pH-Sollwert war noch nicht erreicht, weshalb die Auswirkung des pH auf die Wachstumsrate relativ gering ausfiel.

Die Erniedrigung des Kultivierungs-pH hatte neben einer verstärkten Solventogenese jedoch auch eine Verringerung der Menge an Kohlenstoff, die während des gesamten Satzversuches durch *S. ovata* fixiert wurde, zur Folge (vergleiche Abbildung 7.11). So wurde in der Satzkultivierung mit pH 6,0 mit 567 mmol nur noch etwa die Hälfte an Kohlenstoff im Vergleich zur Satzkultivierung bei pH 7,0 fixiert.

Im Verlauf der beiden Satzkultivierungen mit einer abrupten Erhöhung des CO-Partialdrucks wurden 703 mmol (pH 7,0) beziehungsweise 662 mmol (pH 6,0) Kohlenstoff fixiert. Durch die Begasungsstrategie mit einer Erhöhung des CO-Partialdrucks von 100 mbar auf 300 mbar bei Erreichen der maximalen Biotrockenmassekonzentration konnte in Kapitel 7.2.2 bereits eine starke Steigerung der Ethanolproduktion mit einer maximalen Ethanolkonzentration von  $3,70 \text{ g L}^{-1}$  gezeigt werden. Durch die oben gezeigte Prozessführungsstrategie, bei der zusätzlich zur Erhöhung des CO-Partialdruck der pH-Sollwert auf pH 6,0 abgesenkt wird, konnte die autotrophe Ethanolproduktion durch *S. ovata* nochmals gesteigert werden (vergleiche Tabelle 7.5), was zu einer weiteren Verschiebung des Produktspektrums hin zu Ethanol führte (vergleiche Abbildung 7.11). In dieser autotrophen Satzkultivierung wurden 35,4 % des während des Satzversuchs aufgenommenen Kohlenstoffs in Ethanol fixiert. Die hierbei maximal detektierte Ethanolkonzentration von  $5,40 \text{ g L}^{-1}$  ist die höchste Ethanolkonzentration die jemals bei einer autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* erreicht wurde und ist vergleichbar mit

maximalen Ethanolkonzentrationen, die bei der autotrophen Satzkultivierung verschiedener anderer acetogener Mikroorganismen detektiert wurde. Für *A. bacchi* beispielsweise ist eine maximale Ethanolkonzentration von  $6,6 \text{ g L}^{-1}$  beschrieben, für *C. autoethanogenum* von  $4,2 \text{ g L}^{-1}$ , für *C. ljundahlii* von  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  und für *C. ragsdalei* von  $8,6 \text{ g L}^{-1}$  (Liu et al. 2014; Abubackar et al. 2016b; Mohammadi et al. 2012; Saxena und Tanner 2011). Die Abnahme der Acetatkonzentration und das gleichzeitige Ansteigen des Kultivierungs-pH kurz nach der Erhöhung des CO-Partialdrucks und dem Erniedrigen des pH-Sollwerts (vergleiche Abbildung 7.10 A) zeigen, dass das während dieses Satzversuches produzierte Ethanol zu einem großen Teil aus dem bereits vorliegenden Acetat gebildet wurde. Diese Beobachtung wird durch die detektierten Gasaufnahmearten gestützt. Ab etwa einem Tag konnte keine Wasserstoffaufnahme mehr detektiert werden. Die CO-Aufnahmerate, die ab diesem Zeitpunkt bestimmt wurden, entsprachen annähernd der detektierten  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate, was darauf schließen lässt, dass das aufgenommene CO durch die CO-Dehydrogenase stöchiometrisch zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt wurde, welches anschließend fast vollständig über den Abgasvolumenstrom aus dem Reaktor ausgetragen wurde. Die Nettogasaufnahme durch *S. ovata* war somit annähernd null. Die Reduktionsäquivalente, die bei der enzymatischen Oxidation von CO zu  $\text{CO}_2$  entstanden dienten jedoch der Umsetzung von bereits gebildetem Acetat zu Acetaldehyd und weiter zu Ethanol.

**Tabelle 7.5:** Vergleich der Wachstumsraten, sowie der volumetrischen und zellspezifischen Acetat- und Ethanolbildungsrate der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* in einem 1 L-Rührkesselreaktor bei einem Kultivierungs-pH von 7,0 und 6,0 und einer abrupten Erhöhung des CO-Partialdrucks von 100 mbar auf 300 mbar.

pH	$\mu, \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Acetat}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Acetat}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$	$Q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$q_{p,\text{Ethanol}}, \text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
7,0	3,23	20,88	13,85	1,23	0,74
6,0	3,17	21,22	14,43	1,67	1,01

Die maximale Wachstumsrate, sowie die maximale zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsrate wurden durch das zusätzliche Absenken des Fermentations-pH auf 6,0 nicht beeinflusst, da diese Parameter vor der Erhöhung des CO-Partialdrucks und damit auch vor der Absenkung des Fermentations-pH detektiert wurden. Dass keine Abnahme der Biotrockenmasse zum Ende des Satzversuchs beobachtet werden konnte, muss auf die starke Sporenbildung zurückgeführt werden, welche mikroskopisch beobachtet wurde.

Im Gegensatz zur Satzkultivierung bei einem konstanten CO-Partialdruck von 100 mbar führte die Erniedrigung des Fermentations-pH bei der Satzkultivierung mit abrupter Erhöhung des

CO-Partialdrucks auf 300 mbar zu keiner Steigerung der 2,3-Butandiolbildung jedoch zu einer vermehrten Akkumulation des Intermediates Pyruvat. Dies deutet, wie auch schon die Ergebnisse aus Kapitel 7.2.2 darauf hin, dass die Enzyme des Stoffwechselwegs von Pyruvat hin zu 2,3-Butandiol bei *S. ovata* durch hohe CO-Konzentrationen inhibiert werden.

Die im Rahmen dieses Kapitels durchgeführten autotrophen Satzkultivierungen belegen, dass ein erniedrigter Kultivierungs-pH auch bei der Nutzung von H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO als Substrate zu einer Verschiebung des autotrophen Produktspektrums von *S. ovata* hin zu Ethanol und bei gleichzeitig niedrigen CO-Konzentrationen auch zu 2,3-Butandiol führt.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Das kommerzielle Interesse an der Gasfermentation, einem Prozess bei dem acetogene Mikroorganismen Synthesegas ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ) zu verschiedenen Produkten wie beispielsweise Acetat, Ethanol, Butanol oder 2,3-Butandiol umsetzen (Ragsdale und Pierce 2008), ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Doch trotz der intensiven Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet gibt es bis dato lediglich eine kommerzielle Anlage zur Nutzung eines solchen Prozesses. Herausforderungen die eine weitere kommerzielle Nutzung der Gasfermentation verhindern sind geringe Produktkonzentrationen und Produktselektivitäten, sowie die ineffiziente Verwertung der gasförmigen Substrate und geringe Biomassekonzentrationen (Liew et al. 2013), wobei letztere zudem zu geringen Raum-Zeit-Ausbeuten (volumetrische Produktivität) führt.

Nach derzeitigem Wissen umfassen die acetogenen Mikroorganismen 23 Gattungen mit insgesamt mehr als 100 verschiedenen Spezies (Drake et al. 2008). Doch trotz dieser Vielzahl an potentiellen Biokatalysatoren für die Gasfermentation wurden bis jetzt nur einige wenige Bakterienstämme aus wenigen verschiedenen Gattungen im Detail studiert. Eine intensive Untersuchung und Charakterisierung von weiteren acetogenen Mikroorganismen führt möglicherweise zur Identifikation von industriell interessanten Bakterienstämmen, welche dazu beitragen könnten, Herausforderungen bei der Gasfermentation, wie beispielsweise geringe Produktselektivitäten, die ineffiziente Verwertung der gasförmigen Substrate oder geringe Biomassekonzentrationen zu überwinden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine reaktionstechnische Charakterisierung und ein anschließender Vergleich der autotrophen Prozessleistung von acht nur sehr wenig erforschten, acetogenen Bakterien realisiert werden.

Da die zu charakterisierenden Bakterienstämme die gesamte Vielfalt der acetogenen Mikroorganismen repräsentieren sollten, wurde zunächst die evolutionäre Beziehung aller acetogenen Bakterien durch die Auftragung in einem phylogenetischen Stammbaum veranschaulicht. Auf dieser Grundlage wurden anschließend acht Spezies aus sechs verschiedenen Gattungen für den reaktionstechnischen Vergleich ausgewählt: *A. fimetarium*, *A. wieringae*, *B. hydrogenotrophica*, *C. magnum*, *E. aggregans*, *S. acidovorans*, *S. ovata* und *T. mayombeii*.

Die reaktionstechnische Charakterisierung sollte anhand von autotrophen Satzkultivierungen in einem vollständig kontrollierten und kontinuierlich mit Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid

begasten Rührkesselreaktor erfolgen. Im Hinblick auf die Aussagekraft des anschließend durchzuführenden Vergleichs der autotrophen Prozessleistung, sollten alle Satzkultivierungen unter standardisierten Bedingungen realisiert werden.

Auf Grund der heterogenen Zusammensetzung der Kultivierungsmedien die für die einzelnen acetogenen Bakterien deklariert sind und dem großen Einfluss von Medienbestandteilen wie Hefeextrakt, Vitaminen oder Spurenelementen auf die autotrophe Prozessleistung (Leclerc et al. 1998; Saxena und Tanner 2011), sollte zunächst ein Standardmedium entwickelt werden, das für die autotrophe Kultivierung möglichst vieler verschiedener acetogener Mikroorganismen geeignet ist. Als Basis für das neue Kultivierungsmedium diente das DSMZ 311 Medium, wobei unnötige Medienbestandteile eliminiert und die Konzentrationen der restlichen Bestandteile an die Ansprüche der autotrophen Kultivierung von acetogenen Mikroorganismen angepasst wurden. Die Evaluation des neu designten „General-Acetogen-Medium“ (GA-Medium) erfolgte anhand der autotrophen Satzkultivierung der acht ausgewählten acetogenen Bakterienstämme. Die Ergebnisse demonstrierten, dass das GA-Medium sehr gut für alle untersuchten Bakterien geeignet ist. Da die ausgewählten Bakterienstämme die Vielfalt der acetogenen Bakterien repräsentieren ist zudem davon auszugehen, dass das GA-Medium für die autotrophe Kultivierung vieler acetogener Mikroorganismen eingesetzt werden kann.

Der Leistungseintrag, welcher in Rührkesselreaktoren hauptsächlich von der Drehzahl abhängig ist, steht im direkten Zusammenhang mit den Gaseintragsraten und stellt somit eine weitere wichtige Einflussgröße auf die autotrophe Prozessleistung von acetogenen Mikroorganismen dar (Munasinghe und Khanal 2010). Aus diesem Grund sollte neben dem einheitlichen Kultivierungsmedium bei allen Satzversuchen zur reaktionstechnischen Charakterisierung zudem der Leistungseintrag standardisiert werden. Die Wahl fiel auf ein zweistufiges Leistungseintragsprofil, da für einige Acetogene eine Sensitivität gegenüber Scherkräften berichtet wird (Braun 1981). Zu Beginn aller Versuche wurde zunächst ein niedriger Leistungseintrag von lediglich  $0,05 \text{ W L}^{-1}$  (200 rpm) eingestellt. Nach einer erfolgreichen Adaption der Bakterien an die autotrophen Bedingungen im Rührkesselreaktor, was durch die autotrophe Produktion von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Carbonsäuren angezeigt wurde, wurde der Leistungseintrag automatisiert auf  $1,5 \text{ W L}^{-1}$  (600 rpm) erhöht um eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit den gasförmigen Substraten zu garantieren.

Nach der Festlegung der Standardkultivierungsbedingungen erfolgte die reaktionstechnische Charakterisierung aller acht ausgewählten Bakterienstämme anhand von autotrophen Satzkultivierungen unter den standardisierten Bedingungen im Rührkesselreaktor. Um die Eignung der festgelegten Reaktionsbedingungen zu demonstrieren und um Referenzdaten für den Vergleich der autotrophen Prozessleistungen zu erzeugen, sollte *A. woodii*, eines der am

besten untersuchten acetogenen Bakterien, als Referenzstamm ebenfalls autotroph unter den festgelegten Standardbedingungen kultiviert werden.

Die detektierte spezifische Wachstums- und Acetatbildungsrate ( $1,9 \text{ d}^{-1}$  und  $24,52 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) von *A. woodii* übertraf die in der Literatur angegebenen Werte deutlich (Demler und Weuster-Botz 2011; Kantzow et al. 2015), wodurch die Eignung der festgelegten Standardkultivierungsbedingungen eindeutig belegt werden konnte. *A. fimetarium*, *A. wieringae*, *B. hydrogenotrophica*, *C. magnum*, *E. aggregans*, *S. acidovorans* und *S. ovata* konnten ebenfalls erfolgreich autotroph im Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen kultiviert werden. Bei *T. mayombei* zeigte sich hingegen, dass dieses Bakterium sensitiv gegenüber hohen Scherkräften ist. Durch den Vergleich der autotrophen Prozessleistung konnten *A. wieringae* und *S. ovata* als Bakterienstämme mit den höchsten Wachstumsraten ( $1,76 \text{ d}^{-1}$  und  $2,94 \text{ d}^{-1}$ ) und Biotrockenmassekonzentrationen ( $1,36 \text{ g L}^{-1}$  und  $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ) identifiziert werden, wobei die Maximalwerte beider Prozessgrößen über denen des Referenzstamms *A. woodii* lagen. Acetat war das Hauptprodukt aller untersuchten acetogenen Mikroorganismen. Die höchste volumetrische ( $17,96 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und zellspezifische Acetatbildungsrate ( $21,03 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) wurde ebenfalls für *S. ovata* beobachtet, wobei beide Raten in der gleichen Größenordnung wie die des Referenzstamms *A. woodii* waren. In allen autotrophen Satzprozessen, außer denen mit *A. fimetarium* und *E. aggregans*, wurden 85 % – 95 % des während des gesamten Versuchs fixierten Kohlenstoffs im Hauptprodukt Acetat wiedergefunden. Die Anordnung der untersuchten acetogenen Mikroorganismen von der höchsten zu niedrigsten maximal detektierten Acetatkonzentration ergab deshalb die gleiche Abfolge wie eine Anordnung gemäß der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff oder der höchsten maximalen Kohlenstoffdioxidaufnahmeraten: *A. woodii* > *S. ovata* > *A. wieringae* > *S. acidovorans* > *C. magnum* > *B. hydrogenotrophica* > *E. aggregans* > *A. fimetarium*.

Neben Acetat wurde in allen autotrophen Satzkultivierungen zudem erstmalig die Bildung von weiteren Stoffwechselprodukten identifiziert und damit ein größeres Produktspektrum als in der Literatur angegeben beobachtet (vergleiche Tabelle 8.1).

In allen durchgeführten Satzexperimenten wurde die Akkumulation von mindestens  $1 \text{ g L}^{-1}$  des Zwischenprodukts Formiat beobachtet, wobei in der Satzkultivierung von *A. wieringae* mit  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Formiatkonzentration detektiert wurde. Geringe Mengen an Ethanol wurden von 4 der untersuchten acetogenen Bakterien (*A. wieringae*, *C. magnum*, *S. acidovorans* und *S. ovata*) und auch vom Referenzstamm *A. woodii* gebildet. *S. ovata* produzierte dabei mit  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Ethanolkonzentration. Butyrat wurde in geringen Konzentrationen von 3 der untersuchten Bakterien gebildet. (*C. magnum*, *B. hydrogenotrophica* und *E. aggregans*).

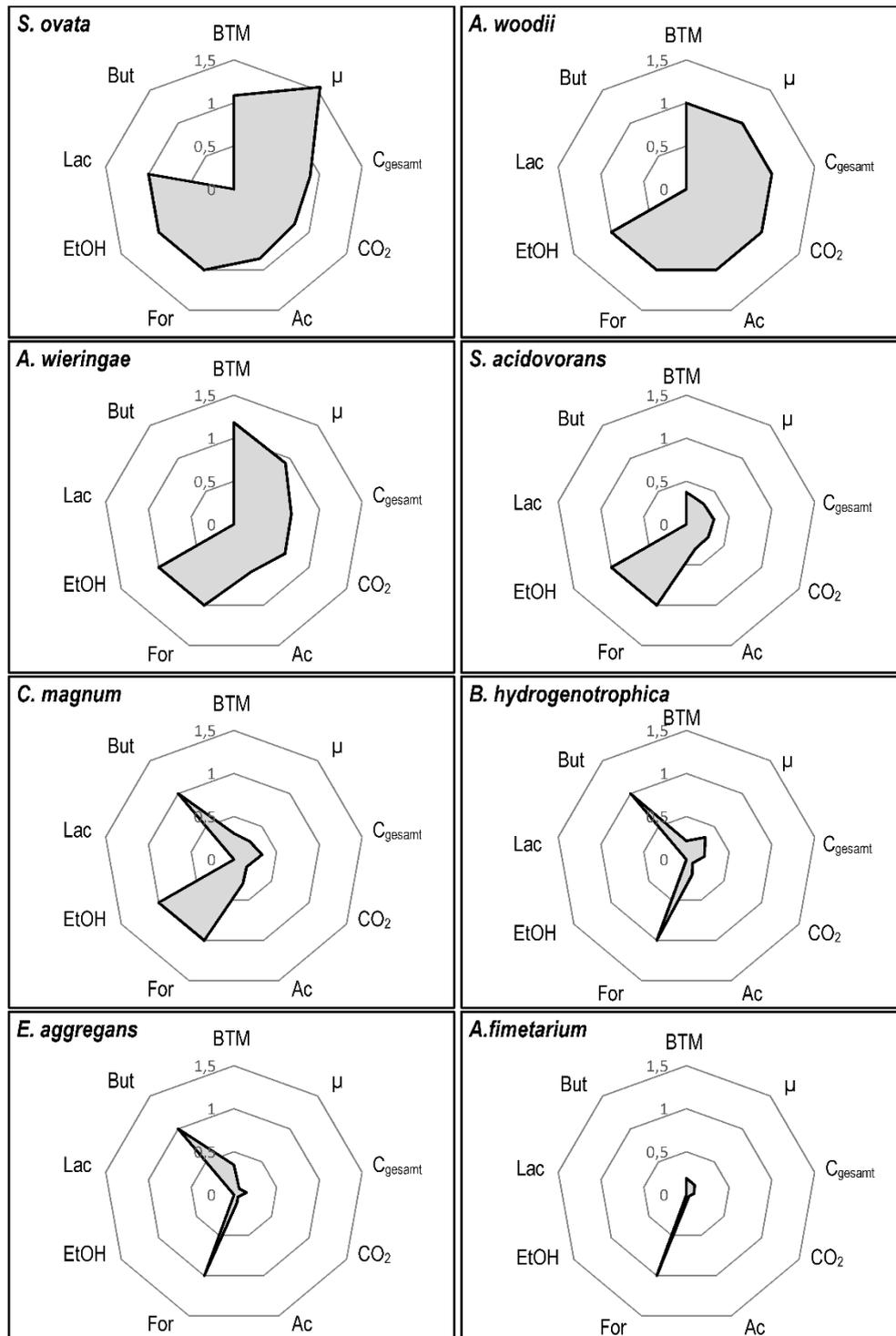
*E. aggregans* erreichte mit  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  die höchste Butyratkonzentration. Eine autotrophe Bildung von Lactat ( $0,06 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde lediglich mit *S. ovata* beobachtet.

**Tabelle 8.1:** Auflistung aller erstmalig identifizierten Stoffwechselprodukte der autotrophen Satzkultivierung verschiedener acetogener Mikroorganismen (Die Tabelle ist analog zu Tabelle 5.4).

Erstmalig identifizierte Produkte	
<i>A. fimetarium</i>	Formiat
<i>A. wieringae</i>	Formiat, Ethanol
<i>A. woodii</i>	Ethanol
<i>B. hydrogenotrophica</i>	Formiat, Butyrat
<i>C. magnum</i>	Formiat, Ethanol, Butyrat
<i>E. aggregans</i>	Formiat, Butyrat
<i>S. acidovorans</i>	Formiat, Ethanol
<i>S. ovata</i>	Formiat, Lactat

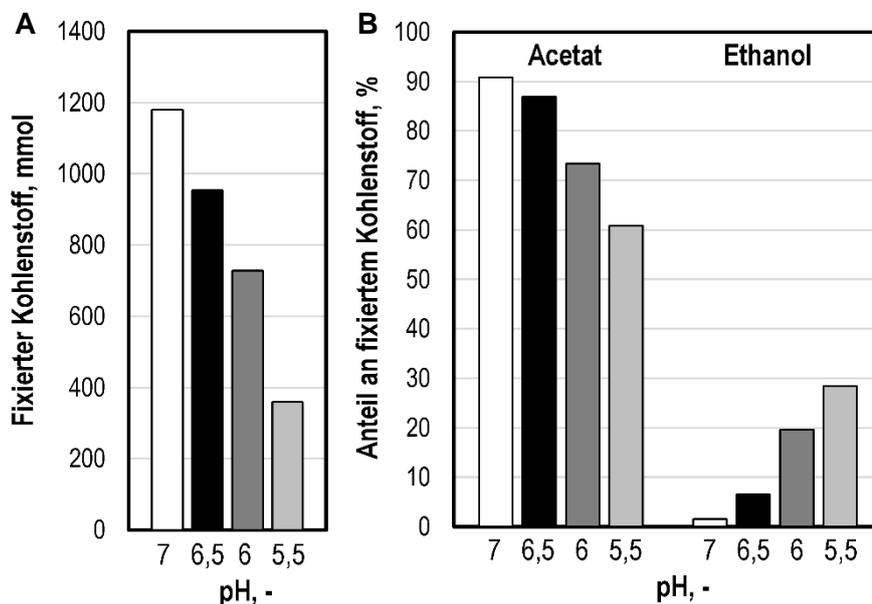
Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung wurde zudem evaluiert, ob eine autotrophe Kultivierung der zu untersuchenden acetogenen Bakterien in definiertem Medium möglich ist. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die autotrophe Satzkultivierung von *A. fimetarium*, *B. hydrogenotrophica*, *E. aggregans*, *S. acidovorans* und *T. mayombeii* ohne Komplexbestandteile nicht möglich ist. *A. wieringae*, *C. magnum* und *S. ovata* hingegen konnten in definiertem Medium kultiviert werden. Während die Wachstums- und Produktbildungsraten für *A. wieringae* und *S. ovata* in definiertem Medium geringer waren, wurden für *C. magnum* vergleichbare Produktbildungsraten und sogar höhere Acetat- und Ethanolkonzentrationen detektiert als in Komplexmedium.

Der Vergleich der autotrophen Prozessleistung der untersuchten acetogenen Bakterien wies *S. ovata* als leistungsstärksten Stamm aus, was durch die graphische Auftragung der autotrophen Prozessleistung in Abbildung 8.1 eindeutig belegt wird. Je größer die aufgespannte Fläche der dargestellten Netzdiagramme ist, desto höher ist die autotrophe Prozessleistung des zugehörigen acetogenen Bakteriums. Die Wachstums- und Acetatbildungsraten von *S. ovata* waren vergleichbar oder sogar besser als die des Referenzstamms *A. woodii*, dem Bakterium mit den bisher höchsten beschriebenen Acetatbildungsraten (Daniell et al. 2012). Weitere Aspekte die für *S. ovata* als aussichtsreiches acetogenes Bakterium für den industriellen Einsatz sprechen, sind die Fähigkeit zur Bildung des C2-Moleküls Ethanol und des C3-Moleküls Lactat, sowie die Anwendbarkeit definierter Kultivierungsmedien und das bereits sequenzierte Genom. Auf Grund der demonstrierten starken autotrophen Prozessleistung sollte die reaktionstechnische Analyse mit *S. ovata* weitergeführt werden.



**Abbildung 8.1:** Graphische Darstellung der autotrophen Prozessleistung der untersuchten acetogenen Bakterien. Je größer die aufgespannte Fläche ist, umso höher ist die autotrophe Prozessleistung des zugehörigen Acetogens. Aufgetragen sind die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen (BTM), die maximalen Wachstumsraten ( $\mu$ ), die Mengen an gesamt fixiertem Kohlenstoff ( $C_{gesamt}$ ), die maximalen  $CO_2$ -Aufnahmeraten und die maximale Acetatkonzentration (Ac), wobei die Werte dieser Parameter für *A. woodii* auf 1 normiert wurden. Die Werte der anderen Bakterienstämme wurden dementsprechend kalkuliert. Zudem sind die Produkte Formiat (For), Ethanol (EtOH), Lactat (Lac) und Butyrat (But) aufgetragen, wobei deren Detektion stets mit 1 bewertet wurde. Waren die Produkte nicht vorhanden wurden die Parameter mit 0 bewertet. (Die Abbildung ist analog zu Abbildung 5.14)

Ethanol spielt auf Grund seines Einsatzes als Kraftstoff und Kraftstoffzusatz eine wichtige Rolle bei der Suche nach Alternativen zum Rohöl und stellt somit ein vielversprechendes Produkt der Synthesegasfermentation dar. Da die Erniedrigung des Fermentations-pH in der Literatur als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Bildung von Ethanol durch acetogene Bakterien beschrieben wird (Kundiya et al. 2011; Phillips et al. 1993), sollte getestet werden, in wieweit sich eine Variation des Fermentations-pH auch auf das Produktspektrum von *S. ovata* auswirkt. Durch die schrittweise Erniedrigung des Fermentations-pH von pH 7,0 auf pH 6,5, pH 6,0 und pH 5,5 konnte das Produktspektrum von *S. ovata* stetig weiter von Acetat hin zu Ethanol verschoben werden. Ein pH von 6,0 konnte dabei als optimaler Fermentations-pH für die autotrophe Produktion von Ethanol mit *S. ovata* detektiert werden (vergleiche Abbildung 8.2). Bei der zugehörigen Satzkultivierung wurde eine maximale Ethanolkonzentration von 3,3 g L<sup>-1</sup> erreicht.



**Abbildung 8.2:** Graphische Darstellung der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff (A) und der prozentualen Anteile des Kohlenstoffs in den Produkten Acetat und Ethanol am gesamt fixiertem Kohlenstoff (B) während der autotrophen Satzkultivierungen von *S. ovata* im Rührkesselreaktor bei pH 7,0, pH 6,5, pH 6,0 und pH 5,5. (Die Abbildung ist analog zu Abbildung 7.2).

Die Erniedrigung des pH führte neben der Verschiebung des Produktspektrums jedoch auch zu einer Verringerung der Gesamtkohlenstoffmenge, die während der zugehörigen autotrophen Satzprozesse aufgenommen wurde, was eindeutig belegt, dass das pH-Optimum von *S. ovata* im neutralen Bereich liegt.

Da Synthesegas neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu einem gewissen Prozentsatz auch aus Kohlenstoffmonoxid besteht, sollte weiterhin untersucht werden, ob *S. ovata* Kohlenstoffmonoxid als Substrat nutzen kann. Es konnte gezeigt werden, dass *S. ovata* neben Synthesegas, einer Mischung aus Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonoxid, auch

Gasmischungen aus lediglich Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonoxid als Substrat für Wachstum und Produktbildung verwerten kann. Bei der Verwendung einer Synthesegasmischung mit 750 mbar Wasserstoff, 150 mbar Kohlenstoffdioxid und 100 mbar Kohlenstoffmonoxid erfolgte eine simultane Metabolisierung aller drei Substrate durch *S. ovata*. Die zusätzliche Bereitstellung des höher reduzierten Substrats Kohlemonoxid hatte dabei keine negativen Auswirkungen auf die autotrophe Prozessleistung von *S. ovata* sondern führte zu einer deutlich erhöhten Biotrockenmassekonzentration, sowie zur autotrophen Bildung des C4-Moleküls 2,3-Butandiol ( $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ).

Es ist bekannt, dass Synthesegas, je nach vergastem Ausgangsmaterial, bis zu 60 % Kohlenstoffmonoxid enthält (Tirado-Acevedo et al. 2010). Um die Auswirkungen einer Variation des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks auf die autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* zu evaluieren, wurden Satzversuche mit 200 mbar und 300 mbar Kohlenstoffmonoxid durchgeführt. Im Gegensatz zur Satzkultivierung mit 100 mbar Kohlenstoffmonoxid kam es bei diesen Satzversuchen zu einer drastischen Inhibierung des autotrophen Metabolismus von *S. ovata*, wobei die Auswirkungen umso stärker waren, je höher der Kohlenstoffmonoxidpartialdruck war. Am deutlichsten zeigte sich der inhibierende Effekt bei der Biomasse- und Acetatbildung, sowie beim Betrachten der Gesamtmenge an fixiertem Kohlenstoff. In der Satzkultivierung mit 300 mbar Kohlenstoffmonoxid wurden während des gesamten Versuchs 94 % weniger Kohlenstoff in Biomasse und Produkten fixiert als in der Satzkultivierung mit 100 mbar Kohlenstoffmonoxid. Die Bildung von 2,3-Butandiol wurde durch Kohlenstoffmonoxidpartialdrücke über 100 mbar vollständig inhibiert. Simultan führte die Erhöhung des Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks dagegen auch zu einer Verschiebung des Produktspektrums von Acetat hin zu Ethanol. Auf Grund der gleichzeitig auftretenden inhibierenden Effekte konnte jedoch lediglich eine maximale Ethanolkonzentration von  $1,43 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden. Um den positiven Effekt eines hohen Kohlenstoffmonoxidpartialdrucks auf die Ethanolbildung zu nutzen und gleichzeitig den inhibierenden Einfluss auf den autotrophen Stoffwechsel von *S. ovata* zu umgehen, wurde eine zweistufige Begasungsstrategie mit einem Kohlenstoffmonoxidpartialdruck von zunächst 100 mbar und anschließend 300 mbar angewandt. Durch diese Prozessführungsstrategie konnte die maximale Ethanolkonzentration auf  $3,77 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden.

Um die Ethanolproduktion durch *S. ovata* noch weiter zu erhöhen, wurden zudem die Auswirkungen einer Erniedrigung des Fermentations-pH auf 6,0 während der autotrophen Satzkultivierung mit Synthesegas als Substrat untersucht. Bei der Satzkultivierung mit einem konstanten Kohlenstoffmonoxidpartialdruck von 100 mbar konnte die maximale Ethanolkonzentration dadurch von  $0,77 \text{ g L}^{-1}$  auf  $2,22 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Zudem wurde in diesem Satzversuch eine 2,3-Butandiolkonzentration von  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  detektiert, welche vergleichbar ist zu

der höchsten in der Literatur beschriebenen 2,3-Butandiolkonzentration ( $0,18 \text{ g L}^{-1}$ ) die anhand der autotrophen Kultivierung eines acetogenen Bakteriums erreicht wurde (Köpke et al. 2011b). Bei dem Satzversuch mit der zweistufigen Begasungsstrategie (100 mbar  $\rightarrow$  300 mbar Kohlenstoffmonoxid) konnte die Ethanolbildung durch die Erniedrigung des Fermentations-pH ebenfalls erhöht werden. Die hierbei maximal detektierte Ethanolkonzentration von  $5,40 \text{ g L}^{-1}$  ist die höchste Ethanolkonzentration die jemals bei einer autotrophen Satzkultivierung von *S. ovata* erreicht wurde und ist vergleichbar mit maximalen Ethanolkonzentrationen, die bei der autotrophen Satzkultivierung verschiedener anderer acetogener Mikroorganismen detektiert wurde (Liu et al. 2014; Abubackar et al. 2016b; Mohammadi et al. 2012; Saxena und Tanner 2011). Insgesamt konnte die autotrophe Ethanolproduktion durch *S. ovata* im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Prozessoptimierungen von einer anfänglich maximalen Konzentration von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  um 1186 % auf  $5,40 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden.

## Ausblick

Das neu entwickelte GA-Medium und die festgelegten Standardbedingungen für eine autotrophe Satzkultivierung von acetogenen Mikroorganismen im 1 L-Rührkesselreaktor bieten ideale Voraussetzungen für eine reaktionstechnische Charakterisierung und einen aussagekräftigen Vergleich der autotrophen Prozessleistung verschiedener acetogener Bakterien. Hierdurch bietet sich die Möglichkeit eine große Anzahl an acetogenen Mikroorganismen innerhalb kürzester Zeit und mit geringem Aufwand im Hinblick auf einen Einsatz als Biokatalysator in der Gasfermentation zu durchmustern und so Bakterienstämme zu identifizieren, welche sich auf Grund ihrer autotrophen Prozessleistung und ihres Produktspektrums für eine industrielle Nutzung eignen könnten.

Ethanol stellt durch seinen Einsatz als Biokraftstoff und Kraftstoffzusatz ein wichtiges Produkt der Gasfermentation mit acetogenen Mikroorganismen dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die autotrophe Ethanolproduktion mit *S. ovata* durch verschiedene Prozessoptimierungen bereits von einer anfänglich maximalen Konzentration von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  um 1186 % auf  $5,40 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Um industriell relevante Produktionsleistungen zu erreichen ist jedoch eine weitere Optimierung der Ethanolbildung nötig, welche beispielsweise durch eine Optimierung der Spurenelementkonzentrationen erreicht werden könnte (Saxena und Tanner 2011).

Die autotrophe Satzkultivierung von *S. ovata* mit Synthesegas als Substrat führte zur Produktion von 2,3-Butandiol, welche auf Grund der hohen industriellen Relevanz dieser Chemikalie in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden sollte. Da das Genom von *S. ovata* bereits sequenziert ist, sollt dabei neben einer reaktionstechnischen Analyse und der Einstellung geeigneter Reaktionsbedingungen auch eine Überexpression relevanter Enzyme, wie beispielsweise der Acetolactatsynthase, der Acetolactatdecarboxylase oder der 2,3-Butandioldehydrogenase (Köpke et al. 2014), in Betracht gezogen werden.

Auf Grund der hohen autotrophen Prozessleistung und Stoffwechselvariabilität ist *S. ovata* zudem ein aussichtsreicher Kandidat für den Einsatz von molekularbiologischen Methoden zu Produktion von nicht natürlichen C2-, C3- oder C4-Molekülen.

## 9 Literatur

- Abrini J., Naveau H., Nyns E.-J. (1994): *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch. Microbiol. 161(4):345–351.
- Abubackar H. N., Bengelsdorf F. R., Dürre P., Veiga M. C., Kennes C. (2016a): Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by clostridia. Appl. Energ. 169:210–217.
- Abubackar H. N., Fernández-Naveira Á., Veiga M. C., Kennes C. (2016b): Impact of cyclic pH shifts on carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum*. Fuel 178:56–62.
- Abubackar H. N., Veiga M. C., Kennes C. (2012): Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. Bioresource technol. 114:518–522.
- Abubackar H. N., Veiga M. C., Kennes C. (2015): Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. Bioresource technol. 186:122–127.
- Adamse A. D. (1980): New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). Antonie van Leeuwenhoek 46(6):523–531.
- Allen T. D., Caldwell M. E., Lawson P. A., Huhnke R. L., Tanner R. S. (2010): *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil. Int. J. Syst. Evol. Micr. 60(Pt 10):2483–2489.
- Balch W. E., Schoberth S., Tanner R. S., Wolfe R. S. (1977): *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 27(4):355–361.
- Balk M., Weijma J., Friedrich M. W., Stams A. J. M. (2003): Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor. Arch. Microbiol. 2003(179):315–320.
- Baltes W. (1971): Über Zusammensetzung und Nachweis von Hefeextrakten. Z. Lebensm. Unters. Forch. (Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung) 145(3):149–155.
- Baronofsky J., Schreurs W., Kashket E. R. (1984): Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. Appl. Environ. Microbiol. 1984:1134–1139.

- Bengelsdorf F. R., Poehlein A., Schiel-Bengelsdorf B., Daniel R., Dürre P. (2015): Genome sequence of the acetogenic bacterium *Oxobacter pfennigii* DSM 3222 T. *Genome Announc.* 3(6):e01408-15.
- Bernalier A., Willems A., Leclerc M., Rochet V., Collins M. D. (1996): *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Arch. Microbiol.* 166(3):176–183.
- Bertsch J., Müller V. (2015): CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(17):5949–5956.
- Boga H. I. (2003): *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53(5):1397–1404.
- Boga H. I., Brune A. (2003): Hydrogen-dependent oxygen reduction by homoacetogenic bacteria isolated from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2):779–786.
- Bomar M., Hippe H., Schink B. (1991): Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by *Clostridium magnum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 83(3):347–350.
- Brass E. P. (1994): Overview of coenzyme A metabolism and its role in cellular toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* 90(3):203–214.
- Braun M. (1981): Charakterisierung von anaeroben autotrophen Essigsäurebildnern und Untersuchungen zur Essigsäurebildung aus Wasserstoff und Kohlendioxid durch *Clostridium aceticum*. Dissertation, Universität Göttingen.
- Braun M., Gottschalk G. (1982): *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zbl. Bakt. Mik. Hyg. I C* 3(3):368–376.
- Braus-Stromeyer S., Schnappauf G., Braus G. H., Gössner A. S., Drake H. L. (1997): Carbonic anhydrase in *Acetobacterium woodii* and other acetogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 1997:7197–7200.
- Bredwell M. D., Srivastava P., Worden R. M. (1999): Reactor design issues for synthesis-gas fermentations. *Biotechnol. Prog.* 15(5):834–844.
- Breznak J. A., Switzer J. M., Seitz H.-J. (1988): *Sporomusa termitida* sp. nov., an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-utilizing acetogen isolated from termites. *Arch. Microbiol.* 150(3):282–288.
- Bruant G., Lévesque M.-J., Peter C., Guiot S. R., Masson L. (2010): Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7. *PLoS one* 5(9):e13033.
- Bruno-Barcena J. M., Chinn M. S., Grunden A. M. (2013): Genome sequence of the autotrophic acetogen *Clostridium autoethanogenum* JA1-1 Strain DSM 10061, a producer of ethanol from carbon monoxide. *Genome Announc.* 1(4):e00628-13-e00628-13.
- Buschhorn H., Dürre P., Gottschalk G. (1989): Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989:1835–1840.

Ceresana (2014): Marktstudie Butanol.

<http://www.ceresana.com/de/marktstudien/chemikalien/butanol/>.

Chang I. S., Kim B. H., Lovitt R. W., Bang J. S. (2001): Effect of CO partial pressure on cell-recycled continuous CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Process Biochem.* 37(4):411–421.

Chang I.-S., Kim B.-H., Kim D.-H., Lovitt R. W., Sung H.-C. (1999): Formulation of defined media for carbon monoxide fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612 and the growth characteristics of the bacterium. *J. Biosci. Bioeng.* 88(6):682–685.

Chmiel H. (2011): Bioprozesstechnik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 545 S.

Cotter J. L., Chinn M. S., Grunden A. M. (2009): Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess Biosyst. Eng. (Bioprocess and Biosystems Engineering)* 32(3):369–380.

Daniel S. L., Hsu T., Dean S. I., Drake H. L. (1990): Characterization of the H<sub>2</sub>- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *J. Bacteriol.* 1990(172/8):4464–4471.

Daniell J., Köpke M., Simpson S. (2012): Commercial biomass syngas fermentation. *Energies* 5(12):5372–5417.

Das A., Fu Z.-Q., Tempel W., Liu Z.-J., Chang J., Chen L., Lee D., Zhou W., Xu H., Shaw N., Rose J. P., Ljungdahl L. G., Wang B.-C. (2007): Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Proteins* 67(1):167–176.

Dehning I., Stieb M., Schink B. (1989): *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Arch. Microbiol.* 151(5):421–426.

Demler M. (2012): Reaktionstechnische Untersuchungen zur autotrophen Herstellung von Acetat mit *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Technische Universität München.

Demler M., Weuster-Botz D. (2011): Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnol. Bioeng.* 108(2):470–474.

Doran P. M. (2007): Bioprocess engineering principles. Acad. Press, San Diego, Calif., 439 S.

Drake H. L. (1995): Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the Acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: past and current perspectives. In Drake H. L. (Hrsg.) *Acetogenesis*. Springer US, Boston, MA, S 3–60.

Drake H. L., Daniel S. L. (2004): Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Res. Microbiol.* 155(10):869–883.

Drake H. L., Daniel S. L., Küsel K., Matthies C., Kuhner C., Braus-Stromeyer S. (1997): Acetogenic bacteria: What are the in situ consequences of their diverse metabolic versatilityes? *BioFactors* 6(1):13–24.

- Drake H. L., Gössner A. S., Daniel S. L. (2008): Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:100–128.
- Drake H. L., Küsel K., Matthies C. (2006): Acetogenic Prokaryotes. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, S 354–420.
- Dürre P. (Hrsg.) (2005): *Handbook on clostridia*. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Dürre P. (2007): Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnol. J.* 2(12):1525–1534.
- Dürre P. (2016): Butanol formation from gaseous substrates. *FEMS Microbiol. Lett.*:fnw040.
- Eichler B., Schink B. (1984): Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 140(2-3):147–152.
- Fargione J., Hill J., Tilman D., Polasky S., Hawthorne P. (2008): Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science (New York, N.Y.)* 319(5867):1235–1238.
- Fuchs G. (1986): CO<sub>2</sub> fixation in acetogenic bacteria: Variations on a theme. *FEMS Microbiol. Lett.* 39(3):181–213.
- Fuchs G., Schlegel H. G., Eitinger T. (2007): *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart [u.a.], XX, 678 S.
- Geerligs G., Aldrich H. C., Harder W., Diekert G. (1987): Isolation and characterization of a carbon monoxide utilizing strain of the acetogen *Peptostreptococcus productus*. *Arch. Microbiol.* 148(4):305–313.
- Genthner B. R., Bryant M. P. (1982): Growth of *Eubacterium limosum* with carbon monoxide as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982:70–74.
- Genthner B. R., Davis C. L., BRYANT M. P. (1981): Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.*(42):12–19.
- Gerritsen J., Fuentes S., Grievink W., van Niftrik L., Tindall B. J., Timmerman H. M., Rijkers G. T., Smidt H. (2014): Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 64(Pt 5):1600–1616.
- Girbal L. (1995): How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol. Rev.* 16(2-3):151–162.
- Global Industry Analysts Inc (2012): *Global Market for Acetic Acid*, New Report by Global Industry Analysts, Inc.  
[http://www.prweb.com/releases/acetic\\_acid\\_acetates/vinyl\\_acetate\\_monomer\\_PTA/prweb9242731.htm](http://www.prweb.com/releases/acetic_acid_acetates/vinyl_acetate_monomer_PTA/prweb9242731.htm). Zuletzt geprüft am 24. Februar 2016.

- Gössner A. S., Küsel K., Schulz D., Trenz S., Acker G., Lovell C. R., Drake H. L. (2006): Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needle rush *Juncus roemerianus*. *Microbiology* 152(4):1209–1219.
- Gössner A. S., Picardal F., Tanner R. S., Drake H. L. (2008): Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiol. Lett.* 287(2):236–242.
- Graber J. R., Breznak J. A. (2004): Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-acetogenic spirochete from termite hindguts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1307–1314.
- Greening R. C., Leedle J. A. Z. (1989): Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: Acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch. Microbiol.* 151(5):399–406.
- Grethlein A. J., Worden R., Jain M. K., Datta R. (1991): Evidence for production of n-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Ferment. Bioeng.* 72(1):58–60.
- Grethlein A. J., Worden R. M., Jain M. K., Datta R. (1990): Continuous production of mixed alcohols and acids from carbon monoxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24-25(1):875–884.
- Guo Y., Xu J., Zhang Y., Xu H., Yuan Z., Li D. (2010): Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. *Bioresource technol.* 101(22):8784–8789.
- Hass V. C., Pörtner R. (2011): *Praxis der Bioprozesstechnik: Charakteristika von Rührkesselreaktoren.* Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 180 S.
- Hattori S., Kamagata Y., Hanada S., Shoun H. (2000): *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50(4):1601–1609.
- Heiskanen H., Virkajärvi I., Viikari L. (2007): The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*. *Enzyme Microb. Tech.* 41(3):362–367.
- Henstra A. M., Sipma J., Rinzema A., Stams A. J. M. (2007): Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Curr. Opin. Biotech.* 18(3):200–206.
- Hermann M., Popoff M.-R., Sebald M. (1987): *Sporomusa paucivorans* sp. nov., a methylotrophic bacterium that forms acetic acid from hydrogen and carbon dioxide. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(2):93–101.
- Hess V., Poehlein A., Weghoff M., Daniel R., Müller V. (2014): A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *BMC Genomics* 15(1):1139.

- Hoehler T. M., Albert D. B., Alperin M. J., Martens C. S. (1999): Acetogenesis from CO<sub>2</sub> in an anoxic marine sediment. *Limnol. Oceanogr.* 44(3):662–667.
- Hu P., Bowen S. H., Lewis R. S. (2011): A thermodynamic analysis of electron production during syngas fermentation. *Bioresource technol.* 102(17):8071–8076.
- Hu P., Jacobsen L. T., Horton J. G., Lewis R. S. (2010): Sulfide assessment in bioreactors with gas replacement. *Biochem. Eng. J.* 49(3):429–434.
- Huhnke R. L., Lewis R. S., Tanner R. S. (2010): Isolation and characterization of novel clostridial species(US7704723 B2).
- Hungate R. E. (1969): Chapter IV a roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In , Band 3. *Methods in Microbiology*. Elsevier, S 117–132.
- Hurst K. M., Lewis R. S. (2010): Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochem. Eng. J.* 48(2):159–165.
- Hwang S., Song Y., Cho B.-K. (2015): Draft genome sequence of *Acetobacterium bakii* DSM 8239, a potential psychrophilic chemical producer through syngas fermentation. *Genome Announc.* 3(5):e01070-15.
- INEOS Bio (2013): INEOS Bio produces cellulosic ethanol at commercial scale. <http://www.ineos.com/businesses/ineos-bio/news/ineos-bio-produces-cellulosic-ethanol/>. Zuletzt geprüft am 25. Februar 2016.
- Jeong J., Bertsch J., Hess V., Choi S., Choi I.-G., Chang I. S., Müller V. (2015): Energy conservation model based on genomic and experimental analyses of a carbon monoxide-utilizing, butyrate-forming acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(14):4782–4790.
- Jeong Y., Song Y., Shin H. S., Cho B.-K. (2014): Draft genome sequence of acid-tolerant *Clostridium drakei* SL1, a potential chemical producer through syngas fermentation. *Genome Announc.* 2(3):e00387-14-e00387-14.
- Kadic E. (2010): Survey of gas-liquid mass transfer in bioreactors. Dissertation, Iowa State University.
- Kane M. D., Brauman A., Breznak J. A. (1991): *Clostridium mayombei* sp. nov., an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Arch. Microbiol.* 156(2):99–104.
- Kane M. D., Breznak J. A. (1991): *Acetonema longum* gen.nov.sp.nov., an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. *Arch. Microbiol.* 156(2):91–98.
- Kaneuchi C., Benno Y., Mitsuoka T. (1976): *Clostridium coccoides*, a new species from the feces of mice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26(4):482–486.
- Kantzow C., Mayer A., Weuster-Botz D. (2015): Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *J. Biotechnol.* 212:11–18.

- Kerby R., Zeikus J. G. (1983): Growth of *Clostridium thermoaceticum* on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> or CO as energy source. *Curr. Microbiol.* 8(1):27–30.
- Klasson K. T., Ackerson M. D., Clausen E. C., Gaddy J. L. (1991): Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel* 70(5):605–614.
- Klemps R., Schoberth S., Sahn H. (1987): Production of acetic acid by *Acetogenium kivui*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27(3).
- Köpke M., Dürre P. (2011): Handbook of biofuels production: Biochemical production of biobutanol. Woodhead publishing series in energy, Band 15. Woodhead Publ, Oxford [u.a.], XXIV, 659 S.
- Köpke M., Gerth M. L., Maddock D. J., Mueller A. P., Liew F., Simpson S. D., Patrick W. M. (2014): Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(11):3394–3403.
- Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Wiezer A., Wollherr A., Ehrenreich A., Liebl W., Gottschalk G., Dürre P. (2010): *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 107(29):13087–13092.
- Köpke M., Liew F. (2010): Recombinant microorganism and methods of production thereof(US20110236941 A1).
- Köpke M., Mihalcea C., Bromley J. C., Simpson S. D. (2011a): Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Curr. Opin. Biotech.* 22(3):320–325.
- Köpke M., Mihalcea C., Liew F., Tizard J. H., Ali M. S., Conolly J. J., Al-Sinawi B., Simpson S. D. (2011b): 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15):5467–5475.
- Köpke M., Noack S., Dürre P. (2011c): The past, present, and future of biofuels – biobutanol as promising alternative. In Dos Santos Bernardes M. A. (Hrsg.) *Biofuel production-recent developments and prospects*. InTech.
- Kotelnikova S. (2002): Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Sci. Rev.* 58(3-4):367–395.
- Kotsyurbenko O. R., Simankova M. V., Nozhevnikova A. N., Zhilina T. N., Bolotina N. P., Lysenko A. M., Osipov G. A. (1995): New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 163(1):29–34.
- Krumholz L. R., Bryant M. P. (1985): *Clostridium pfennigii* sp. nov. uses methoxyl groups of monobenzenoids and produces butyrate. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35(4):454–456.
- Kuhner C. H., Frank C., Griesszhammer A., Schmittroth M., Acker G., Gosszner A., Drake H. L. (1997): *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(2):352–358.

- Kundiya D. K., Huhnke R. L., Wilkins M. R. (2010): Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: Design and process considerations. *J. Biosci. Bioeng.* 109(5):492–498.
- Kundiya D. K., Wilkins M. R., Maddipati P., Huhnke R. L. (2011): Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by "*Clostridium ragsdalei*". *Bioresource technol.* 102(10):5794–5799.
- Küsel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E., Drake H. L. (2000): *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50 Pt 2:537–546.
- Küsel K., Karnholz A., Trinkwalter T., Devereux R., Acker G., Drake H. L. (2001): Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4734–4741.
- LanzaTech (2012): 2,3-Butanediol: Bio-based 2,3 BDO set for 2014 sales. <http://www.lanzatech.com/23-butanediol-bio-based-23-bdo-set-for-2014-sales/>. Zuletzt geprüft am 25. Februar 2016.
- Leclerc M., Elfoul-Bensaid L., Bernalier A. (1998): Effect of yeast extract on growth and metabolism of H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic bacteria from the human colon. *Curr. Microbiol.* 37(3):166–171.
- Lee H.-S., Vermaas W. F. J., Rittmann B. E. (2010): Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends Biotechnol.* 28(5):262–271.
- Leigh J. A., Mayer F., Wolfe R. S. (1981): *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* 129(4):275–280.
- Liew M. F., Köpke M., Dennis S. (2013): Gas fermentation for commercial biofuels production. In Fang Z. (Hrsg.) *Liquid, gaseous and solid biofuels - conversion techniques*. InTech.
- Liou J. S.-C., Balkwill D. L., Drake G. R., Tanner R. S. (2005): *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55(Pt 5):2085–2091.
- Liu C., Finegold S. M., Song Y., Lawson P. A. (2008): Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58(Pt 8):1896–1902.
- Liu K., Atiyeh H. K., Stevenson B. S., Tanner R. S., Wilkins M. R., Huhnke R. L. (2014): Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource technol.* 151:69–77.

- Ljungdahl L. G., Wood H. G. (1969): Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by heterotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 23:515–538.
- Ljungdahl L. G. (1986): The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 40(1):415–450.
- Lundie L. L., Drake H. L. (1984): Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 1984(159(2)):700–703.
- Lynd L., Kerby R., Zeikus J. G. (1982): *Carbon monoxide* metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Bacteriol.*(149):255–263.
- Maddipati P., Atiyeh H. K., Bellmer D. D., Huhnke R. L. (2011): Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource technol.* 102(11):6494–6501.
- Majors P. D., McLean J. S., Scholten J. C. M. (2008): NMR bioreactor development for live in-situ microbial functional analysis. *JMRI-J. Magn. Reson. Im.* 192(1):159–166.
- MarketsandMarkets (2015a): Butyric acid market by application - Global analysis and forecast to 2020. <http://academic.reportlinker.com/p03200050-summary/Butyric-Acid-Market-by-Application-by-Type-by-Geography-Global-Analysis-and-Forecast-to.html>.
- MarketsandMarkets (2015b): Lactic acid market by application - Global trends & forecasts to 2020.
- Martin W. F. (2012): Hydrogen, metals, bifurcating electrons, and proton gradients: The early evolution of biological energy conservation. *FEBS Lett.* 586(5):485–493.
- McGlade C., Ekins P. (2015): The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2 degrees C. *Nature* 517(7533):187–190.
- Mechichi T., Labat M., Patel B. K. C., Woo T. H. S., Thomas P., Garcia J.-L. (1999): *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic o-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(3):1201–1209.
- Mechichi T., Labat M., Woo T. H., Thomas P., Garcia J. L., Patel B. K. (1998): *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe* 4(6):283–291.
- Meinshausen M., Meinshausen N., Hare W., Raper S. C., Frieler K., Knutti R., Frame D. J., Allen (2009): Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2 degrees C. *Nature* 458(7242):1158–1162.
- Moench T. T., Zeikus J. G. (1983): Nutritional growth requirements for *Butyribacterium methylotrophicum* on single carbon substrates and glucose. *Curr. Microbiol.* 9(3):151–154.
- Mohammadi M., Najafpour G. D., Younesi H., Lahijani P., Uzir M. H., Mohamed A. R. (2011): Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15(9):4255–4273.

- Mohammadi M., Younesi H., Najafpour G., Mohamed A. R. (2012): Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87(6):837–843.
- Möller B., Oßmer R., Howard B. H., Gottschalk G., Hippe H. (1984): *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* 139(4):388–396.
- Monod J. (1949): The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3(1):371–394.
- Müller V. (2003): Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11):6345–6353.
- Müller V., Imkamp F., Biegel E., Schmidt S., Dilling S. (2008): Discovery of a ferredoxin NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125(1):137–146.
- Müller V., Inkamp F., Rauwolf A., Küsel K., Drake H. L. (2004): Molecular and cellular biology of aceto-genic bacteria: *In* Strict and Facultative Anaerobes: Medical and environmental aspects.
- Munasinghe P. C., Khanal S. K. (2010): Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource technol.* 101(13):5013–5022.
- Najafpour G., Younesi H. (2006): Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme Microb. Tech.* 38(1-2):223–228.
- Nevin K. P., Woodard T. L., Franks A. E., Summers Z. M., Lovley D. R. (2010): Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio* 1(2).
- Ollivier B., Cordruwisch R., Lombardo A., Garcia J.-L. (1985): Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* 142(3):307–310.
- Paul D., Austin F. W., Arick T., Bridges S. M., Burgess S. C., Dandass Y. S., Lawrence M. L. (2010): Genome sequence of the solvent-producing bacterium *Clostridium carboxidivorans* Strain P7. *J. Bacteriol.* 192(20):5554–5555.
- Peters V., Janssen P. H., Conrad R. (1999): Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen. *Curr. Microbiol.* 38(5):285–289.
- Phillips J. R., Atiyeh H. K., Tanner R. S., Torres J. R., Saxena J., Wilkins M. R., Huhnke R. L. (2015): Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource technol.* 190:114–121.
- Phillips J. R., Klasson K. T., Clausen E. C., Gaddy J. L. (1993): Biological production of ethanol from coal synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40(1):559–571.
- Pierce E., Xie G., Barabote R. D., Saunders E., Han C. S., Detter J. C., Richardson P., Brettin T. S., Das A., Ljungdahl L. G., Ragsdale S. W. (2008): The complete genome sequence of

- Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). Environ. Microbiol. 10(10):2550–2573.
- Poehlein A., Bengelsdorf F. R., Schiel-Bengelsdorf B., Gottschalk G., Daniel R., Dürre P. (2015): Complete genome sequence of Rnf- and Cytochrome-containing Autotrophic acetogen *Clostridium aceticum* DSM 1496. Genome Announc. 3(4):e00786-15.
- Poehlein A., Gottschalk G., Daniel R. (2013): First Insights into the genome of the gram-negative, endospore-forming organism *Sporomusa ovata* strain H1 DSM 2662. Genome Announc. 1(5).
- Ragsdale S. W. (2004): Life with carbon monoxide. Crit. Rev. Biochem. Mol. 39(3):165–195.
- Ragsdale S. W. (2009): Nickel-based enzyme systems. J. Biol. Chem. 284(28):18571–18575.
- Ragsdale S. W., Pierce E. (2008): Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. Biochem. Biophys. Acta 1784(12):1873–1898.
- Ragsdale S. W., Wood H. G. (2008): Enzymology of the Acetyl-CoA pathway of CO<sub>2</sub> fixation. Crit. Rev. Biochem. Mol. 26(3-4):261–300.
- Ramió-Pujol S., Ganigué R., Bañeras L., Colprim J. (2014): Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETC and *Clostridium carboxidivorans* P7 grown on syngas. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology 17(4):195–204.
- Rey F. E., Faith J. J., Bain J., Muehlbauer M. J., Stevens R. D., Newgard C. B., Gordon J. I. (2010): Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. J. Biol. Chem. 285(29):22082–22090.
- Rieu-Lesme F., Morvan B., Collins M. D., Fonty G., Willems A. (1996): A new H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-using acetogenic bacterium from the rumen: Description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. FEMS Microbiol. Lett. 140(2-3):281–286.
- Roh H., Ko H.-J., Kim D., Choi D. G., Park S., Kim S., Chang I. S., Choi I.-G. (2011): Complete genome sequence of a carbon monoxide-utilizing acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. J. Bacteriol. 193(1):307–308.
- Savage M. D., Drake H. L. (1986): Adaptation of the acetogen *Clostridium thermoautotrophicum* to minimal medium. J. Bacteriol. 1986(165(1)):315–318.
- Saxena J., Tanner R. S. (2011): Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanogenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology) 38(4):513–521.
- Saxena J., Tanner R. S. (2012): Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. World J. Microbiol. Biotechnol. (World Journal of Microbiology and Biotechnology) 28(4):1553–1561.
- Schiel-Bengelsdorf B., Dürre P. (2012): Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. FEBS Lett. 586(15):2191–2198.

- Schink B. (1984): *Clostridium magnum* sp. nov., a non-autotrophic homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol. 137(3):250–255.
- Schmidt S. (2011): Die Entschlüsselung des Genoms von *Acetobacterium woodii*: Neue Einblicke in die Lebensweise und Bioenergetik eines acetogenen Bakteriums. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Schuchmann K., Müller V. (2014): Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. Nat. Rev. Micro. 12(12):809–821.
- Sim J. H., Kamaruddin A. H., Long W. S., Najafpour G. (2007): *Clostridium aceticum*—A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. Enzyme Microb. Tech. 40(5):1234–1243.
- Simankova M. V., Kotsyurbenko O. R., Stackebrandt E., Kostrikina N. A., Lysenko A. M., Osipov G. A., Nozhevnikova A. N. (2000): *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil. Arch. Microbiol. 174(6):440–447.
- Simpson S. D., Warner I. L., Fung J. M. Y., Köpke M. (2010): Optimised fermentation media(WO2010064932 A1).
- Sleat R., Mah R. A., Robinson R. (1985): *Acetoanaerobium noterae* gen. nov., sp. nov: An anaerobic bacterium that forms acetate from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Int. J. Syst. Bacteriol. 35(1):10–15.
- Speers A. M., Cologgi D. L., Reguera G. (2009): Anaerobic cell culture. Current protocols in microbiology Appendix 4:Appendix 4F.
- Straub M., Demler M., Weuster-Botz D., Dürre P. (2014): Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*. J. Biotechnol. 178:67–72.
- Stupperich E., Konle R. (1993): Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3,4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata*. Appl. Environ. Microbiol. 59(9):3110–3116.
- Sucden (2015): World ethanol market. [http://www.sucden.com/statistics/10\\_world-ethanol-market](http://www.sucden.com/statistics/10_world-ethanol-market). Zuletzt geprüft am 24. Februar 2015.
- Tanaka K., Pfennig N. (1988): Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. Arch. Microbiol. 149(3):181–187.
- Tanner R. S., Miller L. M., Yang D. (1993): *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. Int. J. Syst. Bacteriol. 43(2):232–236.
- Tanner R. S., Stackebrandt E., Fox G. E., Woese C. R. (1981): A phylogenetic analysis of *Acetobacterium woodii*, *Clostridium barkeri*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium lituseburense*, *Uubacterium limosum*, and *Eubacterium tenue*. Curr. Microbiol. 5(1):35–38.
- Tirado-Acevedo O., Chinn M. S., Grunden A. M. (2010): Production of biofuels from synthesis gas using microbial catalysts. In , Band 70. Advances in Applied Microbiology. Elsevier, S 57–92.

- Transparency Market Research (2015): Butanediol , 1,3 butadiene and methyl ethyl ketone market driven by 1, 4 butanediol segment.  
<http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/butanediol-butadiene-and-mek-market.htm>. Zuletzt geprüft am 25. Februar 2016.
- Traunecker J., Preuß A., Diekert G. (1991): Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156(5):416–421.
- Ueki T., Nevin K. P., Woodard T. L., Lovley D. R. (2014): Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii*. *mBio* 5(5):e01636-14-e01636-14.
- Vega J. L., Prieto S., Elmore B. B., Clausen E. C., Gaddy J. L. (1989): The biological production of ethanol from synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol. (Applied Biochemistry and Biotechnology)* 20-21(1):781–797.
- Visser M., Pieterse M. M., Pinkse M. W. H., Nijssse B., Verhaert, Peter D. E. M., Vos W. M. de, Schaap P. J., Stams A. J. M. (2015): Unravelling the one-carbon metabolism of the acetogen *Sporomusa* strain An4 by genome and proteome analysis. *Environ. Microbiol. (Environmental Microbiology)*:n/a-n/a.
- Wang G., Wang D. (1984): Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984:294–298.
- Wiegel J., Braun M., Gottschalk G. (1981): *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.* 5(4):255–260.
- Wieringa K. T. (1936): Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek* 3(1-4):263–273.
- Yerushalmi L., Volesky B. (1985): Importance of agitation in acetone-butanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 27(9):1297–1305.
- Zavarzin G. A., Zhilina T. N., Pusheva M. A. (1995): Halophilic acetogenic bacteria. In Drake H. L. (Hrsg.) *Acetogenesis*. Springer US, Boston, MA, S 432–444.
- Zeikus J. G., Lynd L. H., Thompson T. E., Krzycki J. A., Weimer P. J., Hegge P. W. (1980): Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the marburg strain. *Curr. Microbiol.* 3(6):381–386.
- Zhilina T. N., Zavarzin G. A. (1990): Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 87(3-4):315–322.
- Zhu Z., Guo T., Zheng H., Song T., Ouyang P., Xie J. (2015): Complete genome sequence of a malodorous-producing acetogen, *Clostridium scatologenes* ATCC 25775T. *J. Biotechnol.* 212:19–20.

## 10 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. fimetarium</i>	<i>Acetobacterium fimetarium</i>
<i>A. wieringae</i>	<i>Acetobacterium wieringae</i>
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>
<i>B. hydrogenotrophica</i>	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>
BTM	Biotrockenmasse
<i>C. magnum</i>	<i>Clostridium magnum</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CoFeS-P	Corrinoid/Eisen-Schwefel Protein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. aggregans</i>	<i>Eubacterium aggregans</i>
Ech	Energiekonservierende Hydrogenase
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
HEPA	Sterilfilter ( <i>engl. high efficiency particulate arrestance filter</i> )
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <i>engl. high pressure liquid chromatographie</i> )
k <sub>La</sub>	Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient
μ <sub>max</sub>	Maximale Wachstumsrate
μ-GC	μ-Gaschromatograph
MFC	Massendruckflussregler ( <i>engl. mass flow controller</i> )
MFM	Massendurchflussmesser ( <i>engl. mass flow meter</i> )

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatpuffer ( <i>engl. phosphate buffered system</i> )
pCO	Kohlenstoffmonoxidpartialdruck
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pH <sub>2</sub>	Wasserstoffpartialdruck
PPG	Polypropylenglycol
q <sub>p</sub>	Zellspezifische Produktbildungsrate
Q <sub>p</sub>	Volumetrische Produktbildungsrate
Rnf	Ferredoxin-NAD <sup>+</sup> Oxidoreduktase
rpm	Drehzahl ( <i>engl. revolutions per minute</i> )
<i>S. acidovorans</i>	<i>Sporomusa acidovorans</i>
SLP	Substratkettenphosphorylierung
<i>S. ovata</i>	<i>Sporomusa ovata</i>
THF	Tetrahydrofolat
VE-H <sub>2</sub> O	Vollentsalztes Wasser

---

## 11 Anhang

### 11.1 Medienzusätze und Puffer

**Tabelle 11.1:** Zusammensetzung des PBS-Puffers

Komponente	Konzentration	Einheit
KCl	0,20	g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24	g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,44	g L <sup>-1</sup>
NaCl	8	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle 11.2:** Zusammensetzung der Vitaminlösung für das GA-Medium

Komponente	Konzentration	Einheit
Biotin	2,0	mg L <sup>-1</sup>
D-Ca-Panθοthenat	5,0	mg L <sup>-1</sup>
Folsäure	2,0	mg L <sup>-1</sup>
Liponsäure	5,0	mg L <sup>-1</sup>
Nikotinsäure	5,0	mg L <sup>-1</sup>
p-Aminobenzoessäure	5,0	mg L <sup>-1</sup>
Pyridoxin-HCl	10,0	mg L <sup>-1</sup>
Riboflavin	5,0	mg L <sup>-1</sup>
Thiamin-HCl x H <sub>2</sub> O	5,0	mg L <sup>-1</sup>
Vitamin B <sub>12</sub>	0,1	mg L <sup>-1</sup>

**Tabelle 11.3:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das GA-Medium. Zunächst wird das Eisenchlorid in der Salzsäure gelöst und anschließend mit Wasser verdünnt. Anschließend werden die restlichen Komponenten eingewogen.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Einheit</b>
HCl (25 %; 7,7 M)	10,0	mL L <sup>-1</sup>
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5	g L <sup>-1</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	70,0	mg L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	100,0	mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0	mg L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190,0	mg L <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,0	mg L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24,0	mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36,0	mg L <sup>-1</sup>

**Tabelle 11.4:** Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung für das GA-Medium.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Einheit</b>
NaOH	0,5	g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	3,0	mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4	mg L <sup>-1</sup>

## 11.2 $\mu$ -GC-Methodik

Zur Bestimmung der Gasanteile im Abgas der Rührkesselreaktoren wurden  $\mu$ -Gaschromatographen eingesetzt, welche online im Abstand von 10 Minuten die Gaszusammensetzung ermittelten. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von  $10 \text{ mL min}^{-1}$  verwendet. Es wurde mit dem Gaschromatographen CP-4900 von Varian (siehe Tabelle 11.5) oder dem  $\mu$ -Gaschromatographen 490 von Agilent (siehe

Tabelle 11.7) gearbeitet, wobei die in

Tabelle 11.6 und Tabelle 11.8 zusammengefassten Methoden verwendet wurden.

**Tabelle 11.5:**  $\mu$ -Gaschromatograph CP-4900 von Varian.

Komponente	Typ/Version	Hersteller
$\mu$ -Gaschromatograph	CP-4900	Varian
GC-Modul für $\text{H}_2/\text{CO}$ (Vorsäule, Säule, Detektor)	Mol Sieve 5 Å, 10 m	Varian
GC-Modul für $\text{CO}_2$ (Vorsäule, Säule, Detektor)	Plora Plot PPQ, 10 m	Varian

**Tabelle 11.6:** Methodik zur Bestimmung der Konzentration an  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und im Abgas bei Verwendung des  $\mu$ -Gaschromatographen CP-4900 von Varian.

Parameter	Mol Sieve	PPQ
Säulentemperatur	45 °C	60 °C
Injektionszeit	50 ms	100 ms
Backflush	6 s	-
Druck	25 psi	25 psi

**Tabelle 11.7:**  $\mu$ -Gaschromatograph 490 von Agilent.

Komponente	Typ/Version	Hersteller
$\mu$ -Gaschromatograph	490 Micro GC	Agilent
Säulentyp	1 m $\text{CO}_x$	Agilent
Software	Open LAB CDS	Agilent

**Tabelle 11.8:** Methodik zur Bestimmung der Konzentration an H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und im Abgas bei Verwendung des  $\mu$ -Gaschromatographen 490 von Agilent.

Parameter	Mol Sieve
Säulentemperatur	80 °C
Injektionszeit	60 ms
Backflush	30 s
Druck	200 kPa

### 11.3 GA-Medium

In diesem Kapitel sind die Rohdaten zu den in Kapitel 5.2.1 dargestellten Ergebnissen angegeben. Verglichen werden jeweils die Daten der autotrophen Kultivierung in GA-Medium und der autotrophen Kultivierung in dem von der DSMZ vorgeschlagenem Medium.

**Tabelle 11.9:** Vergleich der maximalen Biotrockenmassekonzentration.

	BTM <sub>max</sub> , g L <sup>-1</sup> (GA-Medium)	BTM <sub>max</sub> , g L <sup>-1</sup> (DSMZ-Medium)
<i>A. fimetarium</i>	0.08	0.05
<i>A. wieringae</i>	0.38	0.37
<i>B. hydrogenotrophica</i>	0.14	0.41
<i>C. magnum</i>	0.11	0.11
<i>E. aggregans</i>	0.12	0.10
<i>S. acidovorans</i>	0.24	0.18
<i>S. ovata</i>	0.40	0.32
<i>T. mayombeii</i>	0.18	0.22

**Tabelle 11.10:** Vergleich der maximalen Acetatkonzentration.

	Acetat <sub>max</sub> , g L <sup>-1</sup> (GA-Medium)	Acetat <sub>max</sub> , g L <sup>-1</sup> (DSMZ-Medium)
<i>A. fimetarium</i>	1.07	0.59
<i>A. wieringae</i>	3.65	3.69
<i>B. hydrogenotrophica</i>	3.36	4.38
<i>C. magnum</i>	2.83	3.53
<i>E. aggregans</i>	0.89	0.37
<i>S. acidovorans</i>	4.87	4.63
<i>S. ovata</i>	3.58	3.70
<i>T. mayombeii</i>	3.46	3.51

**Tabelle 11.11:** Vergleich der maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate.

	Q <sub>p,max</sub> , g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> (GA-Medium)	Q <sub>p,max</sub> , g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> (DSMZ-Medium)
<i>A. fimetarium</i>	0.47	0.10
<i>A. wieringae</i>	3.21	3.10
<i>B. hydrogenotrophica</i>	1.38	3.89
<i>C. magnum</i>	1.25	1.26
<i>E. aggregans</i>	0.24	0.06
<i>S. acidovorans</i>	3.43	0.65
<i>S. ovata</i>	3.05	2.89
<i>T. mayombeii</i>	3.28	3.47

**Tabelle 11.12:** Vergleich der maximalen zellspezifischen Acetatbildungsrate.

	q <sub>p,max</sub> , g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> (GA-Medium)	q <sub>p,max</sub> , g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> (DSMZ-Medium)
<i>A. fimetarium</i>	10.11	2.47
<i>A. wieringae</i>	15.19	15.20
<i>B. hydrogenotrophica</i>	18.60	16.41
<i>C. magnum</i>	12.51	12.44
<i>E. aggregans</i>	1.17	0.64
<i>S. acidovorans</i>	22.61	14.89
<i>S. ovata</i>	17.83	14.98
<i>T. mayombeii</i>	19.34	20.55

## 11.4 Zugangsnummern für 16s rRNA Gensequenzen

**Tabelle 11.13:** GanBank Zugangsnummern der 16s rRNA Gensequenzen die für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums in Kapitel 5.1 verwendet wurden.

<b>Acetogene Bakterien</b>	<b>GenBank Zugangsnummern</b>
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	M59083
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	GU562448
<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	X96956
<i>Acetobacterium fimetarium</i>	X96959
<i>Acetobacterium malicum</i>	X96957
<i>Acetobacterium paludosum</i>	X96958
<i>Acetobacterium tundrae</i>	AJ297449
<i>Acetobacterium wieringae</i>	X96955
<i>Acetobacterium woodii</i>	CP002987
<i>Acetohalobium arabaticum</i>	CP002105
<i>Acetonema longum</i>	AJ010964
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	FJ438469
<i>Blautia coccoides</i>	AB571656
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	AB910751
<i>Blautia producta</i>	L76595
<i>Blautia schinkii</i>	X94965
<i>Butyribacterium mythylophilum</i>	AF064241
<i>Clostridium aceticum</i>	Y18183
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	Y18178
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	FR733710
<i>Clostridium drakei</i>	Y18813
<i>Clostridium glycolicum</i>	AJ291746
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	FR733688
<i>Clostridium magnum</i>	X77835
<i>Clostridium methoxybenzovorans</i>	AF067965
<i>Clostridium ragsdalei</i>	DQ020022
<i>Clostridium scatologenes</i>	M59104
<i>Eubacterium aggregans</i>	AF073898
<i>Eubacterium limosum</i>	M59120
<i>Moorella thermoacetica</i>	AY656675
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	L09168
<i>Sporomusa acidovorans</i>	AJ279798
<i>Sporomusa aerovorans</i>	AJ506191

Acetogene Bakterien	GenBank Zugangsnummern
<i>Sporomusa malonica</i>	AJ279799
<i>Sporomusa ovata</i>	AJ279800
<i>Sporomusa paucivorans</i>	FR749939
<i>Sporomusa rhizae</i>	AM158322
<i>Sporomusa silvacetica</i>	Y09976
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	AJ279801
<i>Sporomusa termitida</i>	M61920
<i>Terrisporobacter mayombeii</i>	FR733682
<i>Thermoacetogenium phaeum</i>	CP003732
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	L09160
<i>Treponema primitia</i>	CP001843

## 11.5 Verwendete Chemikalien Materialien

Tabelle 11.14: Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	Carl Rotz
Ammoniumchlorid	$NH_4Cl$	Carl Roth
Betain	$C_5H_{11}NO_2$	Carl Roth
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Carl Roth
Borsäure	$H_3BO_3$	Sigma Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	Merck
Cobaltsulfat-Heptahydrat	$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck
Cyanocobalamin	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Carl Roth
D-Calciumpanthotenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	$K_2HPO_4$	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4$	Merck
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth
Eisen(III)citrat	$C_6H_5FeO_7$	Sigma Aldrich
Folsäure	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	Carl Roth
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Carl Roth
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Carl Roth
Glycerin, 99,5%	$C_3H_8O_3$	Hugo Häffner Vertrieb

<b>Chemikalie</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller</b>
Hefeextrakt	-	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
Kaliumsulfat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	Carl Roth
L-Cystein · HCl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S · HCl	Carl Roth
Liponsäure	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Mangansulfat-Monohydrat	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumacetat	NaCH <sub>3</sub> COO	Carl Roth
Natriumacetat-Trihydrat	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Natriumborhydrid	NaBH <sub>4</sub>	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumformiat	NaCOOH	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumnitrat	NaNO <sub>3</sub>	Carl Roth
Natriumnitrit	NaNO <sub>2</sub>	Merck
Natriumselenit	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
Natriumsulfid-Nonahydrat	Na <sub>2</sub> S · 9 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Natriumsulfit	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Merck
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Nikotinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Merck
Nitrilotriessigsäure	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub>	Merck
p-Aminobenzoesäure	NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH	Merck
Phosphinsäure	H <sub>3</sub> PO <sub>2</sub>	Fluka
Phosphorige Säure	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
Polypropylenglykol	H[OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> OH	Sigma Aldrich
Pyridoxin · HCl	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>3</sub>	Carl Roth
Riboflavin	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Sigma Aldrich
Thiamin · HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl	Sigma Aldrich
Titanium(III) chlorid	TiCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Merck

**Tabelle 11.15:** Verwendete Gase

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

**Tabelle 11.16:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Gas	Produktnummer	Lieferant
Anaerobe Kulturröhrchen	Hungate Typ, 16 x 125 mm, mit Butylgummi-Septum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
Butylstopfen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Einmalkanülen	0,6 x 30 mm, 0,9 x 70 mm	B. Braun Melsungen
Einwegküvetten	Ratiolab Küvetten, Halbmikro	Ratiolab
Einwegspritzen	1, 5, 10 mL	B. Braun Melsungen
Einwegspritzen	20 und 50 mL	Becton Dickinson
Filterplatten	AcroPrep 96-Well Filterplatte 1 mL	Pall Corporation
HPLC Probefläschchen	Rollrandflasche ND11 mit Aluminium-Bördelkappe und Septum, 1,5 mL	VWR
Laborglasflaschen, beschichtet	Duran protect mit DIN Gewinde GL45, PU-ummantelt, 50, 250, 1000 und 2000 mL	Sigma Aldrich
Lochkappen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Mikrotiterplatte	Deepwell, 96	Nunc
Pipettenspitzen	200 und 1000 µL	Gilson
Pipettenspitzen, steril	200 und 1000 µL	VWR
Pipettenspitzen	10 mL	Brand
Probenahmeröhrchen	BD Vacutainer, 5 mL	Becton Dickinson
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Spritzenvorsatzfilter	Porengröße, 0,2 µm, steril	VWR
Zentrifugenröhrchen	Falcon-Typ, 15 und 50 mL	Greiner Bio-One
Zu-/Abluftfilter	AcroR 37 TF, PTFE 0,2 µM auf PP-Träger	Pall Corporation

## 11.6 Verwendete Geräte

**Tabelle 11.17:** Allgemeine Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Analytische Waage	Explorer E121245 (0,1 mg – 210 g)	Ohaus
Analytische Waage	Explorer E1N213 (5 g – 32 kg)	Ohaus
Analytische Waage	Scout Pro 4000 g	Ohaus
Autoklav	H + P 500 EC-Z	H + P Labortechnik
Autoklav	H + P Varioklav	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 14pH	Schott
Mobiles pH-Meter	PCE-PHD2	PCE Group
pH-Elektrode	HI 1330 B	HANNA-Instruments
Einstrahlphotometer	Spectronic Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
Schüttelinkubator	AJ 119	Infors
Brutschrank/Inkubator	INB 200	Binder
Trockenschrank	Serie E 28 L	Binder
Heizpilz	U2/2000 2L	Heraeus-Wittman
Pipetten	Transferpette S	Brand
Vortexer	Reax top	Heidolph
Schauchpumpe	501U	Watson Marlow

**Tabelle 11.18:** Geräte für den Betrieb der Anaerobwerkbank

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Anaerobe Kammer aus Vinyl mit 2 manuell betriebenen Rundscheulen	TypA	Coy Laboratory, Vertrieb: Toepffer GmbH
Vakuumpumpe	G608NGX	Coy Laboratory Products
HEPA-Filtereinheit	Scout Pro 4000 g	Coy Laboratory Products
Gasmessgerät	H2 un O2	Coy Laboratory Products
Lüftergehäuse	Mit Trockenmittel und Palladiumkatalysatoren (StakPak)	Coy Laboratory Products

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Trockenofen zum Ausheizen der Katalysatoren	UNB 100	Memmert

**Tabelle 11.19:** Laborrührkesselreaktor und Peripheriegeräte

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Gasmischstation	WMR 4000	Westphal Mess- & Regeltechnik
Gasmischstation	F-101D-RAD-33-V	Bronkhorst
Laborrührkesselreaktor	Labfors 2	Infors
Laborrührkesselreaktor	Labfors 4	Infors
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo
Redoxelektrode	Pi 4805-SC-DPAS-K8S/120	Mettler Toledo
Software	IrisNT Pro Balance Version 4.11	Infors

**Tabelle 11.20:** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung</b>	<b>Hersteller</b>
Autosampler	HPLC Autosampler Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Manager	Smartline 5000	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Pumpe	HPLC Pumpe Plus	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
PI-Detektor	HPLC RI Detektor	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Säulenofen	Jet Stream 5 – 85 °C	Knauer
Software	Agilent EZChrom Elite	Agilent
Trennsäule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio-Rad

