

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur
autotrophen Herstellung von Acetat mit
*Acetobacterium woodii***

Martin Demler

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

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

Die Dissertation wurde am 03.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 26.03.2012 angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte:

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung, die konstruktive Kritik und Ratschläge und das mir entgegengebrachte Vertrauen und vor allem für die Freiräume beim Aufbau und der Bearbeitung dieses anwendungsorientierten Projektvorhabens. Bei Univ.-Prof. Dr.-Ing. Harald Klein und Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil Wolfgang Liebl möchte ich mich jeweils bedanken für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und des Zweitprüfers.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Peter Dürre, Dr. Michael Köpke und Melanie Straub (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm) für die Ratschläge beim apparativen Aufbau des Projekts und für den Bakterienstamm *Acetobacterium woodii*, sowie die rekombinanten *A. woodii* Stämme.

Bei den Projektpartnern Herr Dr. Rupert Pfaller und Herr Dr. Harald Voit (Wacker Chemie AG) für die konstruktive Zusammenarbeit.

Bei Christoph Bendig für die anregende Ratschläge. Bei Michel Weiner für die Probenahme zu den unmöglichsten Zeitpunkten, sowie die Hilfe bei der Aminosäureanalytik.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Bei Dr. Kathrin Hölsch, Michael Weiner, Dirk Hebel, Bernd Anselment, Harald Krispin und Michael Schmidt für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit und die konstruktiven Ratschläge.

Bei meinen Studenten Andrea Künzel, Silvia Blank, Christina Pfaffinger, Florian Huber und Michael Wokon für die fleißige Mitarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie und vor allem bei meiner Frau Philomena bedanken, die mich vollstens unterstützt hat und mir immer Rückhalt gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	4
3.1	Eigenschaften und Verwendung von Essigsäure	4
3.2	Herstellung von Essigsäure	5
3.2.1	Petrochemische Produktion von Essigsäure	5
3.2.2	Biotechnologische Produktion von Essigsäure.....	6
3.2.3	Alternative Ansätze zur biotechnologischen Produktion von Essigsäure	8
3.3	Acetogene Mikroorganismen	17
3.3.1	Heterotropher Stoffwechsel.....	18
3.3.2	Acetyl-CoA-Weg	20
3.3.3	Enzymologie von acetogenen Bakterien	23
3.3.4	Energiekonservierung acetogener Mikroorganismen	25
3.3.5	Inhibierung durch Acetat/Essigsäure.....	29
3.3.6	Toleranz gegenüber Sauerstoff.....	30
3.3.7	Einfluss von Medienbestandteilen	30
3.3.8	<i>Acetobacterium woodii</i>	33
3.4	Kultivierung von Mikroorganismen.....	34
3.4.1	Mikrobielles Wachstum	34
3.4.2	Satzverfahren	35
3.4.3	Prozessparameter.....	36
3.4.4	Gas-Flüssig-Stoffübergang in Bioreaktoren.....	38
3.5	Leistungseintrag	49

4	Material und Methoden	50
4.1	<i>Acetobacterium woodii</i> Stämme.....	50
4.2	Medien.....	51
4.3	Analytische Methoden.....	52
4.3.1	Bestimmung der Optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration	52
4.3.2	Analytik des Kulturüberstandes mittels HPLC.....	53
4.3.3	Bestimmung der Ammoniumkonzentration	53
4.4	Kultivierung von <i>Acetobacterium woodii</i>	53
4.4.1	Stammhaltung	54
4.4.2	Kultivierung in Septumflaschen	54
4.4.3	Parallele Satzkultivierung im Millilitermaßstab	55
4.4.4	Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab.....	58
4.5	Bestimmung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten.....	60
5	Autotrophe Herstellung von Acetat unter definierten Reaktionsbedingungen ...	61
5.1	pH.....	61
5.2	Wasserstoffpartialdruck.....	63
5.3	Gas-Flüssig-Stofftransport	69
5.3.1	Leistungseintrag.....	69
5.3.2	Gas-Flüssig-Stoffübergangskoeffizient	74
5.3.3	Abschätzung der maximalen Gaseintragsraten	76
5.3.4	Ermittlung der Substratverbrauchsraten	81
5.3.5	Einfluss der Ionenstärke auf den Stofftransport	84
5.4	Erhöhung der Biomassekonzentration	86
5.5	Variation des pH	89
6	Reaktionstechnische Untersuchung einzelner Medienbestandteile	92
6.1	Vitamine und Spurenelemente.....	92
6.2	Hefeextrakt	97
6.3	Schwefelquellen.....	100

6.4	Wachstum und Produktbildung in konzentrierten Medien	104
6.5	Fructose	107
6.5.1	Vergleich der hetero-, auto- und mixotrophen Herstellung von Acetat.....	107
6.5.2	Mixotrophe Herstellung von Acetat	110
6.6	Aminosäuren	112
6.7	Ammonium	119
6.8	Zusammenfassung der Untersuchung von Medienbestandteilen.....	127
7	Produktinhibierung durch Acetat.....	129
8	Charakterisierung von rekombinanten <i>Acetobacterium woodii</i> unter definierten Reaktionsbedingungen.....	136
8.1	Kultivierung im Parallelansatz.....	138
8.2	Vergleichende Kultivierung im Litermaßstab.....	139
9	Zusammenfassung.....	144
10	Ausblick	148
11	Literaturverzeichnis	149
12	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	163
13	Anhang.....	165
13.1	Sättigungskonzentrationen für H ₂ und CO ₂	165
13.2	Medien, Medienzusätze und Puffer	165
13.3	HPLC-Methodik	170
13.4	Bestimmung von Ammoniak	174
13.5	Mikro-GC-Methodik	175
13.6	Geräte	175
13.7	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Gase	178

1 Einleitung

Eine Vielzahl an Grund- und Feinchemikalien wird aktuell auf chemischem Wege auf der Basis von fossilen Rohstoffen hergestellt. Einhergehend mit anhaltenden Bedenken wegen fluktuierender Rohstoffpreise und möglicher Einschränkungen in der zukünftigen Versorgung mit diesen Rohstoffen, ist das Interesse gestiegen, viele dieser petrochemischen Herstellungsverfahren durch nachhaltige Prozesse auf der Basis nachwachsender Rohstoffe zu ersetzen. Zudem sind im Zuge aktueller Klimadiskussionen CO₂-fixierende Prozesse in den Fokus der Industriellen Biotechnologie gerückt.

Der Einsatz von Synthesegas für die Produktion von Chemikalien und Treibstoffen auf mikrobiellem Weg stellt eine Möglichkeit dar, diese Herausforderung gezielt anzugehen. Synthesegase entstehen als Abfallprodukt bei der Vergasung von Erdöl, Kohle und Biomasse und stellen einen kostengünstigen Rohstoff für biologische Produktionsprozesse dar. Eine Gruppe an Mikroorganismen, die als Acetogene bezeichnet werden, besitzt die Fähigkeit, die Inhaltsstoffe von Synthesegas (H₂, CO, CO₂) zu organischen Säuren und Alkoholen umzusetzen, was sie zu Kandidaten für biotechnologische Produktionsprozesse von Chemikalien und Treibstoffen macht (Henstra *et al.*, 2007). Steigendes kommerzielles Interesse hat zudem in jüngster Zeit zur Sequenzierung der Genome einiger dieser Mikroorganismen geführt (Köpke *et al.*, 2011a).

Das Hauptprodukt des Stoffwechsels dieser Gruppe an acetogenen Bakterien ist Essigsäure, die mit einer weltweiten Jahresproduktion von 7 Millionen Tonnen zu den wichtigsten Industriechemikalien gehört (Sauer *et al.*, 2008). Als Ausgangsprodukt für die chemische Industrie wird Essigsäure aktuell jedoch ausschließlich petrochemisch synthetisiert. Das Aufkommen von Mikroorganismen für die Umsetzung von Synthesegas zu Essigsäure hat dabei einige Schwachstellen der traditionellen katalytischen Konversionsprozesse aufgezeigt. So laufen chemische Synthesen beispielsweise bei hohem Druck und Temperaturen unter hohem Energieverbrauch ab, wohingegen biologische Prozesse unter milden Reaktionsbedingungen mit geringerem Energieverbrauch ablaufen können.

Essigsäure wird auf biotechnologischem Wege schon sehr lange durch die Oxidation von Ethanol mit Essigsäurebakterien gewonnen. Dieses Verfahren eignet sich auf Grund hoher Substratkosten im Vergleich zur chemischen Synthese jedoch nicht für die Herstellung von Essigsäure für die chemische Industrie. Eine Alternative könnte die Herstellung von Essigsäure durch Mikroorganismen aus CO₂ und H₂ sein. Acetogene Bakterien sind dabei ideale Kandidaten für die Entwicklung eines biotechnologischen Produktionsprozesses für Essigsäure, da sie durch Fixierung von CO₂ in Anwesenheit von Wasserstoff Essigsäure effizient und mit hohen Ausbeuten bilden können (Bredwell *et al.*, 1999).

2 Problemstellung und Zielsetzung

In den 1990er Jahren wurden zahlreiche Studien über die fast stöchiometrische Bildung von bis zu 56 g L^{-1} Acetat aus Hexosen und den gasförmigen Substraten H_2 und CO_2 mit acetogenen Mikroorganismen veröffentlicht (Wang und Wang, 1984; Morinaga und Kawada, 1990). Die geringe Säuretoleranz dieser Mikroorganismen und die Anforderung an neutralen pH für das Wachstum, bei dem die Essigsäure zum größten Anteil als schwer abtrennbares Acetatsalz vorliegt, haben den Einsatz in industriellen Produktionsprozessen jedoch verhindert (Wiegel, 1993). Trotz einiger Fortschritte in der Entwicklung alternativer Prozesse zur Herstellung von Acetat mit acetogenen Bakterien, wurden diese Ansätze hauptsächlich aufgrund der fallenden Ölpreise nicht weiter verfolgt (Busche, 1991).

Genauere Einsichten in den Stoffwechsel von acetogenen Bakterien und die Entdeckung weiterer Spezies, die das gasförmige Kohlenstoffmonoxid effektiv zu Ethanol und Butanol umsetzen können (Tanner *et al.*, 1993; Liou *et al.*, 2005), haben im letzten Jahrzehnt zu neu aufgeflamtem Interesse an diesen Mikroorganismen geführt. Das Potenzial einiger Vertreter dieser Gruppe an Mikroorganismen, Alkohole aus Kohlenstoffmonoxid zu bilden, hat zu Firmengründungen in den USA (Ineos Bio, Illinois; Coskata Inc., Illinois) und Neuseeland (LanzaTech, Auckland) geführt, mit dem Ziel, Ethanol mit acetogenen Bakterien aus Synthesegas in kommerziellem Maßstab zu produzieren (Köpke *et al.*, 2011a).

Die Fähigkeit dieser acetogenen Mikroorganismen, natürlicherweise hohe Konzentrationen an Acetat aus gasförmigen Substraten zu bilden, war in den letzten Jahren jedoch nicht Gegenstand aktueller Forschungsanstrengungen. So wurde die Acetatherstellung des acetogenen Bakteriums *Acetobacterium woodii* unter autotrophen Bedingungen in den 1990er Jahren das letzte Mal untersucht (Suzuki *et al.*, 1993). Die Herstellung von Acetat aus gasförmigen Substraten könnte eine Alternative zur petrochemischen Synthese dieser organischen Säure darstellen. Dabei ist es noch weitgehend unklar, wie die Betriebsbedingungen für einen autotrophen Acetatproduktionsprozesses eingestellt werden müssen, um hohe Produkt-bildungsraten mit dem eingesetzten Mikroorganismus *A. woodii* zu erreichen.

Im Zuge dieser Arbeiten sollen daher limitierende Schritte bei der Umsetzung der gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 durch *A. woodii* im Satzverfahren im Rührkesselreaktor unter definierten Reaktionsbedingungen identifiziert werden. Außerdem soll ermittelt werden, wie das Reaktionsmedium für einen autotrophen Acetatproduktionsprozess zusammengesetzt sein muss, um maximales Wachstum und Produktbildung des eingesetzten Bakterienstamms zu ermöglichen. Des Weiteren soll *A. woodii* bezüglich Acetatbildungsrate und maximaler Acetatkonzentration unter autotrophen Bedingungen charakterisiert werden.

Für autotrophe Kultivierungen im Satzexperimente stand ein Parallelrührkesselreaktorsystem im Milliliter-Maßstab und ein Laborrührkesselreaktor im Liter-Maßstab zur Verfügung. Folgende Arbeitsschritte waren zur Erreichung oben genannter Ziele geplant:

- Identifizierung möglicher Limitierungen bei der Umsetzung von gasförmigen Substraten durch *A. woodii* in Rührkesselreaktoren im Satzverfahren im Labormaßstab
- Reaktionstechnische Untersuchung einzelner Medienbestandteile im Parallelansatz
- Reaktionstechnische Untersuchung der Produktinhibierung durch Acetat/Essigsäure

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Eigenschaften und Verwendung von Essigsäure

Essigsäure ist eine der wichtigsten sauerstoffhaltigen Ausgangsverbindungen in der chemischen Industrie. Wässrige Lösungen der Essigsäure werden auch Essig genannt und reine Essigsäure "Eisessig". In der Natur kommt Essigsäure als Stoffwechselzwischenprodukt in allen Lebewesen vor. Sie entsteht unter anderem bei Fäulnis- und Gärungsvorgängen, sowie bei der Vergärung von Zuckern und deren Abbauprodukten durch Mikroorganismen.

Mit einem negativen dekadischen Logarithmus der Säurekonstante (pK_S) von 4,76 gehört die Essigsäure zu den schwachen Säuren. Unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH liegt Essigsäure überwiegend in dissoziierter Form als Acetat vor. Die Verteilung der Essigsäureformen in Abhängigkeit des pH ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Mit einer Weltjahresproduktion synthetischer Essigsäure von $7 \cdot 10^6$ Tonnen zählt die Essigsäure zu den chemischen "Building Blocks" (Sauer *et al.*, 2008). In der chemischen Industrie wird Essigsäure hauptsächlich als Ausgangsstoff für die Produktion von Vinyl- und Celluloseacetat eingesetzt. Vinylacetat dient als Monomerbaustein für Polyvinylacetat, das für die Herstellung von Farben, Lacken, Beschichtungen, Kleb- und Kunststoffen sowie Polyvinylalkoholen eingesetzt wird. Celluloseacetat hingegen findet Einsatz in der Herstellung von Textilfasern, Folien und Kunststoffprodukten (Cheung *et al.*, 2005).

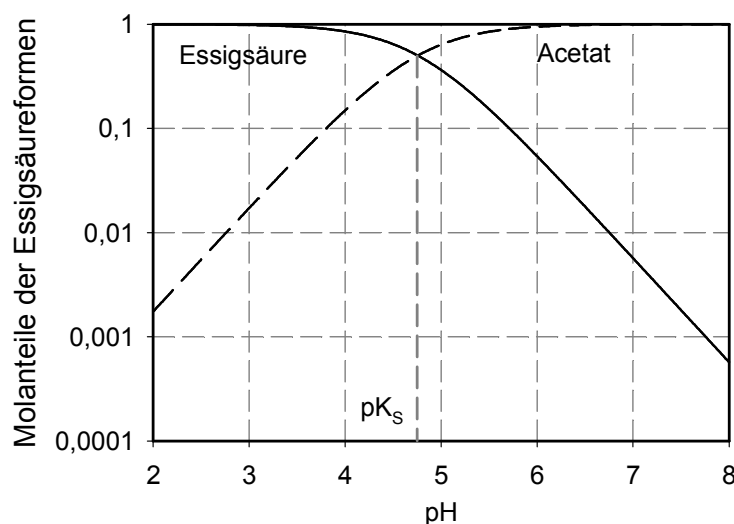


Abbildung 3.1: Essigsäureformen als Funktion des pH ($pK_S = 4,76$ bei $T = 25$ °C; Lide, 2007).

3.2 Herstellung von Essigsäure

Die industrielle Produktion von Essigsäure erfolgt aktuell über zwei unterschiedliche Herstellungsverfahren. Die chemische Synthese von Essigsäure als Rohstoff für weitere Syntheseverfahren und die biotechnologische Produktion zur Herstellung von Speiseessig für die Nahrungsmittelindustrie als Geschmacksträger und Konservierungsmittel.

3.2.1 Petrochemische Produktion von Essigsäure

Als industrieller Ausgangsstoff wird hochkonzentrierte Essigsäure heute ausschließlich über chemische Verfahren auf der Basis von fossilen Rohstoffen hergestellt. Dabei kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, die in Abbildung 3.2 aufgelistet sind:

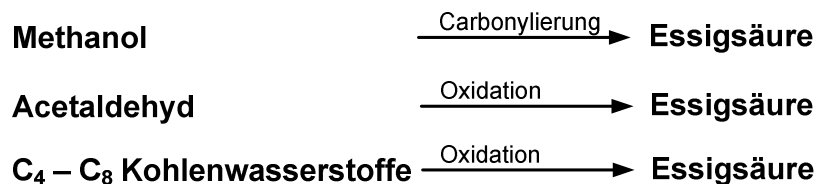
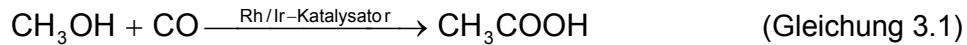


Abbildung 3.2: Übersicht über chemische Herstellungsverfahren für Essigsäure (nach Arpe, 2010).

Synthetische Essigsäure wurde ursprünglich durch Oxidation von Acetaldehyd produziert, was 1960 als Wacker-Hoechst-Verfahren etabliert wurde. Dieser Prozess hat jedoch zunehmend an Bedeutung verloren im Vergleich zum wesentlich wirtschaftlicheren Monsanto-Prozess, bei dem Essigsäure über Carbonylierung von Methanol hergestellt wird. Dieses Verfahren ist heute mit einem Anteil von etwa 60 % an der Gesamtproduktion der bedeutendste Prozess für die industrielle Herstellung von Essigsäure (Yoneda *et al.*, 2001). Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass der Rohstoff Methanol nicht primär auf Erdöl basiert, sondern über Synthesegas aus einer Vielzahl von Rohstoffquellen wie Erdgas oder Kohle gewonnen werden kann. Dabei wird Methanol mit Kohlenmonoxid nach Gleichung 3.1 über einen Rhodium-Katalysator zur Essigsäure umgesetzt. Dieser Prozess findet typischerweise bei einem Druck von 30 - 60 bar und einer Temperatur von 150 - 200 °C mit statt. Dabei wird eine Selektivität von über 99 % erreicht (Cheung *et al.*, 2005).

Ergänzt wurde dieser Prozess mittlerweile durch den vom BP-Konzern kommerzialisierten Cativa-Prozess, der bei einem ähnlichen Reaktionsmechanismus einen Iridium-Katalysator verwendet. Dieser Katalysator besitzt eine höhere Stabilität und bildet bei der Reaktion weniger Wasser und flüssige Nebenprodukte (Haynes, 2006).



Des Weiteren existieren Wege zur industriellen Herstellung von Essigsäure über Flüssigphasenoxidation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen wie Rohbezin oder *n*-Butan. Auf Grund des wirtschaftlichen Drucks der Carbonylierungstechnologie spielen diese Verfahren heute allerdings nur noch eine untergeordnete Rolle.

3.2.2 Biotechnologische Produktion von Essigsäure

Derzeit werden etwa 190.000 Jahrestonnen Essigsäure auf biotechnologischen Wege hergestellt. Die Kommerzialisierung erfolgte jedoch ausschließlich für die Produktion von Speiseessig für die Nahrungsmittelindustrie (Sauer *et al.*, 2008). Speiseessig ist eine wässrige Lösung von 4 - 12 % Essigsäure und wird aerob in einem zweistufigen Verfahren durch mikrobielle Oxidation von Zucker hergestellt. Über handwerkliche Traditionsverfahren wird heutzutage noch hochwertiger Speiseessig hergestellt. In technischem Maßstab erfolgt die Essigsäureherstellung ausgehend von Melasse, einem Nebenprodukt bei der Zuckerproduktion, die zunächst von Hefen zu Ethanol vergoren wird.

Im großtechnischen Maßstab zur Produktion von Speiseessig wird hauptsächlich das Submersverfahren eingesetzt, in dem die Bakterien frei in Suspension vorliegen. Es kommen hauptsächlich sogenannte Frings-Acetatoren zum Einsatz, die sich durch optimale Belüftung mittels selbstansaugenden Rotor/Stator-Systemen und Wärmeabführung über integrierte Rohrwärmetauscher auszeichnen (vgl. Abbildung 3.3) (Adams und Moss, 2008). Der Reaktor wird drucklos mit Luft begast mit einer Rate von 3 - 4 Gasvolumen pro Flüssigvolumen pro Minute (vvm) bei einer Rührerdrehzahl von 1500 min⁻¹. Die Konzentration des Substrats Ethanol im Medium wird kontinuierlich gemessen über einen Alkographen. Geht die Ethanolkonzentration gegen Null, so wird ein Großteil des Reaktorinhalts automatisch entleert und der Behälter mit frischem Medium neu befüllt (Rogers *et al.*, 2006). Unter semi-kontinuierlichen Bedingungen wird in diesen Reaktoren Speiseessig in Konzentrationen bis 150 g L⁻¹ erzeugt (Syldatk, 2006).

Andere Verfahrensvarianten wie beispielsweise die Verwendung immobilisierter Essigsäurebakterien in Airlift-Bioreaktoren oder Zulauf-Betrieb weisen zum Teil höhere Produktivitäten (> 100 g L⁻¹ h⁻¹) und höhere Produktkonzentrationen (bis zu 170 g L⁻¹) auf, konnten sich industriell bis jetzt aber noch nicht durchsetzen (Berraud, 2000; Syldatk, 2006).

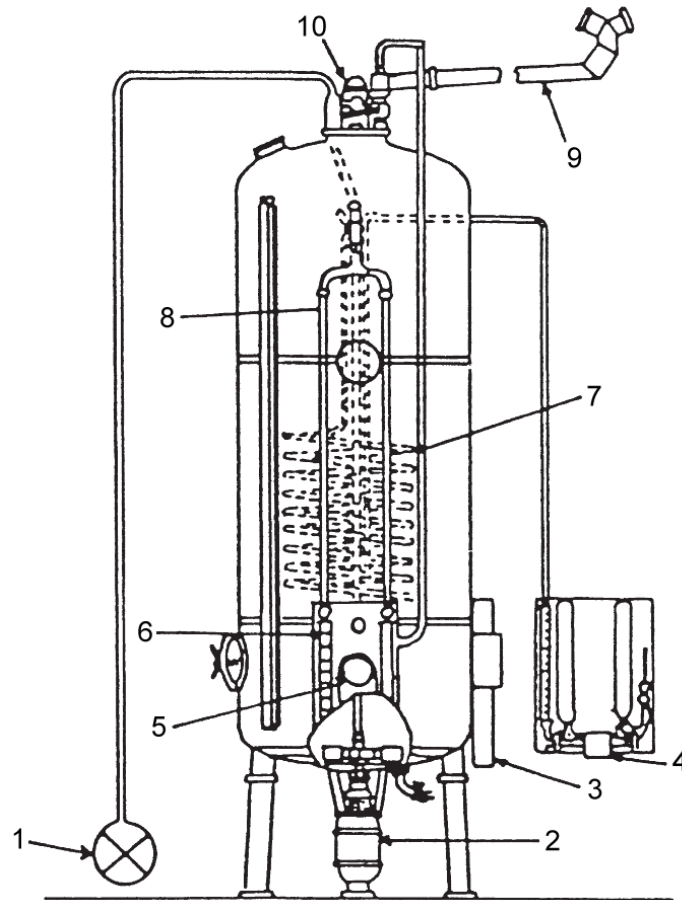
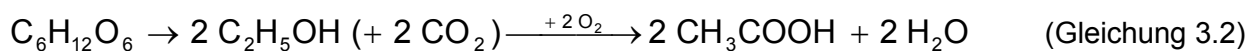


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines Frings-Acetators (Adams und Moss, 2008; Heinrich Frings GmbH & Co KG, Bonn).

1: Dosiereinrichtung für Maische/Melasse, 2: Belüftungsrührer, 3: Alkograph zur Bestimmung der Ethanolkonzentration, 4: Kühlwasserventil, 5: Thermometer zur Temperaturkontrolle, 6: Strömungsmesser zur Regelung der Zuluft, 7: Rohrwärmetauscher, 8: Zuluftleitung, 9: Abgasleitung, 10: mechanischer Schaumzerstörer.

Bei der zweistufigen Herstellung von Essigsäure aus Zucker werden im ersten Schritt die Zuckerbestandteile unter anoxischen Bedingungen durch alkoholischen Gärung mit Hilfe von Hefen bei 30 °C zu Ethanol und CO₂ umgesetzt. Im zweiten Schritt erfolgt die Essigsäureproduktion durch Oxidation von Ethanol unter aeroben Bedingungen mit Hilfe von Essigsäurebakterien der Gattung *Acetobacter* und *Gluconobacter* bei 30 °C. Die Stöchiometrie der zweistufigen Essigsäurebildung ist in Gleichung 3.2 angegeben. Der aerobe Prozess ist auf Grund des CO₂-Verlusts limitiert auf zwei Moleküle Acetat pro Molekül Glucose (0,67 g_{Acetat} g_{Glucose}⁻¹) (Partin und Heise, 1992).



Für eine optimale Umsetzungsrate muss der Prozess unter definierten Bedingungen ablaufen. Vor allem die Versorgung mit Sauerstoff spielt eine entscheidende Rolle, da die Bakterien äußerst empfindlich auf Veränderungen des Sauerstoffgehalts reagieren. Essigsäurebakterien

konservieren Energie durch Oxidation von Ethanol, die für das Überleben im Medium bei niedrigem pH und einem Essigsäuregehalt von 100 - 140 g L⁻¹ benötigt wird. Bereits eine kurzzeitige Unterbrechung der Sauerstoffversorgung führt zum Absterben der Bakterien und irreversiblen Ausfall der Produktbildung (Adams und Moss, 2008). Des Weiteren besitzen einige Essigsäurebakterien die Fähigkeit, das gebildete Acetat wieder zu CO₂ und H₂O verstoffwechseln, was als "Überoxidation" beschrieben ist. Da die Anwesenheit von Ethanol diesen Stoffwechselweg unterdrückt, darf die Ethanolkonzentration während der Fermentation nicht unter einen kritischen Wert von 0,5 - 3 g L⁻¹ fallen (Rogers *et al.*, 2006).

3.2.3 Alternative Ansätze zur biotechnologischen Produktion von Essigsäure

Neben dem klassischen zweistufigen Prozess über das Zwischenprodukt Ethanol vermag eine weitere Gruppe an Mikroorganismen, acetogene Bakterien der Gattung *Clostridium* und *Acetobacterium*, unter strikt anaeroben Bedingungen eine nahezu stöchiometrische Umsetzung von Zuckern zu Essigsäure über einen einstufigen Prozess. Einige Vertreter dieser Gruppe an Mikroorganismen besitzen zudem die Fähigkeit, aus den gasförmigen Substraten Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid Essigsäure zu bilden. Prozessentwicklungen zur anaeroben Acetatbildung durch acetogene Bakterien haben sich daher zum größten Teil auf die Fermentation von Zuckern konzentriert.

Acetatproduktion aus organischen Kohlenstoffquellen

Der Vorteil der acetogenen Mikroorganismen ist ihre Fähigkeit, Zucker nach Gleichung 3.3 fast stöchiometrisch zu Acetat umzusetzen.



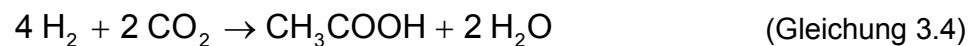
Da thermophile Mikroorganismen größeres Potential für wirtschaftliche Produktionsprozessen besitzen, wurden bei der Entwicklung von Prozessen zur anaeroben Essigsäureherstellung aus Zuckern hauptsächlich thermophile Vertreter dieser Gruppe eingesetzt. Vorteilhaft wirken sich unter anderen die reduzierten Kosten für die Kühlung des Fermentationsmediums, die Aufrechterhaltung von anaeroben Bedingungen und das geringere Kontaminationsrisiko aus (Wiegel, 1994).

Acetogene Mikroorganismen sind sowohl empfindlich gegenüber hohen Zuckerkonzentrationen als auch gegenüber hohen Säurekonzentrationen, daher werden ohne pH-Kontrolle weniger als 20 g L⁻¹ Essigsäure auf Glucose als Substrat erreicht. Durch Kontrolle des pH bei 6,9 und der eingesetzten Substratkonzentration konnte mit einigen Mikroorganismen bis zu 56 g L⁻¹ Acetat im Satzverfahren gebildet werden (Wiegel, 1994; Wang und Wang, 1984). Außerdem konnte durch Anwendung von Zulauf- und kontinuierlichen Verfahren sowie Immobilisierungs-techniken

die Produktbildungsraten auf bis zu $0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erhöht werden (Shah und Cheryan, 1995). Durch Immobilisierung der Mikroorganismen konnte auch die Resistenz gegenüber der gebildeten Säure erhöht werden. In einem Faserbett-Reaktor konnte mit *Clostridium formicoaceticum* somit die erreichte Acetatkonzentration von $46,5 \text{ g L}^{-1}$ in freier Zellsuspension auf $78,2 \text{ g L}^{-1}$ mit immobilisierten Bakterienzellen erhöht werden (Huang *et al.*, 1998).

Acetatproduktion aus gasförmigen Substraten

Einige acetogene Mikroorganismen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, Synthesegas (CO , CO_2 und H_2) über den sogenannten Acetyl-CoA-Weg zu verstoffwechseln. Dieser spezielle Stoffwechselweg ermöglicht es den Bakterien simultan zu wachsen und Energie zu gewinnen. Dabei wird als Hauptprodukt homofermentativ Acetat gebildet nach Gleichung 3.4.



Synthesegas - Herstellung und Verwendung

Als Synthesegase werden per Definition Gasgemische bezeichnet, die überwiegend aus CO und H_2 bestehen und zur Synthese spezieller chemischer Produkte geeignet sind. Synthesegas entsteht sowohl bei der Vergasung von fossilen Rohstoffen wie Kohle und Erdöl, als auch bei der Vergasung von Lignocellulose-haltiger Biomasse und kommunaler Abfälle. Dabei wird dem Einsatz von Biomasse als nachwachsendem Rohstoff für die Herstellung von Synthesegas eine große Bedeutung zugeschrieben, da auf diesem Weg gewonnenes Synthesegas ein kostengünstiges und flexibles Substrat darstellt. Da bei der Vergasung von Biomasse aus Kostengründen Luft als Oxidationsmittel eingesetzt wird im Gegensatz zu Dampf oder reinem Sauerstoff bei der Vergasung von fossilen Rohstoffen, haben die resultierenden Gasgemische einen hohen Stickstoffanteil und damit einen niedrigeren Energiegehalt (Sipma *et al.*, 2006). Die Zusammensetzung der Gasgemische variiert dabei in Abhängigkeit des eingesetzten Rohstoffs, der Reaktionsbedingungen und des Reaktortyps (Tirado-Acevedo *et al.*, 2010). Typische Zusammensetzungen von Gasgemischen aus der Vergasung von nachwachsenden Rohstoffen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Typische Zusammensetzung von Synthesegas aus der Vergasung unterschiedlicher Biomassequellen (Tirado-Acevedo *et al.*, 2010).

Quelle	Zusammensetzung (in Vol.-%)					
	CO	CO ₂	H ₂	N ₂	CH ₄	weitere
Rutenhirse	14,7	16,5	4,4	56,8	4,2	3,4
Pinienhackschnitzel	16,1	13,6	16,6	37,6	2,7	13,4
Weide	9,4	17,1	7,2	60,5	3,3	2,5
Kakaoschalen	8,0	16,0	9,0	61,5	2,3	3,2
Molkereiabfall	8,7	15,7	18,6	56,0	0,6	0,4
"Kentucky-Blaugrasstroh"	12,9	17,4	2,6	64,2	2,1	0,8
Waldrestholz / Papierreste	9,2	9,2	6,1	63,2	2,8	2,6

Synthesegas besteht hauptsächlich aus CO, H₂ und CO₂ und dient neben dem Einsatz als Brennstoff auch als Ausgangsstoff für die Synthese einer Vielzahl an chemischen Verbindungen. Die bedeutendsten Prozesse in diesem Zusammenhang sind die Fischer-Tropsch-Synthese zur Herstellung von flüssigen Kohlenwasserstoffen, das Haber-Bosch-Verfahren zur Herstellung von Ammoniak und die Herstellung von Methanol (Arpe, 2010). Diese Prozesse benötigen im Allgemeinen Temperaturen von 200 - 500 °C und einen Druck von 10 - 300 bar unter Einsatz von teuren Metallkatalysatoren (z.B. Fe, Ru, Ni).

Das eingesetzte Synthesegas ist dabei mit einigen gasförmigen Verbindungen und mit Rückständen aus dem Vergasungsvorgang verunreinigt, die bei der weiteren Verwendung in unterschiedlicher Weise stören. So sind im Synthesegas in geringeren Mengen noch Methan, Acetylen, Ethylen, Ethan, Benzol, Wasserstoffsulfid (H₂S), organische Schwefelverbindungen (COS), Schwefeldioxid, Ammonium, Cyanwasserstoff (HCN), Sauerstoff, Wasser, Stickoxide (NO_x), Teer und Asche enthalten (Xu *et al.*, 2011). Schwefelverbindungen sind für viele Metallkatalysatoren ein Gift, das deren Wirksamkeit teilweise oder völlig herabsetzt. Auch die Anwesenheit geringer Mengen an stickstoffhaltigen Verbindungen und Spuren von Metallen (z.B. Fe, Ni, As) kann sich auf die chemischen Reaktionen auswirken. Des Weiteren kann das im Synthesegas enthaltene CO₂ entweder direkt in die chemische Umsetzung eingreifen oder zur Bildung störender Inertgaspolster führen. Aus diesem Grund muss das eingesetzte Gas aufwändig und kostenintensiv gereinigt werden. Dabei werden auch Rußpartikel und Teerrückstände entfernt und das Gas getrocknet. Des Weiteren benötigen viele chemische Reaktionen ein definiertes Verhältnis an H₂/CO im Eingangsgas. Dies kann entweder während der Vergasung durch Einstellung der Menge an Sauerstoff und Dampf oder nachträglich durch CO-Konvertierung über die Wasser-Gas-Shift erfolgen.

Biologische Synthesegas-Fermentation

Um einige Limitierungen der chemischen Synthesegas-verwertenden Prozessen zu umgehen, wurden in jüngster Zeit Anstrengungen unternommen, biologische Katalysatoren für die Herstellung von Biokraftstoffen und Plattformchemikalien aus Synthesegas einzusetzen. Die oben genannte Gruppe an acetogenen Mikroorganismen besitzt dabei die Fähigkeit, aus den Bestandteilen des Synthesegas die organische Säuren Essigsäure und Buttersäure, sowie die Alkohole Ethanol und Butanol zu bilden. Der Anteil an acetogenen Mikroorganismen, die Alkohole in signifikanten Mengen bilden können, ist jedoch sehr gering im Vergleich zu Acetatbildenden Acetogenen. Über das nicht-acetogene Bakterium *Rhodospirillum rubrum* kann zum Beispiel auf der Basis von CO auch Wasserstoff erzeugt werden. In Abbildung 3.4 sind die Produkte schematische dargestellt, die über Synthese-Fermentation gewonnen werden können.

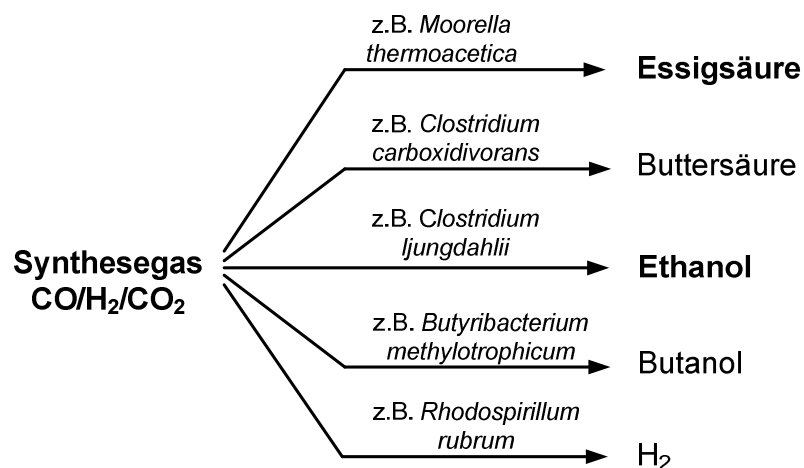


Abbildung 3.4: Produkte aus biologischen Synthesegas-Fermentationen mit repräsentativen, natürlichen Produzenten; das Hauptprodukt Essigsäure aller acetogener Mikroorganismen ist hervorgehoben genauso wie das Produkt Ethanol, das in jüngster Zeit in den Fokus gerückt ist. Die Produktion von H₂ mit dem nicht-acetogenen Mikroorganismus *Rhodospirillum rubrum* ist der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

Biologische Produktionsprozesse weisen gegenüber den chemischen Verfahren einige Vorteile auf. So laufen diese Reaktionen bei "milden" Reaktionsbedingungen von 30 - 60 °C und Atmosphärendruck ohne extensive Wärmeentwicklung ab. Des Weiteren erreichen die biologischen Katalysatoren hohe Selektivitäten verglichen mit chemischen Katalysatoren, da nur etwa 3 - 4 % des Substrates in die Bildung von Biomasse verloren geht. Biologischen Reaktionen sind zudem weniger abhängig von definierten Verhältnissen der Eingangsgase und toleranter gegenüber einigen Verunreinigungen im Gasstrom. Dies vereinfacht die Gasreinigung nach dem Vergasungsprozess (Kundiyana *et al.*, 2010).

Gegenüber Schwefelverbindungen im Gas zeigten sich acetogene Mikroorganismen überaus tolerant. So toleriert beispielsweise *Clostridium ljungdahlii* Konzentrationen von bis zu 2,7 % H₂S oder 5 % Carbonylsulfide (COS) im Eingangsgas (Klasson *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1991). Allerdings wurden bisher nur wenige Studien zum Einfluss von Synthesegas-Verunreinigungen auf Mikroorganismen veröffentlicht, da ein Großteil der Untersuchungen zur autotrophen Produktbildung mit "künstlichem" Synthesegas durchgeführt wurden. Durch den Einsatz von "realem" Synthesegas in autotrophen Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass einige Verunreinigungen Auswirkungen wie Zelltoxizität, Enzyminhibierung und Veränderung des Produktspektrums, des Redoxpotential, der Osmolarität und des pH haben können (Xu *et al.*, 2011). Ahmed *et al.* (2006) konnten zeigen, dass Teer-Rückstände aus der Vergasung zu einem Ruhezustand der Zellen und einem veränderten Produktspektrum von *Clostridium carboxidivorans* führten. Dies konnte durch Installation eines Filters mit einer Porengröße von 0,025 µm im Eingangsgas umgangen werden. Des Weiteren zeigten Ahmed und Lewis (2007), dass Stickoxid NO in Konzentrationen über 40 ppm im Gas zu einer reversiblen Inhibierung des Enzyms Hydrogenase führt und negative Auswirkungen auf das Zellwachstum hat. Da dies ein entscheidendes Enzym für die Verwertung von Wasserstoff darstellt, muss entweder die Vergasung der Biomasse optimiert werden oder NO aus dem Gasstrom entfernt werden. Einen ähnlichen nachteiligen Effekt auf Wachstum und Aktivität der Hydrogenase konnte durch Ammonium im Gas nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2011). Für einen erfolgreichen kommerziellen Einsatz von kombinierten Vergasungs-Fermentations-Verfahren muss das eingesetzte Gas vor dem Einleiten in den Bioreaktor folglich konditioniert werden.

In jüngster Zeit ist die Herstellung von Ethanol aus Synthesegas mit Hilfe von acetogenen Mikroorganismen stark in den Fokus gerückt. So demonstrieren aktuell drei Firmen (INEOS Bio (USA), Coskata Inc. (USA), LanzaTech (Neuseeland)) in Pilotanlagen, dass diese Technik kommerziell einsetzbar ist (Köpke *et al.*, 2011a). Dabei kommt eine Kombination aus Vergasung von Biomasse mit nachgeschalteter Synthesegas-Fermentation zum Einsatz, die in Abbildung 3.5 dargestellt ist. Dabei wird die Biomasse mit Hilfe des Oxidationsmittels Luft oder Sauerstoff ohne Entzündung teilweise verbrannt bei Temperaturen zwischen 900 und 2000 °C und einem Druck zwischen 1 - 80 bar. Dadurch entsteht Synthesegas, das im Wesentlichen CO enthält. Aus Kostengründen wird bei der Vergasung von Biomasse oftmals Luft anstatt reinem Sauerstoff eingesetzt (Sipma *et al.*, 2006). Das entstandene Synthesegas (hier über einen Wirbelschichtreaktor) wird in mehreren Stufen von schädlichen Rückständen wie Asche und Teer befreit, getrocknet und gewaschen. Anschließend wird das gereinigte Gas in Tanks gelagert, bevor es in den Bioreaktor eingeleitet wird, in dem durch Synthesegas-verwertende Mikroorganismen Produkte wie Ethanol oder Acetat gebildet werden.

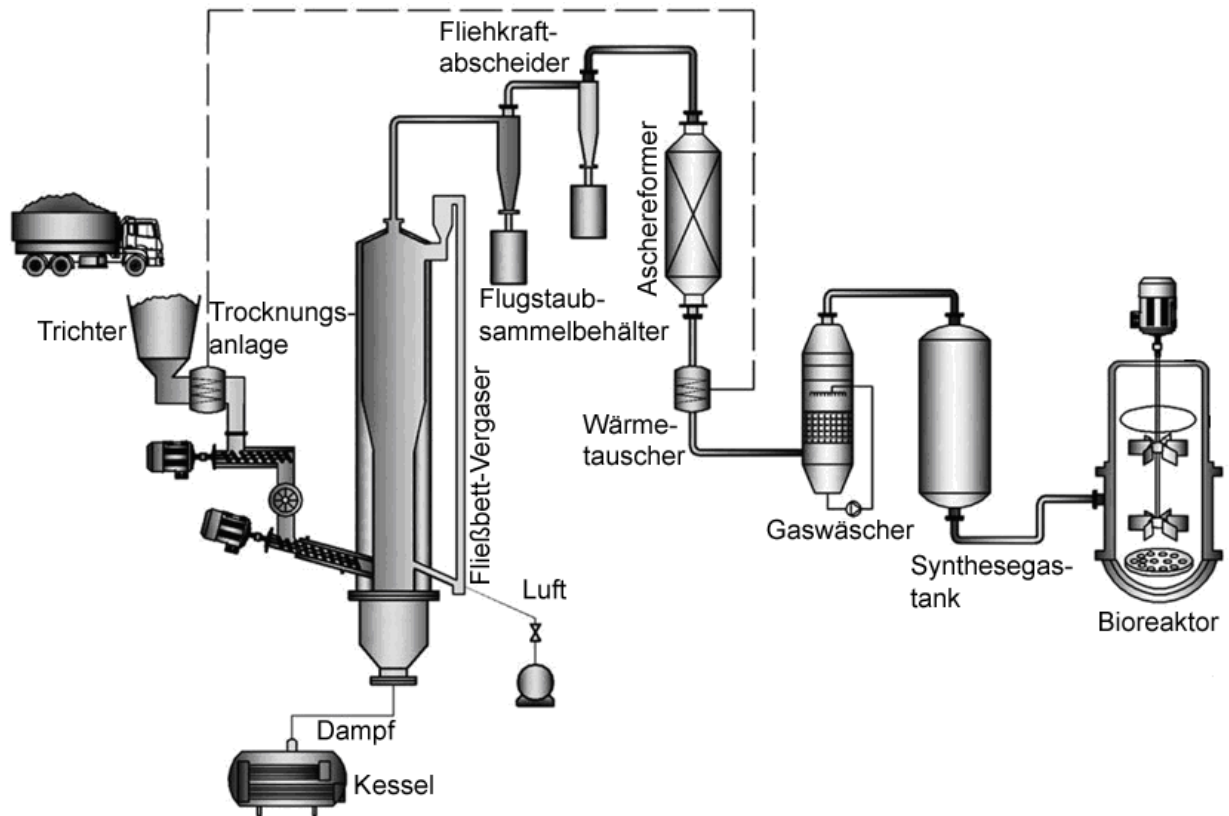


Abbildung 3.5: Integrierte Vergasung von Biomasse mit nachgeschalteter Synthesegas-Fermentation zur Herstellung von Biokraftstoffen und Plattformchemikalien (abgeändert nach Mohammadi *et al.*, 2011).

Autotrophe Acetatbildung

Neben der Fähigkeit von acetogenen Mikroorganismen, Zucker fast stöchiometrisch zu Acetat umzusetzen, können sie auch aus gasförmigen Substraten effektiv Acetat bilden, wobei maximal nur 4 % des verbrauchten CO₂ in Biomasse fixiert werden (Daniel *et al.*, 1990).

Obwohl Acetat als Hauptprodukt des Stoffwechsels acetogener Mikroorganismen gilt, haben sich die Studien zur autotrophen Produktbildung in den vergangenen Jahren auf die Herstellung von Alkoholen wie Ethanol oder Butanol konzentriert. In Tabelle 3.2 zusammengefasst ist die Acetatbildung aus den gasförmigen Substraten H₂ und CO₂ unter definierten Reaktionsbedingungen mit verschiedenen acetogenen Mikroorganismen, die bis jetzt veröffentlicht wurden.

Sakai *et al.* (2005) erreichten mit dem Thermophil *Moorella* sp. HUC22-1 eine Acetatkonzentration von 20,4 g L⁻¹ bei einem pH von 6,2 und einer Biomassekonzentration von 0,9 g L⁻¹. Die Acetatkonzentration konnte durch Erhöhung der Zelldichte im Reaktor auf 22,0 g L⁻¹ erhöht werden, was jedoch zu einer Reduktion der zellspezifischen Produktivität von 14,4 auf 9,6 g g⁻¹ d⁻¹ geführt hat. Schmidt und Cooney (1986) erreichten im Satzverfahren ohne pH-Kontrolle mit einer maximalen volumetrischen Produktbildungsrate von 7,2 g L⁻¹ d⁻¹ eine Acetatkonzentration von 13,2 g L⁻¹. Dies wurde durch Kultivierung in einem Hochdruckreaktor bei einem Druck von 6,9 bar erreicht.

Moringa und Kawada (1990) konnten im Satzverfahren mit *Acetobacterium* sp. BR-446 eine maximale Acetatkonzentration von 51 g L⁻¹ mit einer volumetrischen Produktbildungsrate von 4,1 g L⁻¹ d⁻¹ erreichen. Die volumetrische Produktivität konnte durch Kultivierung in einem Reaktor mit einem Hohlfasermembranmodul zur Zellrückhaltung auf 149 g L⁻¹ d⁻¹ bei einer Biomassekonzentration von 7,2 g L⁻¹ erhöht werden bei einem Druck von 2,7 bar.

Suzuki *et al.* (1993) erreichten durch Kultivierung von flokkulierten *Acetobacterium woodii*-Zellen in Blasensäulen mit einer Biomassekonzentration von 13,6 g L⁻¹ eine Produktbildungsrate von 2,1 g L⁻¹ d⁻¹. Diese Rate konnte durch Kultivierung im wiederholten Satzverfahren auf 2,7 g L⁻¹ d⁻¹ erhöht werden. Balch *et al.* (1977) konnten mit diesem Bakterienstamm durch Kontrolle des pH bei 6,7 eine Acetatkonzentration von 10,8 g L⁻¹ in 5,4 Tagen erreichen.

Somit ist es für einen Prozess zur autotrophen Acetatbildung zum einen wichtig, hohe Zelldichten im Bioreaktor zu erreichen und zum anderen für eine ausreichende Versorgung der Bakterienzellen mit den gasförmigen Substraten zu sorgen.

Tabelle 3.2: Autotrophe Acetatbildung verschiedener Acetogen (abgeändert nach Sakai *et al.*, 2005).

Mikro-organismus	Art der Kultivierung	Gaszusammensetzung, %	Temp., °C	pH	Biomassekonz., g L ⁻¹	Acetatkonz., g L ⁻¹	Acetatbildungsrate		Referenz
							volum., g L ⁻¹ d ⁻¹	spez., g g ⁻¹ d ⁻¹	
<i>Moorella</i> sp. HUC22-1	Satzverfahren	H ₂ :CO ₂ (80:20)	55	6,2	0,9	20,4	13,0*	14,4	Sakai <i>et al.</i> , 2005
	wdh. Satzverfahren mit Zellrecycling	H ₂ :CO ₂ (80:20)	55	6,2	1,5	22,0	6,4*	9,6	Sakai <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium</i> sp. ATCC 29797	Satzverfahren ^(a)	H ₂ :CO ₂ (80:20)	30	6,0 ^(b)	0,5	13,2	7,2	14,4*	Schmidt <i>et al.</i> , 1986
<i>Acetobacterium</i> sp. BR-446	Satzverfahren	H ₂ :CO ₂ (-)	35	7,3 ^(c)		51,0	4,1	-	Morinaga <i>et al.</i> , 1990
	kontinuierlich mit Zellrecycling ^(d)	H ₂ :CO ₂ (-)	35	7,3	7,2	-	149	20,7*	Morinaga <i>et al.</i> , 1990
<i>Acetobacterium woodii</i>	Satzverfahren ^(e)	H ₂ :CO ₂ (55:14)	30	-	13,6	-	2,1	0,2*	Suzuki <i>et al.</i> , 1993
	wiederholtes Satzverfahren ^(e)	H ₂ :CO ₂ (55:14)	30	-	-	-	2,7	-	Suzuki <i>et al.</i> , 1993
	Satzverfahren	H ₂ :CO ₂ (80:20)	30	6,7	-	10,8	-	-	Balch <i>et al.</i> , 1977

- : keine Angabe vorhanden.

* : aus Literaturdaten abgeleiteter Wert.

^(a) Druck im Reaktor erhöht auf 6,9 bar.

^(b) pH am Ende der Kultivierung.

^(c) ohne Kontrolle des pH.

^(d) Druck im Reaktor erhöht auf 2,7 bar.

^(e) Kultivierung von flokkulierten Zellen in Blasensäulen.

Limitierungen für den Einsatz von acetogenen Mikroorganismen in kommerziellen Prozessen zur Herstellung von Essigsäure/Acetat

Obwohl der reduktive Acetyl-CoA-Weg der chemischen Route der Essigsäureherstellung über den Monsanto-Prozess als biologisches Äquivalent am nächsten kommt, wird der Einsatz von acetogenen Mikroorganismen zur kommerziellen Produktion von Essigsäure/Acetat noch auf Grund einiger Limitierungen dieser Mikroorganismen erschwert. Ein großes Problem stellt vor allem die geringe Toleranz gegenüber der gebildeten Essigsäure dar. Eine Inhibierung des Stoffwechsels tritt normalerweise schon bei geringen Produktkonzentrationen auf und die maximale Acetatkonzentration liegt üblicherweise zwischen 30 - 50 g L⁻¹ (Verser und Eggeman, 2011). Um dieses Problem mit Hilfe von gentechnischen Werkzeugen zu umgehen, sind Acetogene noch nicht ausreichend physiologisch und metabolisch untersucht. Derzeit ist kein acetogenes Bakterium in der Lage, Acetat in industriell relevanten Raten bei Produktkonzentrationen von über 50 g L⁻¹ zu bilden, was als unterste Grenze für eine wirtschaftliche Aufarbeitung von Acetat aus Fermentationslösungen gilt (Wiegel, 1994). Außerdem machen die geringen Löslichkeiten der gasförmigen Substrate H₂ und CO Synthesegas-Fermentationen anfällig für Stofftransportlimitierungen (Bredwell *et al.*, 1999).

Des Weiteren bevorzugen acetogene Mikroorganismen neutralen pH, was bedeutet, dass die gebildete Essigsäure überwiegend als Acetatsalz vorliegt und nicht in der undissoziierten Form als Säure, die für die Extraktion des Produkt aus der verdünnten Lösung benötigt wird. Ansätze, diese Mikroorganismen bei niedrigem pH zu kultivieren, um das Produkt in der gewünschten Form der Essigsäure zu erhalten, waren nicht erfolgreich und haben zu einer drastischen Reduktion der maximal erreichbaren Produktkonzentration und der Produktbildungsraten geführt (Wiegel, 1994).

Die Abtrennung des Acetatsalzes aus der Fermentationslösung erfordert aufwändigere Aufarbeitungsverfahren als bei der Abtrennung der Essigsäure. Klassischerweise wird Essigsäure durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender Destillation aus der Reaktionslösung gewonnen. Als Lösungsmittel für die selektive Abtrennung von Essigsäure werden niedermolekulare Ketone, Ether und Acetate (z.B. Methylpropylketon, Methyl-tert-butylether, Ethylacetat) eingesetzt (Partin und Heise, 1992). Die Effizienz der Flüssig-Flüssig-Extraktion hängt dabei unter anderem vom Verhältnis der undissoziierten zur dissoziierten Form der Essigsäure ab und ist am höchsten, wenn die Essigsäure undissoziiert vorliegt, der pH der Reaktionslösung also unterhalb des pK_s der Essigsäure liegt (pK_s = 4,76) (Katakaneni und Cheryan, 2002). Der pH bei der anaeroben Acetatbildung mit acetogenen Bakterien liegt jedoch im neutralen Bereich, bei dem die Essigsäure überwiegend als Acetat vorliegt. Für die Aufarbeitung muss das Acetat daher noch zu Essigsäure umgewandelt werden, was beispielsweise durch Ansäuerung oder durch bipolare Elektrodialyse erfolgen kann (Chukwu und Cheryan, 1999).

3.3 Acetogene Mikroorganismen

Acetogene Mikroorganismen (kurz: Acetogene) sind strikt anaerobe Mikroorganismen, die Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid als Substrate für Wachstum und Acetatbildung verwenden können. Per Definition verfügen diese Mikroorganismen über den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg (Drake, 1994):

- zur Bildung von Acetyl-CoA aus CO₂,
- zur Energiekonservierung und
- zum Aufbau von Zellmasse aus CO₂.

Auf Grund der Tatsache, dass diese Mikroorganismen Acetat als Hauptprodukt ihres Stoffwechsel haben und zur Abgrenzung gegenüber anderen Essigsäure-bildenden Mikroorganismen, werden sie in der Literatur auch als Homoacetogene beschrieben (Drake *et al.*, 2006). Bis jetzt wurden über 100 acetogene Spezies 22 verschiedener Gattungen aus einer Vielzahl an Habitaten isoliert. Dabei stammt der Großteil der Spezies aus den Gattungen *Acetobacterium* und *Clostridium*, die sich dabei sowohl in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften als auch in ihrem Nährstoffbedarf sehr stark voneinander unterscheiden können (Drake *et al.*, 2008). Man unterteilt acetogene Mikroorganismen nach ihrer optimalen Wachstumstemperatur in Mesophile (30 - 40 °C) und Thermophile (55 - 80 °C), sowie nach ihrem GC-Gehalt. In den letzten Jahren wurden die vier ersten Genome dieser Gruppe an Mikroorganismen veröffentlicht: *Moorella thermoacetica* (Pierce *et al.*, 2008), *Clostridium ljungdahlii* (Köpke *et al.*, 2010), *Clostridium carboxidivorans* (Bruant *et al.*, 2010) und *Eubacterium limosum* (Roh *et al.*, 2011).

Es wurde beschrieben, dass Acetogene neben Acetat auch Ethanol, Butyrat und Butanol direkt aus der Zwischenstufe Acetyl-CoA synthetisieren können. Köpke *et al.* (2011b) konnten bei drei Vertretern dieser Gruppe kürzlich geringe Mengen an 2,3-Butandiol unter autotrophen Bedingungen nachweisen, das aus Pyruvat als Zwischenprodukt gebildet wurde. Dies macht Acetogene besonders interessant für die Produktion einer größeren Bandbreite an Grundchemikalien. In Tabelle 3.3 sind einige acetogene Mikroorganismen und ihre natürlichen Stoffwechselprodukte beispielhaft aufgeführt.

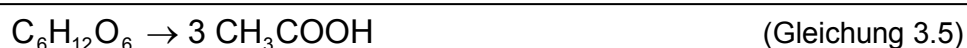
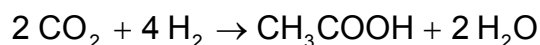
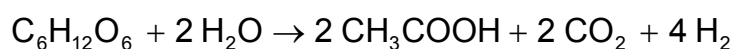
Eine bedeutende Eigenschaft dieser Gruppe an Mikroorganismen ist außerdem ihre Fähigkeit, neben H₂ und CO₂ auch CO über den Acetyl-CoA-Weg zu verwerten. Das macht sie interessant für oben genannte Synthesegas-Fermentationen, bei denen CO-haltige Abfallgase aus der Verbrennung einer Vielzahl an organische Materialien wie Kohle, Biomasse oder kommunalen Abfällen als Substrate zum Einsatz kommt (Slivka *et al.*, 2011). Kürzlich konnte ebenso gezeigt werden, dass einige Acetogene die Reduktion von CO₂ zu Acetat auch mit Hilfe von Elektronen bewerkstelligen können, die von einer Elektrode geliefert werden (Nevin *et al.*, 2011).

Tabelle 3.3: Auflistung einiger repräsentativer acetogener Bakterien, die gasförmige Substrate zu organischen Säuren und Alkoholen umwandeln können (abgeändert nach Köpke *et al.*, 2011a, Mohammadi *et al.*, 2011).

Organismus	Wachstums- bedingung	Produktspektrum	Referenz
<i>Acetobacterium woodii</i>	mesophil	Acetat	Balch <i>et al.</i> , 1977
<i>Clostridium aceticum</i>	mesophil	Acetat	Braun <i>et al.</i> , 1981
<i>Eubacterium limosum</i>	mesophil	Acetat	Genthner <i>et al.</i> , 1981
<i>Moorella thermoacetica</i>	thermophil	Acetat	Fontaine <i>et al.</i> , 1942
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	thermophil	Acetat	Wiegel <i>et al.</i> , 1981
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	thermophil	Acetat, Ethanol	Leigh <i>et al.</i> , 1981
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	mesophil	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	Tanner <i>et al.</i> , 1993
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	mesophil	Acetat, Ethanol 2,3-Butandiol	Abrini <i>et al.</i> , 1994
<i>Clostridium ragsdalei</i>	mesophil	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	Huhnke <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	mesophil	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol	Liou <i>et al.</i> , 2005
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	mesophil	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol	Zeikus <i>et al.</i> , 1980

3.3.1 Heterotropher Stoffwechsel

Acetogene Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, organische Kohlenstoffquellen wie beispielsweise Glucose anaerob zu Acetat als einzigem Endprodukt umzusetzen. Diesen Prozess kann man beschreiben als Kombination einer H₂/CO₂-entwickelnden Gärung mit einer sofortiger Wiederverwertung der gasförmigen Reaktionsprodukte zu einem weiteren Molekül Acetat nach folgenden Reaktionsgleichungen:



Nach Gleichung 3.5 werden somit aus einem Molekül Glucose drei Moleküle Acetat gebildet, was auch als Homoacetatgärung bezeichnet wird (Fuchs und Schlegel, 2007). In Abbildung 3.6 ist die homoacetogene Umsetzung von Glucose zu Acetat veranschaulicht dargestellt.

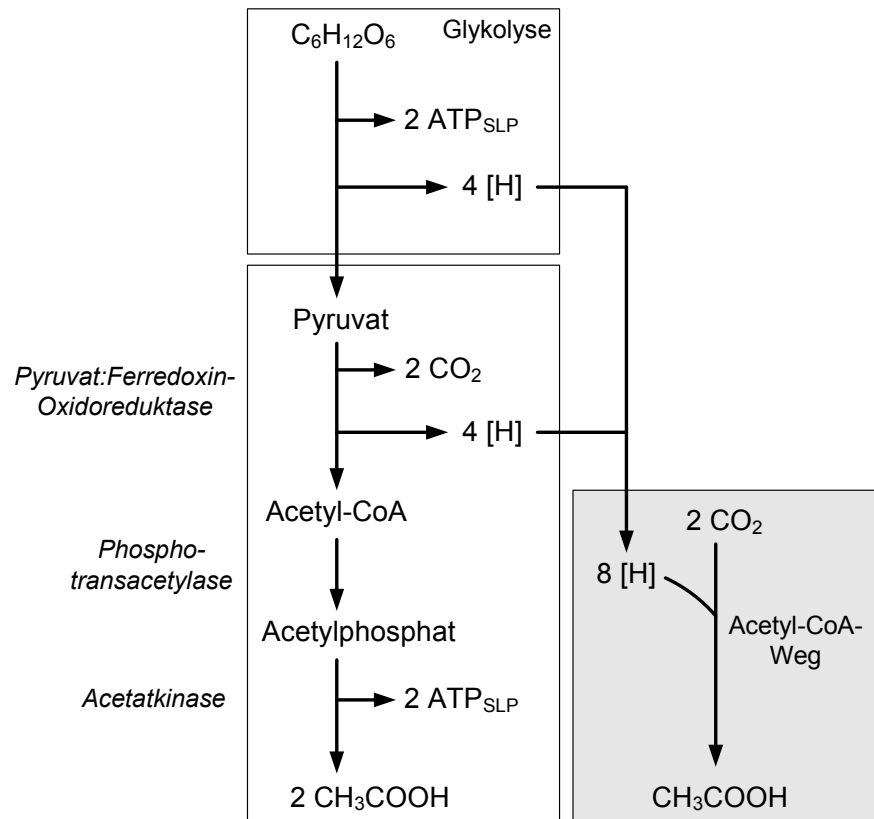


Abbildung 3.6: Homoacetogene Umsetzung von Hexosen zu Acetat.

Abkürzungen: ATP_{SLP} = ATP entstanden durch Substratkettenphosphorylierung;
CoA = Coenzym A; [H] = Reduktionsäquivalent (abgeändert nach Müller *et al.*, 2004).

Dabei wird das Substrat Glucose über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) unter Freisetzung von vier Reduktionsäquivalenten [H] in zwei Moleküle Pyruvat gespalten, wobei zwei Moleküle ATP über Substratkettenphosphorylierung entstehen. Pyruvat wird anschließend über das Enzym Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA decarboxyliert, wobei zwei Moleküle CO₂ und vier weitere Reduktionsäquivalente freigesetzt werden. Acetyl-CoA wird dann über das Enzym Phosphotransacetylase zu Acetylphosphat und anschließend über das Enzym Acetatkinase zu Acetat umgewandelt, wobei nochmals zwei Moleküle ATP über Substratkettenphosphorylierung entstehen. Somit wird die Hexose auf konventionellem Weg formal zu zwei Molekülen Acetat und zwei Molekülen CO₂ abgebaut. Das CO₂ und die angefallenen Reduktionsäquivalente werden anschließend über den Acetyl-CoA-Weg zu einem dritten Molekül Acetat umgewandelt (Imkamp und Müller, 2007). Der Acetyl-CoA-Weg, über den das dritte Molekül Acetat synthetisiert wird, soll im Folgenden genauer beschrieben werden.

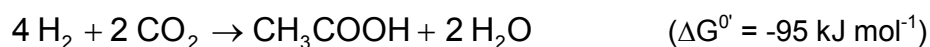
3.3.2 Acetyl-CoA-Weg

Chemolithoautotrophe Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, organisches Zellmaterial ausschließlich aus anorganischem Kohlenstoff aufzubauen. Zur Zeit sind folgende sechs Stoffwechselwege bekannt, über die Mikroorganismen CO₂ fixieren können, wobei die letzten beiden erst kürzlich beschrieben wurden (Hügler und Sievert, 2010):

- Calvin-Zyklus
- reduktiver Citratzyklus
- reduktiver Acetyl-CoA-Stoffwechselweg
- 3-Hydroxypropionatzyklus
- 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyratzyklus
- Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratzyklus

Der Acetyl-CoA-Weg ist dabei im Gegensatz zu den anderen fünf Wegen als einziger nicht zyklisch aufgebaut, sondern besteht aus zwei linearen Reaktionsketten, die durch das bifunktionelle Schlüsselenzym CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (CODH/ACS) zusammengeführt werden. Die Tatsache, dass dieser Stoffwechselweg neben acetogenen Bakterien auch von sulfatreduzierenden und methanogenen Mikroorganismen zur CO₂-Fixierung verwendet wird, legt die Vermutung nahe, dass dies der älteste Weg der CO₂-Fixierung ist (Berg *et al.*, 2010). Der Acetyl-CoA-Weg ist das Erkennungsmerkmal von acetogenen Mikroorganismen und wird ausschließlich von strikt anaeroben Mikroorganismen verwendet (Henstra *et al.*, 2007). Dabei fungiert das CO₂-Molekül als terminaler Elektronenakzeptor, die klassischerweise von Wasserstoff geliefert werden.

Benannt wurde der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg nach seinen Entdeckern Harland G. Wood und Lars G. Ljungdahl als Wood/Ljungdahl-Weg. Die Stöchiometrie für die Acetatbildung über diesen Weg wurde dabei ermittelt als (Ragsdale und Pierce, 2008):



Der Acetyl-CoA-Weg stellt einen relativ simplen Weg dar, über den zwei Moleküle CO₂ direkt zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Das Schlüsselenzym des Acetyl-CoA-Wegs ist das bifunktionelle Enzym CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (CO-Dehydrogenase/ACS), das Acetogene dazu befähigt, neben CO₂ auch CO als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Der Stoffwechselweg besteht dabei aus zwölf Einzelreaktionen, die in den Methyl- und den Carbonyl-Zweig unterteilt sind (siehe Abbildung 3.7).

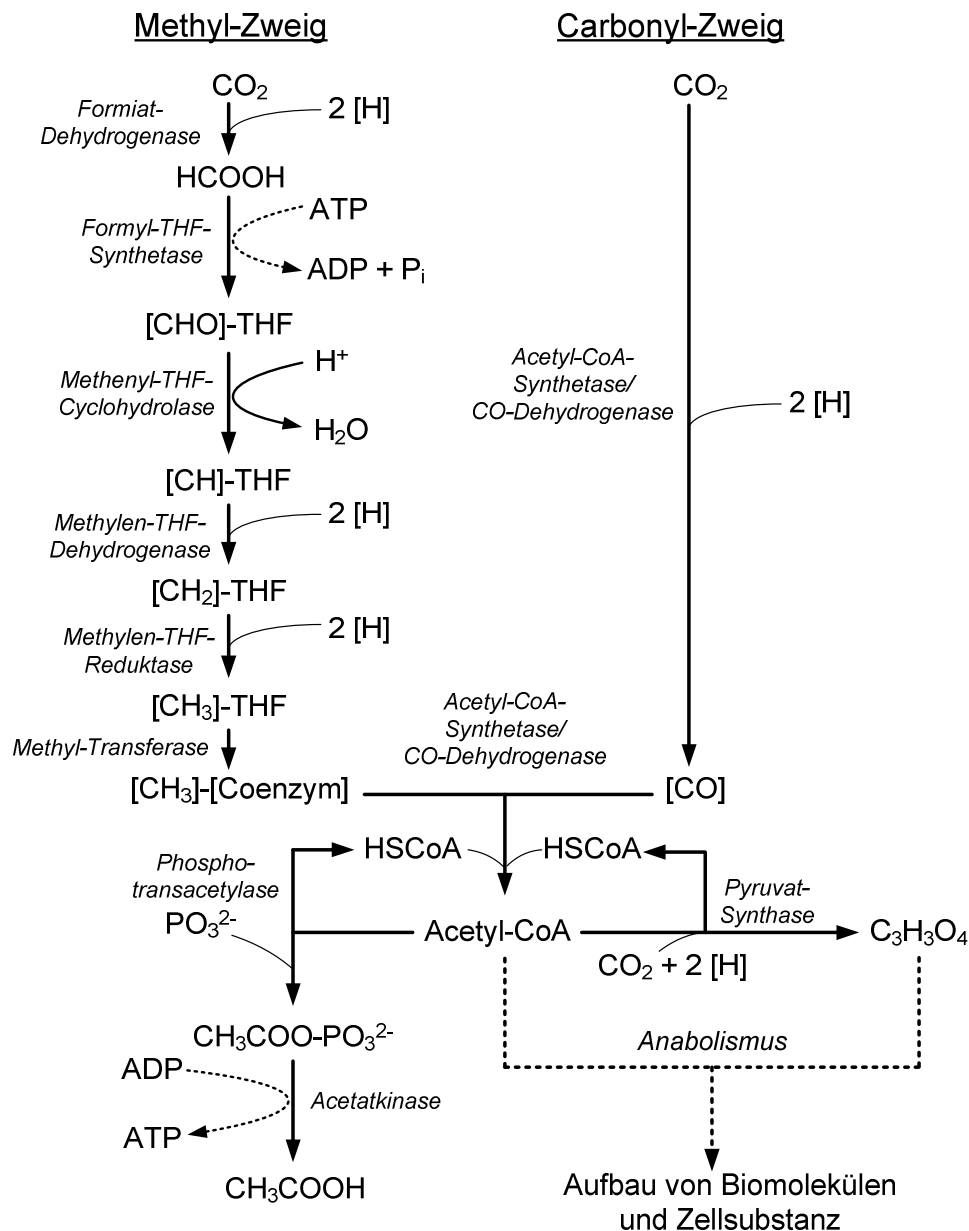


Abbildung 3.7: Acetyl-CoA/Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg.

Abkürzungen: THF = Tetrahydrofolat; HSCoA = Coenzym A; P_i = organisches Phosphat; $[\text{H}]$ = Reduktionsäquivalent; Co-Protein = Corrinoid-Enzym; ATP = Adenosintriphosphat; eckige Klammern deuten an, dass eine bestimmte C_1 -Einheit an einen Co-Faktor oder strukturell mit einem Enzym verbunden ist (abgeändert nach Drake *et al.*, 2008). Anabole Reaktionen zum Aufbau von Biomolekülen und Zellsubstanz sind in acetogenen Mikroorganismen nur unzureichend untersucht und sind daher durch gestrichelte Linien nur angedeutet.

Über den Methyl-Zweig wird unter Verbrauch von zwei Reduktionsäquivalenten zunächst ein CO_2 -Molekül durch das Enzym Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert. Formiat wird in einem weiteren Schritt unter Verbrauch eines Moleküls ATP an Tetrahydrofolsäure (THF) gebunden. Anschließend wird Formyl-Tetrahydrofolat über die THF-gebundenen Zwischenstufen Methenyl- und Methylen-THF mit vier weiteren Reduktionsäquivalenten

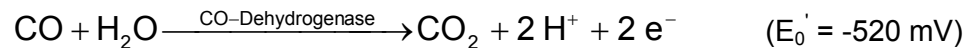
schrittweise zu Methyl-THF reduziert. Tetrahydrofolsäure fungiert dabei als Träger der Methylgruppe. Anschließend wird die Methylgruppe des Methyl-THF mit Hilfe einer Methyltransferase auf das Cobaltatom eines Cofaktor-Vitamin-B₁₂-enthaltenden Corrinoid-Eisen-Schwefel-Proteins (Co-FeS-P) übertragen.

Über den Carbonyl-Zweig wird das zweite Molekül CO₂ über die CO-Dehydrogenase mit Hilfe von reduziertem Ferredoxin zu einer metallgebundenen Carbonylgruppe reduziert.

Bei der anschließenden Synthese des Acetyl-CoA-Moleküls wird die Methylgruppe und die Carbonylgruppe über das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase zusammengefügt und mit Coenzym A kondensiert. Das entstandene Acetyl-CoA stellt beim Wachstum auf gasförmigen Substraten den zentralen Vorläufer für alle katabolen und anabolen Stoffwechselprozesse dar. Ausgehend von Acetyl-CoA wird zum einen über die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase Acetat synthetisiert unter Rückgewinnung eines Moleküls ATP zum anderen Pyruvat gebildet über das Enzym Pyruvat-Synthase.

Das Enzym Pyruvat-Synthase ist identisch mit dem aus dem heterotrophen Stoffwechsel bekannten Enzym Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR), das die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ katalysiert. Da es auch die Rückreaktion zum Pyruvat katalysiert, wird es auch Pyruvat-Synthase genannt (Ragsdale, 2003). Dieses Enzym ist weit verbreitet unter Bakterien und ist sowohl in anabole als auch in katabole Stoffwechselprozesse involviert. In acetogenen Bakterien verbindet das Enzym PFOR zum einen die Glykolyse mit dem Acetyl-CoA-Weg (Menon und Ragsdale, 1996) und den Acetyl-CoA-Weg mit dem unvollständigen Citratzyklus, der Vorläufermoleküle für den Anabolismus bereitstellt (Furdui und Ragsdale, 2000). Viele autotrophe Mikroorganismen verwenden den reduktiven Citratzyklus zum Aufbau von Zellsubstanz und zur Synthese von Stoffwechselintermediaten. In einigen anaeroben Mikroorganismen wie beispielsweise den Acetogenen ist dieser Stoffwechselweg unvollständig (Fuchs und Stupperich, 1978; Eden und Fuchs, 1983). Der unvollständige Citratzyklus wird von Acetogenen in beide Richtungen, oxidativ und reduktiv verwendet, um die Vorläufermoleküle α -Ketoglutarat und Oxalacetat für die Synthese von Aminosäuren bereitzustellen. Die Einlagerung von Acetyl-CoA aus der autotrophen CO₂-Fixierung in Lipide, Aminosäuren, Nukleotide und Zucker konnte für *A. woodii* gezeigt werden (Eden und Fuchs, 1982). Da die anabolen Reaktionen zum Aufbau von Biomolekülen und Zellsubstanz ausgehend von Acetyl-CoA und Pyruvat in acetogenen Mikroorganismen jedoch nicht besonders gut untersucht sind (Furdui und Ragsdale, 2000), sind diese Reaktionen in Abbildung 3.7 durch gestrichelte Linien nur angedeutet.

Die Reduktionsäquivalente werden dabei entweder aus elementarem Wasserstoff über das Enzym Hydrogenase oder aus CO über das Enzyme CO-Dehydrogenase nach folgenden Gleichungen bereitgestellt (Köpke *et al.*, 2011b; Thauer *et al.*, 1977):



Die Verwendung von CO und H₂ als Quelle für Reduktionsäquivalente erlaubt auf Grunde der signifikanten Unterschiede der Redoxpotentiale ein breites Spektrum an Ressourcen für die Produktion von Chemikalien (Sipma *et al.*, 2006). Außerdem besitzen einige Acetogene die Fähigkeit, die Reduktion von CO₂ zu Acetat in Gegenwart von Elektronen durchzuführen, die von einer Elektrode bereitgestellt werden. Der Mechanismus des Elektronentransfers von der Elektrodenoberfläche zum Mikroorganismus ist dabei noch unklar (Nevin *et al.*, 2011).

Unter autotrophen Bedingungen muss über den Acetyl-CoA-Weg nicht nur CO₂ fixiert, sondern davon ausgehend auch Energie konserviert werden. Über die Umsetzung von Acetylphosphat zu Acetat wird im letzten Schritt des Stoffwechselwegs ein Molekül ATP gewonnen, das für die Synthese von Formyl-THF im Methylzweig gebraucht wird. Die Tatsache, dass über den Acetyl-CoA-Weg folglich kein Nettogewinn an ATP durch Substratkettenphosphorylierung möglich ist, zeigt, dass die Energiekonservierung unter autotrophen Bedingungen streng abhängig ist von chemiosmotischen Mechanismen, die in Kapitel 3.3.4 genauer beschrieben werden.

3.3.3 Enzymologie von acetogenen Bakterien

In diesem Kapitel soll noch etwas detaillierter auf einige Enzyme eingegangen werden, die entweder direkt oder indirekt am Acetyl-CoA-Weg beteiligt sind oder diesen mit anderen Stoffwechselwegen unter autotrophen Bedingungen verknüpfen.

Hydrogenasen

Hydrogenasen sind Enzyme, die gasförmigen Wasserstoff umsetzen und die Zelle mit verwertbarer Energie in Form von Elektronen und Reduktionsäquivalenten versorgen (Daniel *et al.*, 1990). Hydrogenasen sind somit direkt verbunden mit dem Redoxgleichgewicht in der Zelle, da sie überflüssige Reduktionsäquivalente in Form von H₂ auch wieder abgeben können (Adams *et al.*, 1981). In vielen Acetogenen liegt das Hydrogenaselevel unter autotrophen Bedingungen deutlich höher als beim Wachstum auf organischen Substraten und wird durch die Anwesenheit von Wasserstoff erhöht (Daniel *et al.*, 1990). Für *A. woodii* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität der Hydrogenasen auch beim Wachstum auf organischen Substraten maximal ist, was diesen Organismus befähigt, organische und gasförmige Substrate simultan zu verstoffwechseln (Braun und Gottschalk, 1981). Die höchste Hydrogenaseaktivität unter acetogenen Bakterien konnte für *Thermoanaerobacter kivui* bestimmt werden, das gleichzeitig das schnellste Wachstum auf gasförmigen Substraten zeigte (Leigh *et al.*, 1981). Ein bekannter Inhibitor von Hydrogenasen ist der Bestandteil CO im Synthesegas (Kim *et al.*, 1984). Studien

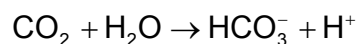
mit CO- und H₂-haltigem Synthesegas haben gezeigt, dass Wasserstoff im Substratgas erst verwertet wird, wenn CO verbraucht ist, was auf die Inhibierung der Hydrogenaseaktivität durch CO zurückgeführt wurde (Heiskanen *et al.*, 2007).

Ferredoxin

Der physiologische Elektronenakzeptor für Hydrogenasen in Acetogenen ist Ferredoxin (Adams *et al.*, 1981). Ferredoxine sind niedermolekulare Eisen-Schwefel-Proteine, die eine wichtige Rolle im Elektronentransport in einer Vielzahl an Reaktionen des anaeroben Stoffwechsels einnehmen. Neben der Hydrogenase fungieren sie in Acetogenen ebenso als Elektronenakzeptor der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Formiat-Dehydrogenase, CO-Dehydrogenase und der Methylen-THF-Reduktase (Biegel *et al.*, 2010). Auf Grund dieser zentralen Rolle im Energiestoffwechsel ist es für die Zelle von entscheidender Wichtigkeit, Ferredoxin in reduziertem Zustand zu halten (Fuchs, 2011).

Carboanhydrase/Acetattransport

Das Enzym Carboanhydrase ist ein Zink-haltiges Enzym, das die folgende reversible Reaktion katalysiert:



Carboanhydrasen sind extrem effiziente Katalysatoren für die reversible Hydrierung von Kohlenstoffdioxid und nehmen immer dann eine wichtige physiologische Rolle ein, wenn die gegenseitige Umwandlung von CO₂ und HCO₃⁻ essentiell ist für den Organismus (Lindskog *et al.*, 1971). Zu den physiologischen Funktionen gehören außerdem die pH-Homöostase, erleichterte Diffusion von CO₂ und der Transport von Ionen.

Dieses Enzym konnte in zahlreichen Acetogenen nachgewiesen werden, wobei die Carboanhydrase aus *A. woodii* die höchste Aktivität aufwies (Braus-Stromeier *et al.*, 1997). Acetogene haben unter autotrophen Bedingungen einen hohen Bedarf an CO₂ sowohl für energiekonservierende Mechanismen als auch zur CO₂-Fixierung. Daher könnte eine physiologische Funktion der Carboanhydrase in Acetogenen die Erhöhung des intrazellulären CO₂-Spiegels sein, ähnlich dem Mechanismus der CO₂-Aufkonzentrierung in Cyanobakterien (Aizawa und Miyachi, 1986). Die Tatsache, dass bei Inhibierung des Enzyms in *A. woodii* durch die Zugabe des Carboanhydrase-Inhibitors Acetazolamid das Wachstum unter autotrophen Bedingungen vollständig gehemmt wurde, zeigt deutlich, dass dieses Enzym eine entscheidende Rolle einnimmt für das autotrophe Wachstum von Acetogenen (Braus-Stromeier *et al.*, 1997).

Weitere mögliche physiologische Funktionen der Carboanhydrase in Acetogenen sind die Regulierung des intrazellulären pH auf Grund der Bildung großer Mengen an Acetat und die

Kopplung an einen Acetat/HCO₃⁻-Antiporter (Braus-Stromeyer *et al.*, 1997). Aktiver Transport von Acetat aus der Zelle konnte für *A. woodii* nachgewiesen werden, obwohl die Art des Transportproteins bis heute ungeklärt ist (Boenigk *et al.*, 1989).

3.3.4 Energiekonservierung acetogener Mikroorganismen

Strikt anaerobe Mikroorganismen können Energie nur durch Vergärung organischer Substrate, durch Ionengradienten-getriebene Phosphorylierung und durch Ausschleusung von Endprodukten gewinnen. Im Allgemeinen ist die Energieausbeute von anaeroben Stoffwechselwegen jedoch nur ein Bruchteil der Energie verglichen mit aerober Zellatmung (Müller, 2003). Mikroorganismen, die ihren Stoffwechsel rein durch Vergärung von organischen Substraten betreiben, können Energie über Substratkettenphosphorylierung gewinnen. Mikroorganismen, die den Acetyl-CoA-Weg zur autotrophen Fixierung von CO₂ verwenden, sind hingegen auf chemiosmotische Energiekonservierung angewiesen. Der Acetyl-CoA-Weg ist dabei der einzige zentrale Weg zur CO₂-Fixierung, der zusätzlich zur Konservierung von Energie dient (Martin, 2011).

Substratkettenphosphorylierung

Obligat fermentative Mikroorganismen sind auf Energiegewinn über Substratkettenphosphorylierung angewiesen, wobei zwischen 1 und maximal 4 Moleküle ATP pro Hexosemolekül gewonnen werden können. Acetogene Mikroorganismen hingegen können durch Kopplung mit zusätzlichen energiekonservierenden Mechanismen bei der Verwertung von Hexosen die ATP-Ausbeute auf 4 - 6 Moleküle ATP erhöhen. Die genaue Anzahl der ATP-Moleküle, die dabei über chemiosmotische Prozesse gewonnen werden kann, ist abhängig vom Bakterienstamm und der Zellumgebung (Verser und Eggeman, 2011).

Chemiosmotische Kopplung

Unter autotrophen Bedingungen wird zusätzliches ATP über Mechanismen gewonnen, die man als chemiosmotische Kopplung bezeichnet. Man versteht darunter die Energiekonservierung durch Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten durch Kopplung von ATP-Synthese mit membranständigen Ionengradienten. Voraussetzung hierfür sind ein geschlossenes Membransystem und Transportproteine für Ionen über die Membran (Cyprionka, 2010). Über den Acetyl-CoA-Weg werden dabei Reduktionsäquivalente geliefert, die als Elektronendonatoren für die membranständigen Elektronentransportkette dienen.

Alle Acetogene verwenden den Acetyl-CoA-Weg zur autotrophen Fixierung von CO₂. Im Hinblick auf Energiekonservierung unterteilt man sie jedoch in H⁺- und Na⁺-abhängige

Mikroorganismen. Zu den H^+ -abhängigen Mikroorganismen gehört *Moorella thermoacetica*, wohingegen der Stoffwechsel von beispielsweise *A. woodii* von Natriumionen abhängig ist (Heise *et al.*, 1992).

Der Mechanismus der Energiekonservierung unterscheidet sich dabei nicht nur in der Art des Ionengradienten (H^+ oder Na^+) über die Zellmembran, sondern auch durch die Beschaffenheit der membranständigen Elektronentransportkette. Aktuell sind zwei Arten der Energiekonservierung bei Acetogenen bekannt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

H^+ -abhängige Energiekonservierung

Die Fähigkeit, Energie über chemiosmotische Mechanismen zu konservieren, setzt membranständige Elektronentransportproteine voraus. In *Moorella thermoacetica* wurden zwei b-Cytochrome (b_{560} , b_{554}), das Menachinon MK-7 und ein Flavoprotein in der Cytoplasmamembran identifiziert, die aller Wahrscheinlichkeit nach an Protonen-abhängigen Elektronentransportprozessen zur Energiekonservierung beteiligt sind. Die Art der Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexes ist gegenwärtig allerdings noch nicht bekannt. Einige der Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs sind zumindest lose mit der Cytoplasmamembran verbunden, wie beispielsweise CO-Dehydrogenase, NADH-Hydrogenase und Hydrogenasen genauso wie mögliche Elektronenakzeptoren wie das Enzym Methylen-THF-Reduktase (Imkamp und Müller, 2007). Die Tatsache, dass membranständige CO-Dehydrogenase Cytochrome und Menachinone reduzieren kann, legt die Vermutung nahe, dass der Acetyl-CoA-Weg über dieses Enzym mit der Elektronentransportkette verbunden sein könnte (Ragsdale und Kumar, 1996). In Abbildung 3.8a dargestellt ist ein Modell der H^+ -abhängigen Energiekonservierung über Cytochrome und Chinone mit möglichen Elektronendonatoren. Das Modell nimmt an, dass die Reduktion von Methylen-THF den letzten Schritt in der Elektronentransportkette darstellt (Müller, 2003). Experimentell konnte dieses Modell jedoch noch nicht bestätigt werden. Der elektrochemische Protonengradient ermöglicht die Synthese von ATP über eine H^+ -abhängige F_1F_0 -ATPase. Anaerobe Bakterien benötigen etwa -60 bis -80 kJ freier Energie, um ein Molekül ATP zu synthetisieren (Thauer *et al.*, 1977). Verglichen mit dem freien Reaktionsenthalpie von etwa -95 kJ/mol bei der autotrophen Acetatbildung kann maximal ein Molekül ATP pro gebildetes Molekül Acetat über chemiosmotische Energiekonservierung gewonnen werden (Diekert und Wohlfarth, 1994).

Na⁺-abhängige Energiekonservierung

Den Na⁺-abhängigen Acetogenen wie beispielweise *A. woodii* fehlen Cytochrome und Chinone in der Zellmembran. Es konnte dafür membrangebundenes Corrinoid nachgewiesen werden (Dangel *et al.*, 1987). Corrinoid sind in der Zellmembran von methanogenen Bakterien an der Na⁺-abhängigen Energiekonservierung durch die Reaktion der Methyltransferase beteiligt (Gottschalk und Thauer, 2001). Die Tatsache, dass *A. woodii* ebenso membrangebundenes Corrinoid enthält, lässt vermuten, dass die chemiosmotische Energiekonservierung hier möglicherweise ähnlich durch Kopplung an das Enzym Methyltransferase abläuft (Schmidt *et al.*, 2009).

Außerdem ist nicht nur der Stoffwechsel von *A. woodii* streng Na⁺-abhängig, es wird auch ein Natriumionengradient über die Cytoplasmamembran aufgebaut (Heise *et al.*, 1989). Experimente mit ruhenden Zellen von *A. woodii* haben gezeigt, dass diese Zellen einen starken Na⁺-Gradienten von -90 mV aufbauen können, was einer 40-fach niedrigeren Konzentration an Natriumionen im Inneren der Zellen entspricht. Es konnte zwar gezeigt werden, dass der Acetyl-CoA-Weg an einen primären Natriumionen-Gradienten gekoppelt ist, jedoch nicht, welches Enzym des zentralen Stoffwechselwegs daran beteiligt ist (Müller, 2003). Auf der Suche nach einem Na⁺-translozierenden Enzym konnte weder die Methyltransferase noch ein anderes Enzym des Acetyl-CoA-Wegs in der Cytoplasmamembran von *A. woodii* lokalisiert werden. Allerdings wurde eine membranständige Ferredoxin:NAD⁺-Oxidoreduktase als primäres Na⁺-Transportprotein identifiziert. Dieses Enzym ist Teil eines membranständigen Elektronentransfer-Komplexes (Rnf) in *A. woodii* und katalysiert die exergone Reduktion von NAD⁺ durch Ferredoxin, wobei die freiwerdende Energie in Form eines Na⁺-Gradienten konserviert wird (Biegel und Müller, 2011a). Die reduzierten NAD⁺-Moleküle können Reduktionsäquivalente für den Methylzweig des Acetyl-CoA-Wegs bereitstellen. Der daraus resultierende Na⁺-Gradient dient im Folgenden dazu, ATP über eine Na⁺-abhängige F₁F₀-ATPase zu synthetisieren. Ein hypothetischer Mechanismus der Na⁺-abhängigen Energiekonservierung durch einen Rnf-Komplex nach Biegel *et al.* (2011b) ist in Abbildung 3.8b dargestellt. Dabei ist experimentell noch ungeklärt, wie genau die Energiekonservierung an den Acetyl-CoA-Weg gekoppelt ist.

Hypothetische Energiekonservierung in Clostridium ljungdahlii

Ein dritter Mechanismus der Energiekonservierung in Acetogenen wurde für *C. ljungdahlii* vermutet (Köpke *et al.*, 2010). *C. ljungdahlii* gehört zu den H⁺-abhängigen Acetogenen und verfügt auch über eine H⁺-abhängige F₁F₀-ATPase. Allerdings fehlen diesem Organismus Cytochrome und Chinone in der Zellmembran, um darüber einen Protonengradienten aufzubauen wie bei *M. thermoacetica* vorher beschrieben. Da jedoch Gene für einen Rnf-Komplex identifiziert werden konnten, wurde vermutet, dass *C. ljungdahlii* über diesen membranständigen Enzymkomplex einen Protonengradienten aufbaut, der wiederum als Triebkraft für die ATP-Synthese dient.

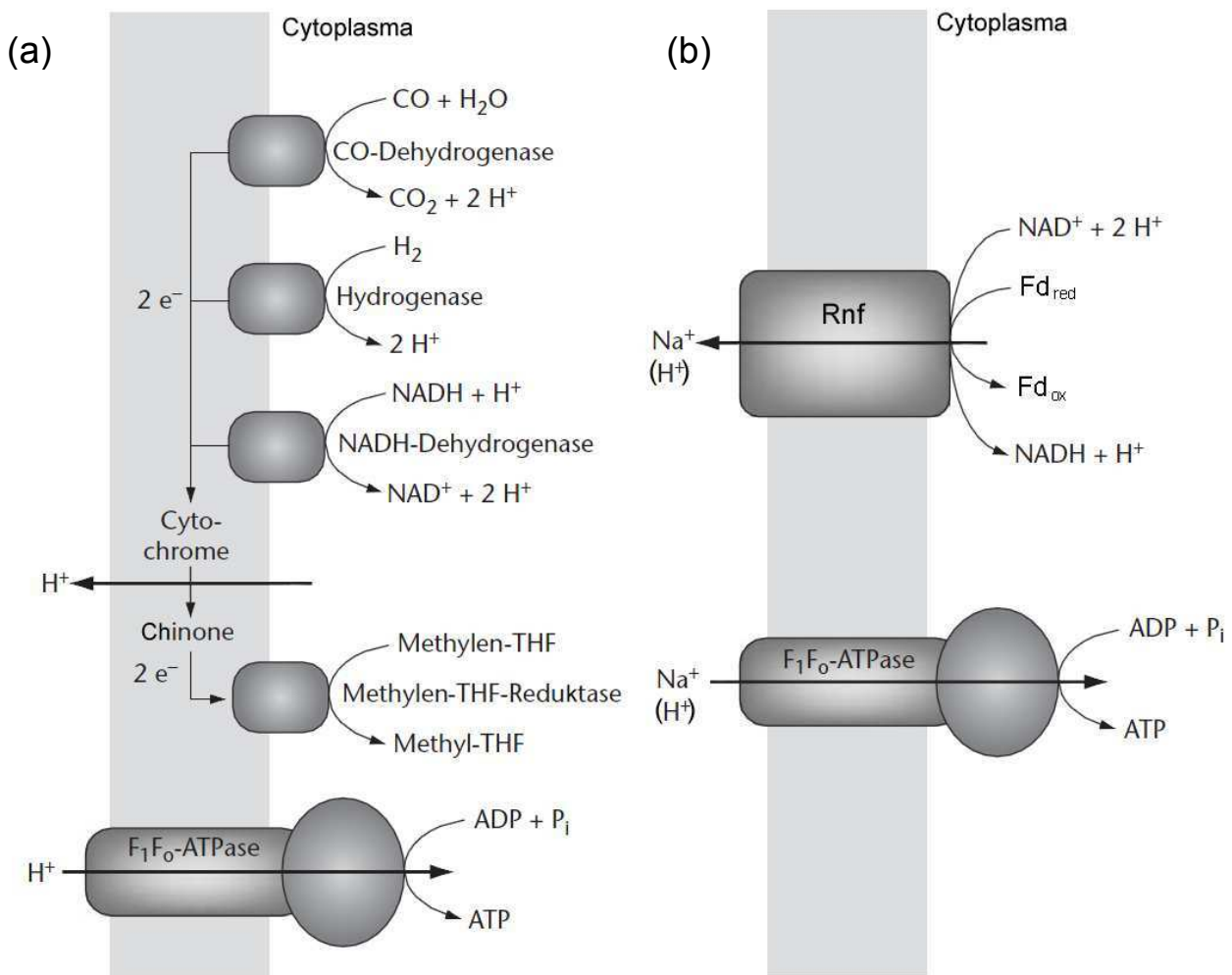


Abbildung 3.8: Hypothetische Mechanismen der Energiekonservierung in acetogenen Mikroorganismen; (a) H^+ -abhängige Energiekonservierung mit der hypothetischen Einbindung verschiedener Oxidoreduktasen, die Reduktionsäquivalente für den Elektronentransport freisetzen; (b) Na^+ -abhängige Energiekonservierung; NAD^+ wird durch Ferredoxin reduziert und stellt somit Reduktionsäquivalente für den Stoffwechsel bereit unter Ausbildung eines Na^+ -Gradienten durch einen membranständigen Elektronentransfer-Komplex (Rnf); die Erzeugung eines H^+ -Gradienten durch den Rnf-Komplex in *C. ljungdahlii*, wie es von Köpke *et al.* (2010) postuliert wird, ist angedeutet (abgeändert aus Imkamp und Müller, 2007; Biegel *et al.*, 2010); Abkürzungen:

THF = Tetrahydrofolat, Fd = Ferredoxin.

Energiekonservierung durch Endproduktausschleusung

Eine weitere Art der Energiekonservierung neben der Substratkettenphosphorylierung und der Chemiosmose wurde in Milchsäurebakterien nachgewiesen. Die gleichzeitige Ausschleusung von Milchsäure mit Protonen-Symport hat die Ausbildung einer protonenmotorischen Kraft zur Folge, die zur Konservierung von Energie verwendet werden kann (Michels *et al.*, 1979). Emde und Schink (1987) konnten jedoch zeigen, dass die Ausschleusung von Acetat über die Cytoplasmamembran nicht zur Energiekonservierung von acetogenen Bakterien beiträgt.

3.3.5 Inhibierung durch Acetat/Essigsäure

Bei einer Vielzahl an Produktionsprozessen zur Herstellung von Stoffwechselprodukten akkumuliert das Produkt im Medium und hat ab einer bestimmten Konzentration einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung. Das Endprodukt Acetat der autotrophen CO₂-Fixierung hat dabei nicht nur einen inhibierenden Einfluss auf einige Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs, sondern bewirkt auch eine Abnahme des pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran (Baronofsky *et al.*, 1984). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die für den Stoffwechsel unter autotrophen Bedingungen wichtigen Enzyme Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und Acetatkinase aus *Thermoanaerobacter kivui* durch zellinterne Acetatkonzentration von mehr als 48 g L⁻¹ gehemmt werden (Klemps *et al.*, 1987). Außerdem wird die Aktivität des Enzyms Carboanhydrase aus *A. woodii* bei einer zellinternen Konzentration von 6,6 g L⁻¹ zu 50 % gehemmt (Braus-Stromeyer *et al.*, 1997). Eine Reduktion der Aktivität einzelner Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs könnte zu einem verminderten Kohlenstofffluss durch diesen zentralen Weg und somit zu einer verminderten Acetatbildung und Energiekonservierung führen. Ebenso denkbar wäre eine Erschöpfung des Coenzym A durch Rückkopplungs-Inhibierung durch das Produkt. Die ansteigende Essigsäurekonzentration im Medium könnte zudem dazu führen, dass die letzte Reaktion des Acetyl-CoA-Wegs, die durch die Acetatkinase katalysiert wird, rückwärts läuft, was zu einer Erschöpfung des Coenzym A-Vorrats und somit zum Erliegen der Acetatbildung führt (Menzel und Gottschalk, 1985).

Wang und Wang (1984) haben auch gezeigt, dass neben der Essigsäure auch das Acetation einen inhibierenden Einfluss auf die Bakterienzellen ausübt. Der inhibierende Effekt der undissoziierten Essigsäure war dabei deutlich größer als der des Acetations. Eine vollständige Unterdrückung des Wachstums von *Moorella thermoacetica* erfolgte ab einer Essigsäurekonzentration von 2,4 - 3,0 g L⁻¹, beziehungsweise einer Acetatkonzentration von 48 g L⁻¹.

Die Dissoziation der schwachen Essigsäure ($pK_S = 4,76$) in Lösung wird durch den pH des Mediums beeinflusst. So liegt die Essigsäure bei niedrigem pH ($pH < 4,76$) hauptsächlich dissoziiert vor und bei einem pH größer als pK_S größtenteils als Acetation. In der Regel erreichen acetogene Mikroorganismen maximale Wachstums- und Produktbildungsraten bei neutralem pH, die bei Erhöhung oder Erniedrigung des pH sehr schnell abfallen (Tang *et al.*, 1989). Acetogene Mikroorganismen, deren pH-Optimum im neutralen Bereich liegt, halten den pH im Zellinneren etwa 0,6 - 0,8 pH-Einheiten alkalischer als den pH im Medium. Dieser Gradient wird aufrecht erhalten durch Ausschleusung kleiner geladener Moleküle wie H⁺ oder Na⁺ durch membranständige Proteine. Durch Diffusion gelangt undissoziierte Essigsäure in die Zelle und dissoziiert auf Grund des höheren pH im Zellinneren, was zu einer Erhöhung der Protonenkonzentration und damit zu einer Entkopplung des transmembranen Protonengradienten führt. Diese Entkopplung vermindert die Energetisierung der Zellmembran und beeinflusst folglich den Energiestoffwechsel der Zelle (Baronofsky *et al.*, 1984). Für *A. woodii*

wird beschrieben, dass dieser Organismus zellintern mindestens 21 g L^{-1} Acetat toleriert (Boenigk *et al.*, 1989). Die pH-Homöostase in acetogene Bakterien während der Anreicherung von Acetat im Medium wurde bis jetzt aber noch nicht genauer untersucht (Rogers *et al.*, 2006).

3.3.6 Toleranz gegenüber Sauerstoff

Acetogene Bakterien wurden oftmals aus anoxischen Lebensräumen isoliert, in denen sie periodisch Sauerstoff ausgesetzt waren und so mit oxidativem Stress umzugehen hatten. Die Fähigkeit, Acetogenese zu betreiben wird durch die Anwesenheit von O_2 im Medium nicht beeinflusst, aber erschwert. Einige Eisen- und Schwefelhaltigen Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs, wie beispielsweise Formiat-Dehydrogenase, CO-Dehydrogenase und Hydrogenase sind extrem empfindlich gegenüber O_2 (Drake *et al.*, 2008). Viele der Reaktionen des autotrophen Stoffwechsels laufen außerdem nur bei niedrigem Redoxpotenzial ab, das in Anwesenheit von O_2 , das einen starken Einfluss auf das Redoxpotenzial des Fermentationsmediums hat, nicht gewährleistet werden kann. Acetogene Mikroorganismen können eine Vielzahl an terminalen Elektronenakzeptoren verwenden und besitzen die Fähigkeit, den Fluss an Reduktionsäquivalenten vom Acetyl-CoA-Weg umzuleiten auf alternative terminale Elektronenakzeptierende Prozesse, die weniger sauerstoffempfindlich sind und bei höherem Redoxpotential ablaufen (Drake *et al.*, 2008). Für den korrekten Ablauf des Acetyl-CoA-Wegs ohne Verlust von Reduktionsäquivalenten ist die Aufrechterhaltung von sauerstofffreier Atmosphäre für einen Produktionsprozess von entscheidender Wichtigkeit.

Acetogene Mikroorganismen besitzen zudem Mechanismen, um oxidativen Stress in Anwesenheit von O_2 in Spuren im Medium zu bewältigen. Es konnten bei einigen Acetogenen Enzyme nachgewiesen werden, die für die Entfernung von O_2 oder seinen toxischen Nebenprodukten zuständig sind. Darunter befinden sich die Enzyme NADH-Oxidase, Peroxidase, Superoxid-Dismutase und Rubredoxin-Oxidoreduktase (Drake *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass einige Acetogene die Anwesenheit von bis zu 1 % Sauerstoff im Medium tolerieren, wobei *A. woodii* mit 0,3 % O_2 die niedrigste Toleranz aufwies (Karnholz *et al.*, 2002).

3.3.7 Einfluss von Medienbestandteilen

Eine ausreichende Versorgung der Bakterienzellen mit Nährstoffen und Spurenelementen ist eine Voraussetzung hohe Wachstums- und Produktbildungsraten. In diesem Kapitel wird die Bedeutung einiger Komponenten des Mediums für den Stoffwechsel von acetogenen Mikroorganismen näher erläutert.

Hefeextrakt

Hefeextrakt stellt in mikrobiologischen Kultivierungen generell eine vielseitige Nährstoffquelle dar. Es enthält unter anderem Oligopeptide, freie Aminosäuren, Kohlenhydrate, einige Fettsäuren, Cholin, Purine, Pyrimidine sowie einen hohen Gehalt an essentiellen Vitaminen der B-Gruppe (Fuchs und Schlegel, 2007). Der Inhalt von Hefeextrakt ist chemisch nicht näher bestimmt und kann je nach Bezugsquelle variieren.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass acetogene Mikroorganismen Hefeextrakt für das Wachstum nicht unbedingt benötigen. Die Anwesenheit von Hefeextrakt hatte jedoch schnellere Wachstums- und Produktbildungsraten und höhere Zellerträge zur Folge, was zeigt, dass ein oder mehrere Bestandteile des Hefeextrakts, wie zum Beispiel Vitamine oder Aminosäuren, einen förderlichen Effekt auf das Wachstum der Mikroorganismen ausüben (Tschech und Pfennig, 1984; Chang *et al.*, 1999).

Spurenelemente

Spurenelemente, wie zum Beispiel Eisen, Selen, Nickel und Kobalt, spielen im Stoffwechsel von anaeroben Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, dass diese Spurenelemente zum Medium gegeben werden, da unzureichende Mengen dieser Substanzen zu Limitierungen des Wachstums führen können (McInerney und Gieg, 2004). Auch im Acetyl-CoA-Weg sind eine Vielzahl an Enzymen beteiligt, die Metalle als Cofaktoren besitzen (Ragsdale und Pierce, 2008).

So enthalten viele Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs Eisen-Schwefel(Fe-S)-Cluster, die an Elektronentransferreaktionen beteiligt sind. Diese Fe-S-Cluster sind beispielsweise enthalten im Schlüsselenzym dieses Stoffwechselwegs, der bifunktionellen CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (CODH/ACS) sowie in den Enzymen Formiat-Dehydrogenase, Hydrogenase, Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein und in Ferredoxin (Ragsdale und Pierce, 2008). Somit nimmt Eisen eine zentrale Rolle im autotrophen Stoffwechsel acetogener Bakterien ein.

Im Schlüsselenzym CODH/ACS ist außerdem Nickel in Form eines Eisen-Nickel-Schwefel-Clusters enthalten (Drennan *et al.*, 2004). Nickel kann neben Eisen auch in Hydrogenasen enthalten sein, die im Stoffwechsel von Acetogenen durch Oxidation von Wasserstoff Reduktionsäquivalente bereitstellen. Formiat-Dehydrogenasen in Acetogenen haben als Cofaktoren je nach Organismus Selen und Wolfram (Yamamoto *et al.*, 1983). Kobalt spielt eine wichtige Rolle beim Transfer der Methylgruppen auf das Kobalt-Zentrum des Corrinoid-Eisen-Schwefel Proteins (Ragsdale und Pierce, 2008).

Die Anwesenheit diverser Metallionen entweder alleine oder in Kombination in den aktiven Zentren der Enzyme des Acetyl-CoA-Wegs zeigt, dass diese Spurenelemente im Medium in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen müssen. So konnten Andreesen *et al.* (1974)

zeigen, dass die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase in *Clostridium formicoaceticum* in Abhängigkeit der Metallionen im Medium um den Faktor 250 variieren kann.

Für *Moorella thermoacetica* wird außerdem berichtet, dass die Erhöhung der Konzentration an Eisen, Selen und Molybdän eine Erhöhung der Wachstumsrate und der Synthese der Formiat-Dehydrogenase beim Wachstum auf organischen Kohlenstoffquellen wie Fructose und Glucose zur Folge hatte (Andreesen *et al.*, 1973). Die Erkenntnis wurde von Schoberth (1977) für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* verwendet, was eine erhöhte Wasserstoffaufnahme der Zellen zur Folge hatte.

Saxena und Tanner (2011) konnten kürzlich zeigen, dass die Ethanolproduktion unter autotrophen Bedingungen von *C. ragsdalei* durch Optimierung der Konzentrationen an essentiellen Metallionen im Medium deutlich gesteigert werden konnte. Durch Messung der Aktivitäten einiger wichtiger Enzyme für die Ethanolproduktion konnte zudem Kupfer als störendes Element identifiziert werden. Die Erhöhung der autotrophen Ethanolproduktion durch Optimierung der Konzentration an Metallionen wurde auch patentrechtlich schon festgehalten für die acetogenen Mikroorganismen *C. ljungdahlii* und *C. carboxidivorans* (Gaddy *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2010).

Vitamine

Obwohl einige Acetogene, wie beispielsweise *Thermoanaerobacter kivui*, ohne den Zusatz von organischen Spurenelementen auskommen (Leigh *et al.*, 1981), benötigen viele Acetogene zusätzliche Vitamine im Nährmedium.

So spielt beispielsweise Pantothenensäure eine wichtige Rolle in der Synthese von Coenzym A, das in den letzten Schritten des Acetyl-CoA-Wegs hin zum Acetat als Coenzym zum Einsatz kommt. Ist die Konzentration an Pantothenensäure im Medium nicht ausreichend, so verringert sich die Bildungsrate für Acetyl-CoA. Eine weitere wichtige Rolle in der autotrophen Acetogenese spielt Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), das einen integralen Bestandteil der Cobalamin-abhängigen Methyltransferase darstellt (Das *et al.*, 2007). Im Acetyl-CoA-Weg spielt außerdem Tetrahydrofolat (THF) eine wichtige Rolle als Coenzym einiger Enzyme des Methyl-Zweigs. THF ist ein biochemisches Derivat der Folsäure (Vitamin B₉), das wiederum aus 4-Aminobenzoessäure aufgebaut wird.

Für einige acetogene Mikroorganismen wurde der Bedarf an essentiellen Vitaminen beschrieben. So benötigen zum Beispiel *Acetobacterium woodii* und *Butyribacterium methylotrophicum* Pantothenat (Balch *et al.*, 1977; Mönch und Zeikus, 1983), *Moorella thermoacetica* und *Moorella thermoautotrophica* Nikotinsäure (Lundie und Drake, 1984; Savage und Drake, 1986) und *Eubacterium limosum* Biotin, Pantothenat und Liponsäure als essentielle Medienbestandteile (Genthner *et al.*, 1981).

Schwefelquelle

Neben Eisenionen wird für die Synthese von Eisen-Schwefel-(FeS)-Clustern noch Schwefel benötigt, das den Mikroorganismen über das Medium zugeführt werden muss. Um das Redoxpotential des Mediums zu senken und Reste an Sauerstoff zu entfernen, werden den Medien für anaerobe Bakterien schwefelhaltige Reduktionsmittel wie Natriumsulfid und L-Cystein zugesetzt, die gleichzeitig als Quelle für Schwefel dienen können (Fuchs und Schlegel, 2007). So ist laut Agar *et al.* (2003) die schwefelhaltige Aminosäure L-Cystein die bevorzugte Schwefelquelle für die Bildung von FeS-Clustern. Für ein unlimitiertes Wachstum von autotrophen Mikroorganismen, die eine Vielzahl an Enzymen mit FeS-Clustern enthalten, sollte L-Cystein oder einer alternativen Schwefelquelle in ausreichenden Mengen im Medium vorhanden sein. Genthner *et al.* (1981) haben zum Beispiel gezeigt, dass L-Cystein einen essentiellen Medienbestandteil für das acetogenen Bakterium *Eubacterium limosum* darstellt.

Neben Natriumsulfid und L-Cystein eignen sich noch weitere Schwefelquellen für das Wachstum von acetogenen Bakterien. Für die Kultivierung von *Butyribacterium methylotrophicum* und *Acetobacterium woodii* haben sich dabei unter anderem Sulfid, Thiosulfat und Dithionit als geeignet erwiesen (Heijthuijsen und Hansen, 1989).

3.3.8 *Acetobacterium woodii*

Im Rahmen dieser Arbeit kam das acetogene Bakterium *Acetobacterium woodii* zum Einsatz. Es wurde erstmals von Balch *et al.* (1977) aus Meeressediment isoliert und nach Harland G. Wood benannt, der maßgeblich an der Entschlüsselung des Acetyl-CoA-Wegs beteiligt war. Es handelt sich dabei um 1 - 2 µm lange, Gram-positive, ovale Stäbchen, die meist paarweise auftreten. Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist, besitzen die Zellen ein oder zwei subterminale Flagellen, die sie zur aktiven Fortbewegung befähigen. Die optimale Wachstumstemperatur dieses mesophilen Bakteriums liegt bei 30 °C und das pH-Optimum im neutralen Bereich. Die Zellen sind aber auch bei einem pH bis zu 5,0 noch mehrere Wochen überlebensfähig (Balch *et al.*, 1977).

A. woodii ist in der Lage, sowohl organische Substrate wie Fructose, Glucose, Lactat und Formiat und verschiedene methoxylierte aromatische Säuren, als auch gasförmige Substrate wie H₂ und CO₂ und auch CO als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwenden (Balch *et al.*, 1977; Bache und Pfennig, 1981; Genthner und Bryant, 1987). Zudem ist dieses Bakterium als einer der wenigen Vertreter der Acetogenen in der Lage, mixotroph zu wachsen, das heißt organische und gasförmige Substrate simultan zu verstoffwechseln (Braun und Gottschalk, 1981). Die Fähigkeit zur Mixotrophie ist neben *A. woodii* nur für ein wenig untersuchtes Acetogen aus dem Darm von Termiten, *Sprumusa termitida*, beschrieben (Breznak und Blum, 1991). Das Endprodukt ist dabei hauptsächlich Acetat. Als alternative Elektronenakzeptoren

neben CO_2 kann *A. woodii* zur Energiekonservierung aromatische Akrylate wie beispielsweise Caffeat verwenden (Tschech und Pfennig, 1984).

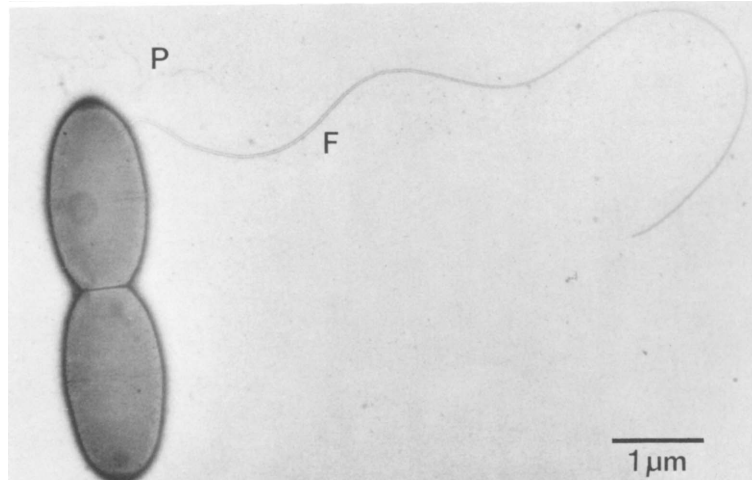


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopaufnahme von *Acetobacterium woodii* mit subterminalem Flagellum (F) und pili-artigen Strukturen (P) (Balch *et al.*, 1977).

A. woodii gehört zu den Natrium-abhängigen Acetogenen, dessen Energiestoffwechsel und die Rotation des Flagellums auf einen Natrium-Gradienten über die Cytoplasmamembran basiert (Biegel *et al.*, 2011b; Müller und Bowien, 1995). Dabei wurden mehrere Na^+ -abhängige Stoffwechselreaktionen identifiziert und die damit verbundenen Enzyme aufgereinigt und charakterisiert (Drake *et al.*, 2006). Für die Acetatbildung von *A. woodii* auf den gasförmigen Substraten H_2 und CO_2 ist die Anwesenheit von Natrium-Ionen unbedingt erforderlich, wohingegen die Acetatbildung auf Fructose nur eine leichte Abhängigkeit von Na^+ aufweist (Heise *et al.*, 1989).

3.4 Kultivierung von Mikroorganismen

Grundsätzlich werden bei Kultivierungen von Mikroorganismen die Betriebsweisen Satz-, Zulauf- und kontinuierliche Kultivierung unterschieden. Die Kultivierungen im Rahmen dieser Arbeiten wurden ausschließlich im Satzverfahren durchgeführt, das im Folgenden beschrieben ist. Die mathematischen Beschreibungen sind dabei vorwiegend nach Chmiel (2006) dargestellt.

3.4.1 Mikrobielles Wachstum

Das Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren unter begrenztem Nährstoffangebot, wobei keine sonstigen Limitierungen oder Inhibierungen vorliegen, kann in sechs Phasen

unterteilt werden. Diese sind schematisch in Abbildung 3.10 dargestellt. Nachdem sich die Mikroorganismen in der Verzögerungsphase an die Wachstumsbedingungen im Medium gewöhnt haben, nimmt die Zellzahl in der Übergangsphase langsam zu. In der exponentiellen Wachstumsphase findet maximale Vermehrung der Zellen mit einer maximalen Wachstumsrate μ_{\max} statt. Sind eines oder alle Substrate im Medium verbraucht oder kommt es zu einer Inhibierung des Wachstums durch ein toxisches Stoffwechselprodukt, so kommt es zu einer Limitierungsphase. Diese geht dann über in die stationäre Phase, in der die Bakterienzellen hauptsächlich Erhaltungsstoffwechsel betreiben und die Wachstumsrate gleich der Absterberate ist. In der anschließenden Absterbephase kann es zur vermehrten Autolyse der Bakterienzellen kommen, in der die Zellen durch die Wirkung von zelleigenen Enzymen lysieren (Fuchs und Schlegel, 2007).

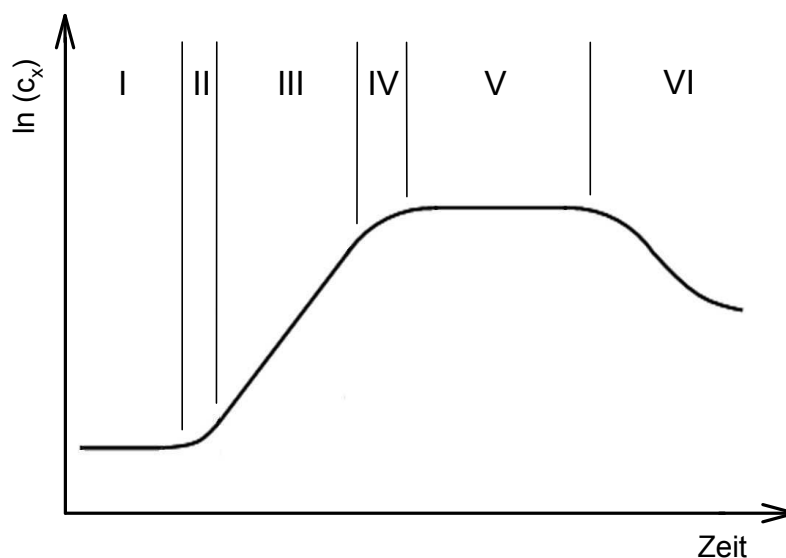


Abbildung 3.10: Idealisierte Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren: Verzögerungsphase (I), Übergangsphase (II), exponentielle Wachstumsphase (III), Limitierungsphase (IV), stationäre Phase (V), Absterbephase (VI).

3.4.2 Satzverfahren

Im Satzverfahren sind alle nötigen Nährstoffe im Medium vorgelegt. Es handelt sich in Bezug auf die Flüssigphase um ein geschlossenes System, bei dem keine Flüssigkeitsströme zu- oder abgeführt werden. Trotz des konstanten Eintrags von gasförmigen Komponenten in das Reaktionsmedium spricht man in der Bioverfahrenstechnik von einem Satzverfahren. Die Zugabe von geringen Mengen an Säure oder Base zur Regelung des pH bleibt in diesem Zusammenhang meist unberücksichtigt (Chmiel, 2006).

Bei einem idealen Rührkesselreaktor wird angenommen, dass auf Grund des Rührens eine vollständige Durchmischung des Reaktors erzielt wird und somit räumlich konstante Bedingungen bezüglich der Prozessvariablen (Konzentrationen, physikalische Eigenschaften

des Reaktionsmediums, Reaktionsgeschwindigkeiten) erreicht werden. Dabei lässt sich für jede Komponente i eine Massenbilanz formulieren:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = r_i \cdot V \quad (\text{Gleichung 3.6})$$

c_i = Konzentration der Komponente i , g L^{-1}

r_i = Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Im Satzverfahren gilt, dass das Volumen näherungsweise konstant bleibt, daher lässt sich Gleichung 3.6 weiter vereinfachen zu:

$$\frac{d(c_i)}{dt} = r_i \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

3.4.3 Prozessparameter

Für den Vergleich von Prozessen müssen typische Parameter ermittelt werden, die den Wachstumsverlauf, die Substrataufnahme und die Produktbildung charakterisieren. Zu diesen Parametern zählen die Wachstumsrate, zellspezifische und volumetrische Produktbildungsraten sowie die Substrataufnahmeraten.

Die Wachstumsrate μ von Mikroorganismen ist wie folgt definiert:

$$\mu = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (\text{Gleichung 3.8})$$

Unter der Annahme, dass die Wachstumsrate in der exponentiellen Phase des Wachstums konstant ist, erhält man durch Intergration von Gleichung 3.8:

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad (\text{Gleichung 3.9})$$

Durch Umformung und Logarithmierung von Gleichung 3.9 ergibt sich folgende Gleichung, über die sich die Wachstumsrate durch lineare Regression der Messdaten ermitteln lässt.

$$\ln\left(\frac{c_x}{c_{x,0}}\right) = \mu_{\max} \cdot t \quad (\text{Gleichung 3.10})$$

Die Geschwindigkeit der Substrataufnahme und der Produktbildung lassen sich durch Änderung der Konzentrationen im Medium unter der Annahme eines konstanten Volumens wie folgt angeben:

$$r_S = Q_S = \frac{dc_S}{dt} \quad (\text{Gleichung 3.11})$$

$$r_P = Q_P = \frac{dc_P}{dt} \quad (\text{Gleichung 3.12})$$

Q_S = Substrataufnahmerate, $g_{\text{Substrat}} L^{-1} h^{-1}$

Q_P = Produktbildungsrate, $g_{\text{Produkt}} L^{-1} h^{-1}$

Analog lassen sich die spezifische Substrataufnahmerate q_S und die spezifische Produktbildungsrate q_P in Bezug auf die im Medium vorhandene Biomassekonzentration definieren:

$$q_S = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad (\text{Gleichung 3.13})$$

$$q_P = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (\text{Gleichung 3.14})$$

q_S = spezifische Substrataufnahmerate, $g_{\text{Substrat}} g_{\text{BTM}}^{-1} h^{-1}$

q_P = spezifische Produktbildungsrate, $g_{\text{Produkt}} g_{\text{BTM}}^{-1} h^{-1}$

c_S = Substratkonzentration, $g L^{-1}$

c_P = Produktkonzentration, $g L^{-1}$

Für Bioprozesse, in denen gasförmige Substrate zum Einsatz kommen spielt die Eintragsrate des Gases in die Flüssigphase eine entscheidende Rolle. Um eine Stofftransportlimitierung zu vermeiden, sollte die Eintragsrate des Gases zwangsläufig über der Aufnahmerate der gasförmigen Substrate der Zellen liegen. Die Eintragsrate eines Gases in die Flüssigkeit kann durch Gleichung 3.15 in Abhängigkeit des volumenbezogenen Stofftransportkoeffizienten $k_L a$ und des treibenden Konzentrationsgefälles ($c_g^* - c_g$) vereinfacht beschrieben werden. Auf den Gas-Flüssig-Stofftransport wird im folgenden Kapitel noch genauer eingegangen.

$$\text{Gase intragsrate} = k_L a \cdot (c_g^* - c_g) \quad (\text{Gleichung 3.15})$$

$k_L a$ = volumenbezogener Stofftransportkoeffizient, s^{-1}

c_g^* = Sättigungskonzentration des Gases im Medium an der Phasengrenzfläche, $mol L^{-1}$

c_g = Gelöstkonzentration des Gases im Medium, $mol L^{-1}$

Die volumetrische Aufnahmerate eines Gases ist definiert als die von den Bakterienzellen pro Volumeneinheit aufgenommene Menge an gelöstem Gas. Dies kann mittels der spezifischen Substrataufnahmerate q_S nach folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\text{Gasaufnahme} = q_S \cdot c_x \quad (\text{Gleichung 3.16})$$

3.4.4 Gas-Flüssig-Stoffübergang in Bioreaktoren

Bedeutung des Gaseintrags für mikrobielle Prozesse

Der Eintrag von gasförmigen Substraten in das Reaktionsmedium stellt in Bioprozessen ein essentielle Einflussgröße auf die Produktionskapazität des Bioreaktors dar. Die Umsatzraten der gasförmigen Substrate durch die Zellen bestimmen dabei die Rate, mit der Gas in die Flüssigphase eingetragen werden muss. Im Allgemeinen werden die Umsatzraten in Prozessen, bei denen nur schwer lösliche Gase zum Einsatz kommen durch den Gas-Flüssig-Stoffübergang limitiert (Doran, 2006). Unter Bedingungen, in denen der Stofftransport limitierend ist, wird Gas mit der maximal möglichen Kapazität des Bioreaktors aus der Gas- in die Flüssigphase eingetragen und die Gelöstkonzentration des Gases im Medium liegt nahe bei Null (Doran, 2006). Um eine Stofftransportlimitierung auszuschließen, muss die Eintragsrate der gasförmigen Substrate aus der Gas- in die Flüssigphase über der Verbrauchsrate der Mikroorganismen im Bioreaktor liegen.

Der Stofftransport ist von entscheidender Wichtigkeit in Prozessen, bei denen Gase die Substrate für den kompletten Stoffwechsel darstellen. In Synthesegas-Fermentationen ist eine Stofftransportlimitierung daher typischerweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Mohammadi *et al.*, 2011). Dabei kann eine Stofftransportlimitierung aus zwei Gründen noch ausgeprägter sein im Vergleich zu aeroben Prozessen: zum einen betragen die Löslichkeiten von CO und H₂ bezogen auf die molare Masse jeweils nur 77 % und 65 % der Löslichkeit von O₂ und zum anderen müssen doppelt soviel Gasmoleküle pro Kohlenstoffäquivalent transferiert werden wie in aeroben Prozessen basierend auf Glucose (Worden *et al.*, 1997).

Transfer von Gasmolekülen aus der Gasblase zur Bakterienzelle

In biologischen Prozessen müssen die Gasmoleküle eine Reihe von Transportwiderständen überwinden, bevor diese von den Bakterienzelle im Medium verstoffwechselt werden können (siehe Abbildung 3.11):

- (1) Transfer vom Kern der Gasblase zur Gas-Flüssig-Grenzschicht
- (2) Transport über die Gas-Flüssig-Grenzschicht
- (3) Diffusion durch den laminaren Flüssigfilm um die Gasblase
- (4) Transport durch das gut durchmischte Flüssigkeitsgebiet
- (5) Diffusion durch den laminaren Flüssigfilm um die Bakterienzelle
- (6) Diffusion über die Zellmembran
- (7) Transport intrazellulär zu den Reaktionsplätzen

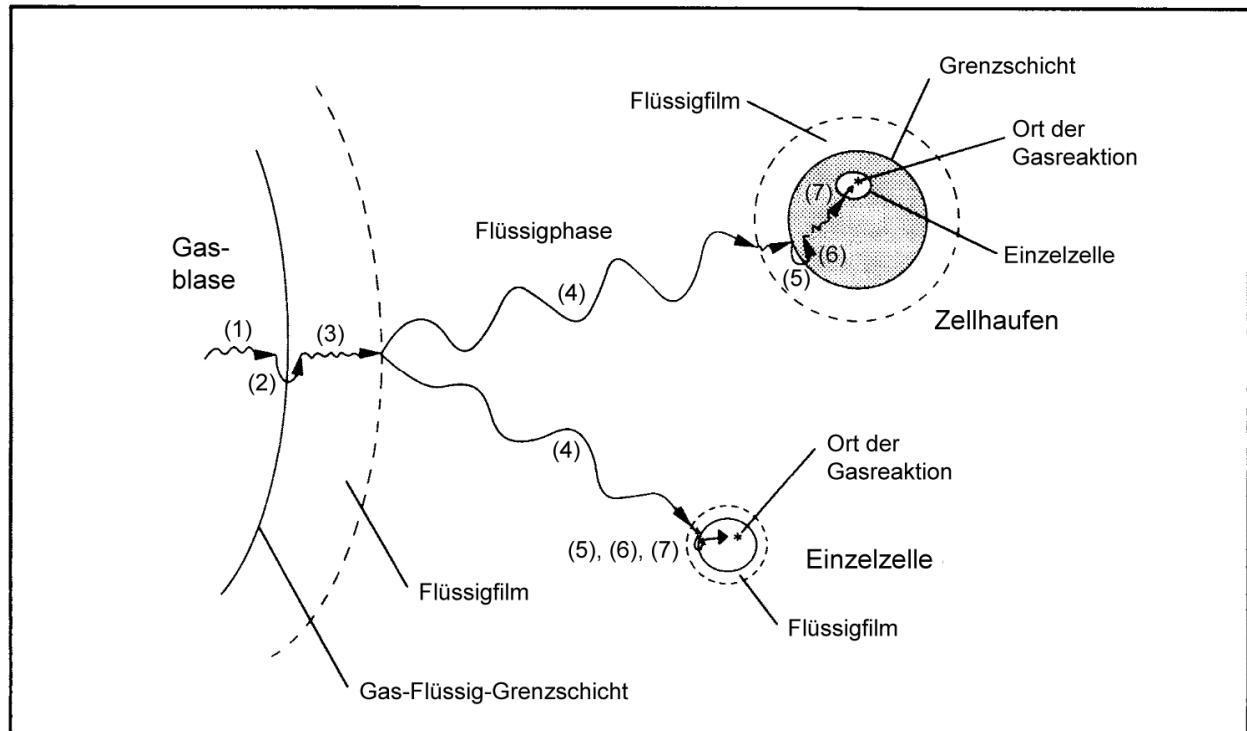


Abbildung 3.11: Transfer von Gasmolekülen aus der Gasblase durch die Flüssigkeit zur Bakterienzelle; Beschreibung siehe Text (nach Doran, 2006).

Mathematische Beschreibung des Gas-Flüssig-Stofftransport

In der Literatur finden sich im Wesentlichen drei Modelle zur Beschreibung des Stofftransports aus der Gas- in die Flüssigphase: das Penetrationsmodell, das Oberflächenerneuerungsmodell und das Filmmodell (Chmiel, 2006). Am häufigsten wird das Zweifilmmodell zur Beschreibung von Transportphänomenen an Grenzschichten verwendet und soll daher im Folgenden beschrieben werden.

Bei der sogenannten Filmtheorie geht man davon aus, dass sich an der Phasengrenze zwischen Gas und Flüssigkeit sofort ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellt und sich in der fluiden Phase eine laminare, stationäre Grenzschicht bildet, während im Kern der Gasblase und der Flüssigphase turbulente Strömung vorherrscht. In den laminaren Grenzschichten erfolgt der Stofftransport durch Diffusion, während im turbulenten Bereich konvektiver Stofftransport mit vernachlässigbaren Konzentrationsgradienten stattfindet.

Die Diffusion an der laminaren Grenzschicht ist abhängig von der Diffusibilität des Gases und der Dicke der Grenzschicht. Das Diffusionsvermögen wird durch den Diffusionskoeffizienten D charakterisiert, welcher in Luft viel größer ist als in Wasser. Außerdem ist die Grenzschicht in Gas viel dünner als in der Flüssigphase und daher stellt die laminare flüssigseitige Grenzschicht den Hauptwiderstand des Stofftransports aus der Gas- in die Flüssigphase dar. Die laminare Grenzschicht um die Zelle wird dabei vernachlässigt (Chmiel, 2006).

Das gasförmige Substrat wird solange aus der Gas- in die Flüssigphase transportiert, bis die Gelöstkonzentration c_g in der Flüssigphase die Sättigungskonzentration c_g^* erreicht hat. Der Gasstrom ist nach Gleichung 3.17 proportional zum treibenden Konzentrationsgefälle ($c_g^* - c_g$) für den Stofftransport und der Fläche A_g , über die der Transport stattfindet. Als Proportionalitätsfaktor wird der Stoffübergangskoeffizient k_L eingeführt (Doran, 2006).

$$\text{Gaseintragsrate} = k_L \frac{A_g}{V} \cdot (c_g^* - c_g) \quad (\text{Gleichung 3.17})$$

- k_L = Stoffübergangskoeffizient der Flüssigphase, m s^{-1}
 A_g = Phasengrenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit, m^2
 V = Flüssigvolumen im Reaktor, m^3

Der Quotient A_g/V steht in Gleichung 3.17 für eine spezifische, auf das Flüssigvolumen bezogene Stoffaustauschfläche und wird mit a bezeichnet. Für Bioreaktoren mit Blasenbegasung sind die beiden Größen k_L und a nicht getrennt voneinander zu ermitteln, daher werden diese zum volumetrischen Stofftransportkoeffizient $k_L a$ zusammengefasst mit der Einheit s^{-1} (Hass und Pörtner, 2009).

Bezogen auf das gasförmige Substrat H_2 lässt sich eine Wasserstoff-Eintragsrate definieren, die in der folgenden Gleichung angegeben ist:

$$\text{HTR} = k_L a \cdot (c_{\text{H}_2}^* - c_{\text{H}_2}) \quad (\text{Gleichung 3.18})$$

- HTR = Wasserstoffeintragsrate ("*hydrogen transfer rate*"), $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
 a = spezifische Gas-Flüssig-Phasengrenzfläche, $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$

Analog kann eine Kohlenstoffdioxid-Eintragsrate definiert werden:

$$\text{CTR} = k_L a \cdot (c_{\text{CO}_2}^* - c_{\text{CO}_2}) \quad (\text{Gleichung 3.19})$$

- CTR = Kohlenstoffdioxideintragsrate ("*carbon dioxide transfer rate*"), $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$

Der volumetrische Stofftransportkoeffizient $k_L a$ ist ein Maß für die Effizienz des Gaseintrags und wird im Wesentlichen durch das Zusammenwirken von Rührerdrehzahl und Begasungsrate bestimmt. Der $k_L a$ ist für den Betrieb eines Rührkesselreaktors von großer Bedeutung, da er eine Aussage darüber trifft, wie gut die Mikroorganismen im Medium mit gasförmigen Substraten versorgt werden können. Stellt die Versorgung mit einem gasförmigen Substrat den limitierenden Faktor dar, so können über die Kenntnis des $k_L a$ maximale Wachstums- und Produktbildungsraten, sowie die maximal mögliche Biomassekonzentration abgeschätzt werden (Hass und Pörtner, 2009).

Einflussgrößen auf den Stofftransport

Die Geschwindigkeit des Gas-Flüssig-Stoffübergangs in das Reaktionsmedium wird von mehreren physikalischen und chemischen Faktoren beeinflusst, die entweder den flüssigseitigen Stoffübergangskoeffizient k_L , die Stoffaustauschfläche a oder den Konzentrationsgradienten Δc verändern. Eine Erhöhung eines oder mehrerer dieser Faktoren durch Veränderung der Betriebsbedingungen führt folglich zu einer Erhöhung des Gaseintrags ins Medium.

Der limitierende Faktor der Geschwindigkeit des Gaseintrags ist die Diffusion des gelösten Gases durch die laminare Grenzschicht auf der Flüssigkeitsseite. Im Bioreaktor hängt k_L von der Strömungsgeschwindigkeit, der Geometrie des Reaktorsystems und den Fluideigenschaften wie Viskosität und Diffusionsvermögen ab. Generell resultiert die Verringerung der Grenzschichtdicke oder die Erhöhung des Diffusionskoeffizienten im laminaren Grenzfilm in einer Erhöhung von k_L und somit in einer Verbesserung des Gaseintrags. Eine Steigerung der Konvektion über intensivere Durchmischung des Mediums und möglicherweise höhere Gasleerrohrgeschwindigkeit bewirkt dabei eine erhöhte Relativgeschwindigkeit zwischen Austauschoberfläche und Fluidströmung, die zu einer Reduzierung der Dicke der laminaren Grenzschicht um die Gasblasen führt. Eine Verringerung des Diffusionswegs durch die Grenzschicht resultiert in einer Erhöhung von k_L . Jedoch kann durch Veränderung der Betriebsbedingungen in Bioreaktoren die Grenzschichtdicke kaum beeinflusst werden.

Eine maßgebliche Erhöhung des Stofftransports kann durch Vergrößerung der spezifischen Stoffaustauschfläche erreicht werden, die von der Größe und Anzahl der Gasblasen im Medium abhängt. Das Verhalten der Gasblasen wird wiederum von der Rührerdrehzahl, der Begasungsrate und der Medienzusammensetzung beeinflusst (Doran, 2006). Ausschlaggebend ist dabei der volumenbezogene Leistungseintrag, der im Wesentlichen die Turbulenz bestimmt und damit auch die Dispersion des eingetragenen Gases in mehr oder weniger kleine Blasen. Bei hohen Rührerdrehzahlen und demzufolge hohem Leistungseintrag werden die eingetragenen Gasblasen auf wirksame Weise in kleine Gasblasen mit günstigerem Oberflächen/Volumen-Verhältnis zerteilt und ermöglichen somit eine feinere Dispergierung des Gases in der Flüssigphase. Kleinere Blasen besitzen niedrigere Aufstiegsgeschwindigkeiten und haben dadurch eine längere Kontaktzeit zur Flüssigkeit, was den Gasen mehr Zeit gibt, sich zu lösen (Bredwell *et al.*, 1999). Da die Stoffaustauschfläche für den Stoffübergang sowohl vom gesamten Gasvolumen im System als auch von der durchschnittlichen Blasengröße abhängt, werden hohe Stoffübergangsraten bei hoher Verweilzeit erreicht (Doran, 2006). Des Weiteren kann der $k_L a$ durch Erhöhung der Begasungsrate beziehungsweise der Gasleerrohrgeschwindigkeit verbessert werden. Dies ist auf einen erhöhten Gasanteil aufgrund vermehrter Anzahl fein dispergierter Gasblasen zurückzuführen, wodurch die volumen-spezifische Stoffaustauschfläche a vergrößert wird. Der Effekt der Begasungsrate auf den $k_L a$

fällt jedoch deutlich geringer aus als der durch Erhöhung des Leistungseintrags (Hass und Pörtner, 2009).

Der flüssigseitige Konzentrationsgradient ($c_G^* - c_G$) stellt beim Gas-Flüssig-Stoffübergang die treibende Kraft dar. Eine Erhöhung des Konzentrationsgradienten zwischen Phasengrenzfläche und dem Kern der Flüssigphase führt damit auch zu erhöhtem Gaseintrag. Dies erfordert eine Anhebung der Sättigungskonzentration des Gases an der Phasengrenzfläche, was erreicht werden kann durch Erhöhung des Partialdrucks des Gases im Gasstrom und/oder durch Erhöhung des Drucks im System.

Die metabolische Aktivität der Zellen und große Turbulenzen im Reaktionssystem machen den Einsatz von Antischaummittel in biologischen Prozessen zur Unterdrückung von Schaumbildung unvermeidbar. Antischaummittel vermindern die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und beeinflussen somit das Koaleszenzverhalten von Blasen. Durch Zugabe von Antischaummittel kann somit der volumetrische Stoffübergangskoeffizient deutlich reduziert werden (Kawase and Moo-Young, 1990).

Messung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ für O_2

Da der Gaseintrag in vielen Fällen die limitierende Größe darstellen kann, ist die Kenntnis der Kapazität eines Bioreaktors zum Eintrag der gasförmigen Substrate in Abhängigkeit der eingestellten Betriebsbedingungen entscheidend. Dabei kann der volumetrische Stoffübergangskoeffizient über stationäre und dynamische Methoden abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit kam als klassische dynamische Messmethode die Stickstoff-desorptionsmethode (Linek *et al.*, 1989) zum Einsatz, die im Folgenden beschrieben wird.

Dynamische Messmethoden beruhen auf der Messung der zeitlichen Änderung der Gelöstgaskonzentration c_L in einem belüfteten Reaktor nach Aufprägung einer Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Dazu wird das zellfreie Medium zunächst mit reinem Stickstoff begast und somit der Sauerstoff aus der Flüssigphase ausgetragen. Anschließend findet eine sofortige Umstellung auf Begasung mit Sauerstoff statt, wobei die Kinetik der Aufsättigung von Sauerstoff im Medium aufgezeichnet wird. Die Messungen können sowohl mit Luft als auch mit reinem Sauerstoff durchgeführt werden, da der Anteil an O_2 im Gasstrom generell keinen Einfluss auf die Bestimmung des $k_L a$ hat. Unter der Annahme idealer Rückvermischung der Flüssig- und der Gasphase kann folgende Gleichung zur Bestimmung des $k_L a$ aus den Messdaten verwendet werden.

$$\frac{c_{O_2}^* - c_{O_2}(t)}{c_{O_2}^* - c_{O_2}(0)} = e^{-k_L a t} \quad (\text{Gleichung 3.20})$$

c_{O_2} = Gelöstkonzentration von Sauerstoff, mg L^{-1}

$c_{O_2}^*$ = Sättigungskonzentration von Sauerstoff an der Phasengrenzfläche, mg L^{-1}

Durch Umstellung und Logarithmierung von Gleichung 3.20 erhält man die Gleichung einer Geraden, deren Steigung der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ darstellt.

$$\ln \left(\frac{c_{O_2}^* - c_{O_2}(0)}{c_{O_2}^* - c_{O_2}(t)} \right) = k_L a \cdot (t - t_0) \quad (\text{Gleichung 3.21})$$

Zur Vereinfachung lassen sich die Konzentrationen gegen das gemessene p_{O_2} -Signal austauschen, so dass der $k_L a$ direkt aus der Messung des Sauerstoffpartialdrucks in der Flüssigphase ermittelt werden kann.

Gleichung 3.21 kann allerdings nur verwendet werden, wenn die Ansprechzeit der verwendeten Sauerstoffelektrode t_E kleiner ist als der Kehrwert des größten zu bestimmenden $k_L a$. Liegt die Ansprechzeit der Elektrode im Bereich des Kehrwerts des größten zu bestimmenden $k_L a$, so muss t_E berücksichtigt werden (Gaddis, 1999). Demnach ergibt sich folgende Gleichung zur Bestimmung des $k_L a$ (Fuchs und Ryu, 1971):

$$\frac{c_{O_2}^* - c_{O_2}(t)}{c_{O_2}^* - c_{O_2}(0)} = \left(\frac{1}{1 - t_E \cdot k_L a} \right) \cdot \left(e^{-t \cdot k_L a} - t_E \cdot k_L a \cdot e^{-\frac{t}{t_E}} \right) \quad (\text{Gleichung 3.22})$$

t_E = Ansprechzeit der Sauerstoffelektrode, s

Abschätzung des $k_L a$ für andere Gase als O_2

Ist eine direkte Messung des $k_L a$ eines Gases nicht möglich, so kann dieser durch Korrelation über den $k_L a(O_2)$ ermittelt werden. Der Stoffstrom eines Gases durch die laminare Grenzschicht ist mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschreibbar:

$$k_L a = \frac{D_L}{\delta_L} \cdot \frac{A_g}{V} \quad (\text{Gleichung 3.23})$$

D_L = binärer Diffusionskoeffizient eines Gases in der Flüssigphase, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$

δ_L = Dicke der flüssigseitigen laminaren Grenzschicht, m

Dabei unterscheiden sich Gase, die durch die Grenzschicht diffundieren, lediglich in ihrem Diffusionskoeffizienten. Das Flüssigvolumen V , die Phasengrenzfläche A_g zwischen Gas und Flüssigkeit, sowie die Dicke der laminaren Grenzschicht δ_L bleiben dagegen gleich. Ist der $k_L a$

eines Gases bekannt, so können die $k_L a$ anderer Gase mit Hilfe der entsprechenden binären Diffusionskoeffizienten berechnet werden (Löser *et al.*, 2005).

$$k_L a(\text{H}_2) = k_L a(\text{O}_2) \cdot \frac{D_{\text{H}_2,\text{L}}}{D_{\text{O}_2,\text{L}}} \quad (\text{Gleichung 3.24})$$

Nach der Filmtheorie ist der Stoffübergangskoeffizient k_L proportional zu D_L . Kodama *et al.* (1976) haben in Untersuchungen zum $k_L a$ für Wasserstoff beschrieben, dass experimentell ermittelte Werte für $k_L a(\text{H}_2)$ gut mit Werten übereinstimmen, die unter der Annahme der Theorie der Penetration oder Oberflächenerneuerung abgeschätzt wurden. Im Gegensatz zum Filmmodell liegt diesen beiden Theorien die Annahme zugrunde, dass der flüssigseitige Stoffübergangskoeffizient proportional ist zur Wurzel des Diffusionskoeffizienten D_L . Nach Chisti (2010) ist der Unterschied dieser beiden Korrelationen jedoch gering. Diese in der Literatur gemachte Beobachtung für Wasserstoff wird für die Umrechnungen im Rahmen dieser Arbeit übernommen:

$$k_L a(\text{H}_2) = k_L a(\text{O}_2) \cdot \sqrt{\frac{D_{\text{H}_2,\text{L}}}{D_{\text{O}_2,\text{L}}}} \quad (\text{Gleichung 3.25})$$

Abschätzung von Diffusionskoeffizienten

Kodama *et al.* (1976) zeigten außerdem, dass experimentell gewonnene $k_L a(\text{H}_2)$ besser zu geschätzten $k_L a(\text{H}_2)$ passen, die mit Diffusionskoeffizienten gewonnen wurden, die empirisch über die Wilke-Chang Korrelation abgeschätzt wurden. Diese Erkenntnis wurde für die Abschätzung von Diffusionskoeffizienten in dieser Arbeit angewandt.

Diffusionskoeffizienten von Gasen in Flüssigkeiten werden häufig über die empirische Wilke-Chang Korrelation nach Gleichung 3.26 abgeschätzt, die auf der Gleichung von Stokes-Einstein basiert (Wilke und Chang, 1955).

$$D_{12}^* = 7,4 \cdot 10^{-12} \cdot \frac{\sqrt{\phi_2 \cdot \bar{M}_2 \cdot T}}{\eta_2 \cdot \bar{V}_M^{0,6}} \quad (\text{Gleichung 3.26})$$

D_{12}^* = geschätzter binärer Diffusionskoeffizient
des gelösten Gases 1 in Lösemittel 2, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$

ϕ_2 = Assoziationsparameter, -

\bar{M}_2 = Molekulargewicht des Lösemittels 2, kg kmol^{-1}

T = Temperatur, K

η_2 = dynamische Viskosität des Lösemittels 2, cP

\bar{V}_M = molares Volumen des gelösten Gases 1 beim Siedepunkt von
 $p = 1,013 \text{ bar}$, $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Für das Lösungsmittel Wasser mit einem Molekulargewicht von $18,01528 \text{ kg kmol}^{-1}$ beträgt der Wert des empirischen Assoziationsparameters $\phi_2 = 2,6$. Die dynamische Viskosität von Wasser bei einer Temperatur von 30 °C beträgt $797,68 \cdot 10^{-6} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $797,68 \cdot 10^{-3} \text{ cP}$. Für die molaren Volumina bei normalem Siedepunkt werden zur Berechnung $14,3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ für Wasserstoff und $25,6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ für Sauerstoff eingesetzt.

Die Abschätzung von Diffusionskoeffizienten in verdünnten Lösungen nach Korrelation aus Gleichung 3.26 ist für die meisten technischen Fragestellungen mit einem mittleren Fehler von 10 % ausreichend (Wilke und Chang, 1955).

Die abgeschätzten binären Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid in Wasser sind in Tabelle 3.4 aufgeführt im Vergleich zu Messdaten aus der Literatur.

Tabelle 3.4: Diffusionskoeffizienten für O_2 , H_2 und CO_2 in Wasser bei 30 °C (über Wilke-Chang Korrelation abgeschätzt) im Vergleich zu Literaturwerten bei 25 °C .

Gas	$D_i^*, \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$D_i, \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Literatur
O_2	$2,7506 \cdot 10^{-9} (30 \text{ °C})$	$2,10 \cdot 10^{-9} (25 \text{ °C})$	Cussler, 2007
H_2	$3,9009 \cdot 10^{-9} (30 \text{ °C})$	$4,50 \cdot 10^{-9} (25 \text{ °C})$	Cussler, 2007
CO_2	$2,3200 \cdot 10^{-9} (30 \text{ °C})$	$1,92 \cdot 10^{-9} (25 \text{ °C})$	Cussler, 2007

Bestimmung von Gelöstkonzentrationen von Gasen über das Henry-Gesetz

Die Gelöstkonzentration von Gasen kann mit Hilfe des Partialdrucks und der Henrykonstante des Gases über das Henry-Gesetz in Gleichung 3.27 abgeschätzt werden.

$$c_i = K_{H,i} \cdot p_i \quad (\text{Gleichung 3.27})$$

p_i = Partialdruck eines Gases i, bar

$K_{H,i}$ = Henrykonstante des Gases i, $\text{mol L}^{-1} \text{ bar}^{-1}$

Der Partialdruck eines Gases kann unter der Annahme idealer Gase über den Anteil des Gases im Gasstrom und den Gesamtdruck über das Dalton-Gesetz berechnet werden.

$$p_i = \chi_i \cdot p \quad (\text{Gleichung 3.28})$$

p = Gesamtdruck, bar

χ_i = Anteil des Gases i, -

Einflussgrößen auf die Henry-Konstante

Die Henry-Konstante ist ein Maß für die Gasaufnahmefähigkeit einer Flüssigkeit. Da diese Konstante abhängig ist von der Temperatur, wird sie auch als Henry-Koeffizient bezeichnet. Die Anwesenheit von gelösten Salzen, organischen Säuren und Zuckern in Fermentationsmedien hat eine signifikante Auswirkung auf die Löslichkeit von Gasen. Dabei unterscheidet man den Kosolvent-Effekt und den Aussalz-Effekt. Der Kosolvent-Effekt bewirkt eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit eines Gases in Anwesenheit von organischen Lösemitteln. Die Anwesenheit von Salzen und Zuckern im Medium reduziert die Gasaufnahmefähigkeit einer Lösung, was zum sogenannten Aussalz-Effekt führt.

Die Abhängigkeit der Henry-Konstante von der Temperatur wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$K_H = K_{H,0} \cdot e^{\left(B \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right)} \quad (\text{Gleichung 3.29})$$

B = Temperaturkorrekturfaktor, K

$K_{H,0}$ = Henrykonstante bei Normtemperatur (298,15 K), mol L⁻¹ bar⁻¹

Der Temperaturkorrekturfaktor B steht dabei für den Quotienten der Lösungsenthalpie $\Delta_{\text{solv}}H$ und der allgemeinen Gaskonstante R. Der Faktor B hat für H₂ und CO₂ jeweils die Werte 490 K und 2400 K (Wilhelm *et al.*, 1977). In wässriger Lösung bei einer Temperatur von 30 °C betragen die Henrykonstanten somit für Wasserstoff 0,7494·10⁻³ mmol L⁻¹ bar⁻¹ und für Kohlenstoffdioxid 0,2939·10⁻¹ mmol L⁻¹ bar⁻¹.

Die Anwesenheit von Elektrolyten und auch der meisten Nicht-Elektrolyten verringern die Gaslöslichkeit in Wasser, was zum sogenannten Aussalz-Effekt führt. Dieser Effekt nimmt mit steigender Ionenkonzentration (Ionenstärke) in der Lösung zu. Der Einfluss von Salzen im Medium kann dabei über Gleichung 3.30 nach Sechenov beschrieben werden (Schumpe, 1993):

$$\log \left(\frac{c_{G,0}}{c_G} \right) = K^S \cdot c_S \quad (\text{Gleichung 3.30})$$

$c_{G,0}$ = Gaskonzentration in reinem Wasser, mol L⁻¹

c_G = Gaskonzentration in der Salzlösung, mol L⁻¹

K^S = Sechenov-Konstante, L mol⁻¹

c_S = Konzentration des Salzes, mol L⁻¹

Die Sechenov-Konstante K^S ist sowohl spezifisch für das Gas als auch für das Salz und zeigt eine Abhängigkeit von der Temperatur. Um die Werte der Gaslöslichkeit in Wasser für die

Effekte verschiedener Kationen und Anionen zu korrigieren, kann diese Konstante über empirische Modelle abgeschätzt werden.

$$\log \left(\frac{c_{G,0}}{c_G} \right) = \sum (h_i + h_G) \cdot c_i \quad (\text{Gleichung 3.31})$$

h_i = ionen-spezifischer Parameter, $L \text{ mol}^{-1}$

h_G = gas-spezifischer Parameter, $L \text{ mol}^{-1}$

c_s = Konzentration des Ions i , mol L^{-1}

Die Temperaturabhängigkeit der Sechenov-Konstanten wurde in folgender Gleichung berücksichtigt:

$$h_G = h_{G,0} + h_T \cdot (T - 298,15K) \quad (\text{Gleichung 3.32})$$

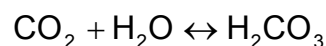
$h_{G,0}$ = gas-spezifischer Parameter bei 298,15 K, $L \text{ mol}^{-1}$

h_T = gas-spezifischer Parameter (Temperatureffekt), $L \text{ mol}^{-1} K^{-1}$

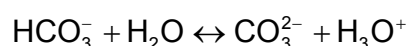
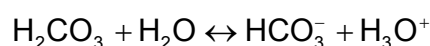
In der Literatur sind die h_i -Parameter für verschiedene Kationen und Anionen und die h_G -Parameter für diverse Gase bei einer Referenztemperatur von 298,15 K tabelliert (Weisenberger und Schumpe, 1996). Aufgrund des Einfluss der Ionenstärke kann die Gaslöslichkeit in einem typischen Fermentationsmedium zwischen 5 und 25 % niedriger sein als in reinem Wasser (Doran, 2006).

Kohlensäure und Carbonate

Das in der Flüssigphase gelöste Kohlenstoffdioxid steht im Gleichgewicht mit Kohlensäure:



Das Gleichgewicht liegt dabei weitgehend auf der Seite von CO_2 , etwa 99,8 % des gelösten Kohlenstoffdioxids liegen als physikalisch gelöste CO_2 -Moleküle vor. Kohlensäure ist eine mittelstarke Säure, da aber nur wenige CO_2 -Moleküle mit Wasser zu Kohlensäure reagieren, wirkt die Gesamtlösung als schwache Säure (Riedel, 2004). Kohlensäure dissoziiert in Lösung zu Hydrogenkarbonat, was wiederum in einer zweiten Dissoziationsstufe mit Karbonat im Gleichgewicht steht:



Die Dissoziationskonstanten sind dabei definiert als (Werte bei 25 °C):

$$K_{S,1} = 10^{-6,35} \text{ M} = \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{HCO}_3^-)}{c(\text{CO}_2) + c(\text{H}_2\text{CO}_3)} \cong \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{HCO}_3^-)}{c(\text{CO}_2)} \quad (\text{Gleichung 3.33})$$

$$K_{S,2} = 10^{-10,33} \text{ M} = \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{CO}_3^{2-})}{c(\text{HCO}_3^-)} \quad (\text{Gleichung 3.34})$$

Der Anteil der Kohlensäureformen ist dabei abhängig vom pH, was in Abbildung 3.12 graphisch dargestellt ist.

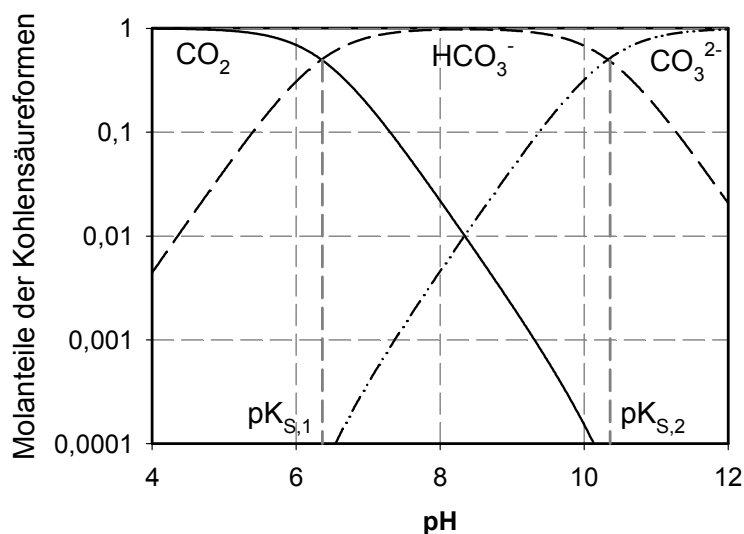


Abbildung 3.12: Kohlensäureformen als Funktion des pH ($pK_{S,1} = 6,35$, $pK_{S,2} = 10,33$ bei $T = 25 \text{ °C}$; Lide, 2007).

Per Definition ist die pH der negative dekadische Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ -Ionen in Wasser:

$$\text{pH} = -\log(c(\text{H}_3\text{O}^+)) \quad (\text{Gleichung 3.35})$$

Durch Umformung von Gleichung 3.33 kann bei thermodynamischem Gleichgewicht die Konzentration an Hydrogencarbonat HCO_3^- in der Lösung berechnet werden.

$$c(\text{HCO}_3^-) = \frac{K_{S,1} \cdot c(\text{CO}_2)}{10^{-\text{pH}}} \quad (\text{Gleichung 3.36})$$

3.5 Leistungseintrag

Durch die Drehbewegung des Rührorgans erfolgt ein mechanischer Leistungseintrag bei Kultivierungen im Rührkesselreaktor. Der Leistungseintrag kann über die Leistungs- oder Newton-Zahl (Ne) dimensionslos über folgende Gleichung beschrieben werden.

$$P = Ne \cdot \delta \cdot n^3 \cdot d^5 \quad (\text{Gleichung 3.37})$$

P	= mechanischer Leistungseintrag, W
δ	= Dichte, kg m ⁻³
n	= Rührerdrehzahl, min ⁻¹
d	= Durchmesser des Rührers, m

Im Bereich turbulenter Strömung ist die Newton-Zahl im bewehrten Rührkesselreaktor konstant und nur vom eingesetzten Rührorgan und der Reaktorgeometrie abhängig (Zlokarnik, 1999). Laut Zhou und Kresta (1996) wurde für den eingesetzten 6-Blatt-Scheibenrührer ("*Rushton*"-Turbine) eine Newton-Zahl von 5,4 im Rührkessel mit Strömungsbrechern ermittelt.

Der mechanische Leistungseintrag in begasten Rührkesselreaktoren ist zudem abhängig vom Gasgehalt der Flüssigphase. Mit steigendem Gasvolumenstrom sinkt der mechanische Leistungseintrag. Das Verhältnis des zugeführten Gases zur Rührerdrehzahl wird wiedergegeben durch die dimensionslose Begasungszahl Q.

$$Q = \frac{V_G}{n \cdot d^3} \quad (\text{Gleichung 3.38})$$

V_G	= zugeführter Gasvolumenstrom, L min ⁻¹
-------	--

Der Gaseintrag in das Reaktionsmedium führt zu einem Abfall der Newton-Zahl, der für 6-Blatt-Scheibenrührer durch folgende Gleichung beschrieben werden kann (Zlokarnik, 1973):

$$Ne = 1,5 + (0,5 \cdot Q^{0,0075} + 1600 \cdot Q^{2,6})^{-1} \quad (\text{Gleichung 3.39})$$

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel soll auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen werden. Eine Liste der eingesetzten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien ist im Anhang (Kapitel 12) zu finden.

4.1 *Acetobacterium woodii* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Großteil der Kultivierungen mit dem Wildtyp-Stamm *Acetobacterium woodii* DSM 1030 durchgeführt, der von Prof. Dürre der Universität Ulm zur Verfügung gestellt wurde.

Im Laufe dieses Projekts wurde der eingesetzte Bakterienstamm beim Kooperationspartner, der Universität Ulm (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie) im Rahmen der Doktorarbeit von Melanie Straub genetisch verändert. Durch gemeinsame Hochregulation von Enzymen des Acetyl-CoA-Wegs sollte der Kohlenstofffluss durch diesen Stoffwechselweg und somit die Acetatbildungsrate erhöht werden. Dabei wurden folgende zwei Strategien verfolgt:

- Überexpression der vier THF(= Tetrahydrofolat)-abhängigen Enzyme Formyl-THF-Synthetase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase, Methylen-THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase des Methylzweigs des Acetyl-CoA-Wegs
- Überexpression der Phosphotransacetylase und der Acetatkinase des Acetyl-CoA-Wegs

Die Genomsequenz von *A. woodii* war zwar schon sequenziert (Schmidt, 2011), stand zum Zeitpunkt der Arbeiten öffentlich aber noch nicht zur Verfügung. Daher wurden für die Hochregulation der genannten Enzyme die Gensequenzen aus einem anderen acetogenen Organismus, *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 entnommen, dessen Genomsequenz veröffentlicht wurde (Köpke *et al.*, 2010). Dazu wurden die Sequenzen auf dem Plasmid pJIR750 in *A. woodii* transformiert, das als Markergen eine Resistenz gegenüber Thiamphenicol besitzt. Als Kontrollstamm diente *A. woodii* transformiert mit dem Leerplasmid pJIR750. Die eingesetzten Stämme sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Auflistung der rekombinanten *A. woodii* Stämme.

Stammbezeichnung	Attribute
pJIR750	Kontrollstamm mit Leerplasmid
pJIR750_THF	Überexpression der vier THF-abhängigen Enzyme Formyl-THF-Synthetase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase, Methylen-THF-Dehydrogenase und Methylen-THF-Reduktase aus <i>C. ljungdahlii</i>
pJIR750_pta-ack	Überexpression der Phosphotransacetylase (pta) und Acetatkinase (ack) aus <i>C. ljungdahlii</i>

4.2 Medien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Medien für die Kultivierung von *A. woodii* eingesetzt.

DSMZ 135

Das Medium DSMZ 135 wurde von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen für die Kultivierung von *A. woodii* vorgeschlagen. Die Herstellung und die Zusammensetzung des Mediums sind im Anhang in Kapitel 13.2 aufgeführt. Alle in Zusammenhang mit der Kultivierung des strikt anaeroben Bakteriums *A. woodii* verwendeten Medien und Medienzusätze wurden vor dem Einsatz anaerobisiert und sterilisiert. Die Vorlage von L-Cystein und Natriumsulfid als Reduktionsmittel im Medium diente zudem zur Schaffung einer geeigneten anaeroben Atmosphäre durch Bindung verbliebener Spuren von Sauerstoff und Absenkung des Redoxpotentials (Fuchs und Schlegel, 2007). Zur Überprüfung der Abwesenheit von Sauerstoff konnte der Redoxfarbstoff Resazurin in der Konzentration 1 mg L^{-1} zum Medium gegeben werden. Ist molekularer Sauerstoff vorhanden, so besitzt das Medium eine rosa Färbung, ansonsten bleibt das Medium farblos. Dieser Indikator wurde jedoch nicht standardmäßig eingesetzt.

DSMZ 135H

Das Medium DSMZ 135H ist eine abgewandelte Form des Mediums DSMZ 135. Um ein reichhaltigeres Medium für autotrophe Kultivierungen im Laborrührkesselreaktor zu erhalten, wurden die Konzentrationen an Hefeextrakt, Vitaminen und Spurenelementen im Vergleich zum ursprünglichen Medium verdoppelt.

DSMZ 135HF

Für eine ausreichende Versorgung der Bakterienzellen mit Eisen(II)-Ionen wurde 25 mg L^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ zum Medium DSMZ 135H gegeben. In dieser Arbeit wird dieses Medium als DSMZ 135HF bezeichnet.

Als Kohlenstoffquelle wurde medienunabhängig Fructose in der Konzentration 10 g L^{-1} standardmäßig eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde bei der Kultivierung von gentechnisch veränderten *A. woodii* Stämmen das Antibiotikum Thiamphenicol in der Konzentration 20 mg L^{-1} eingesetzt.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde mittels Einstrahlspektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Biomassekonzentration ist linear zur gemessenen OD und kann über Gleichung 4.1 über einen Korrelationsfaktor berechnet werden.

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

c_x = Biomassekonzentration, g L^{-1}

f_x = Korrelationsfaktor, g L^{-1}

OD = Optische Dichte bei 600 nm, -

Zur Ermittlung des Korrelationsfaktors wurden 1,5 mL Zellsuspension in ein ausgewogenes Reaktionsgefäß überführt, bei 13.000 min^{-1} für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend für mindestens 48 Stunden bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und ausgewogen. Der Korrelationsfaktor für den Wildtyp-Stamm von *A. woodii* wurde ermittelt zu $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

4.3.2 Analytik des Kulturüberstandes mittels HPLC

Die Bestimmung des Substratverbrauchs an Fructose, die Bildung der Produkte Acetat und Formiat und der Verbrauch und die Bildung von Aminosäuren im Kulturüberstand wurde mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) durchgeführt. Dazu wurden Proben aus Kultivierungen gefiltert (RC-Filter, Porengröße: 0,22 µm), über HPLC gemessen und die Konzentrationen über externe Kalibrierungen bestimmt. Die Analyse der Aminosäuren wurde nur in ausgewählten Fermentationsproben durchgeführt.

Die Details zur Messmethode und die Gerätespezifikationen sind im Anhang in Kapitel 13.3 aufgeführt.

4.3.3 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte photometrisch bei 340 nm mit einem enzymatischen Test (Ammoniak UV Test, Nr. 11 112 732 035, R-Biopharm) nach Angaben des Herstellers. Die eingesetzten Volumina wurden für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert. Die genaue Durchführung des Tests ist in Kapitel 13.4 im Anhang beschrieben.

4.4 Kultivierung von *Acetobacterium woodii*

Acetobacterium woodii zählt zu den strikt anaeroben Mikroorganismen, daher wurden alle Arbeitsschritte unter Einhaltung strikt anaerober Bedingungen mittels spezieller Anaerob-techniken durchgeführt, die von Hungate und Macy (1973) entwickelt wurden. Dies beinhaltete die Medienherstellung, Ernte der Vorkultur und Vorbereitung des Inokulums für Kultivierungsversuche. Dazu kam eine Anaerobwerkbank aus flexibler Polyvinylchlorid-Folie zum Einsatz, die in Abbildung 4.1 dargestellt ist. Die Stickstoff-Atmosphäre im Inneren der Anaerobwerkbank ermöglicht das Arbeiten mit strikt anaeroben Mikroorganismen. Eindringende Sauerstoffmoleküle wurden durch konstante Umwälzung der Gasatmosphäre über Palladium-Katalysatoren in Anwesenheit geringer Konzentrationen an Wasserstoff im Gas (< 5 %) entfernt. Die dabei entstehende Luftfeuchte wurde durch Trockenmittel gebunden. Zur Überwachung der Gasatmosphäre innerhalb der Werkbank diente ein Gasmessgerät für O₂ und H₂ im ppm-Bereich. Keimfreie Bedingungen wurde durch eine HEPA-Filtereinheit geschaffen (Speers *et al.*, 2009). Ebenso wurden alle im Folgenden beschriebene Kultivierungen in Septumflaschen und Laborrührkesselreaktoren unter sauerstofffreier Atmosphäre durchgeführt.

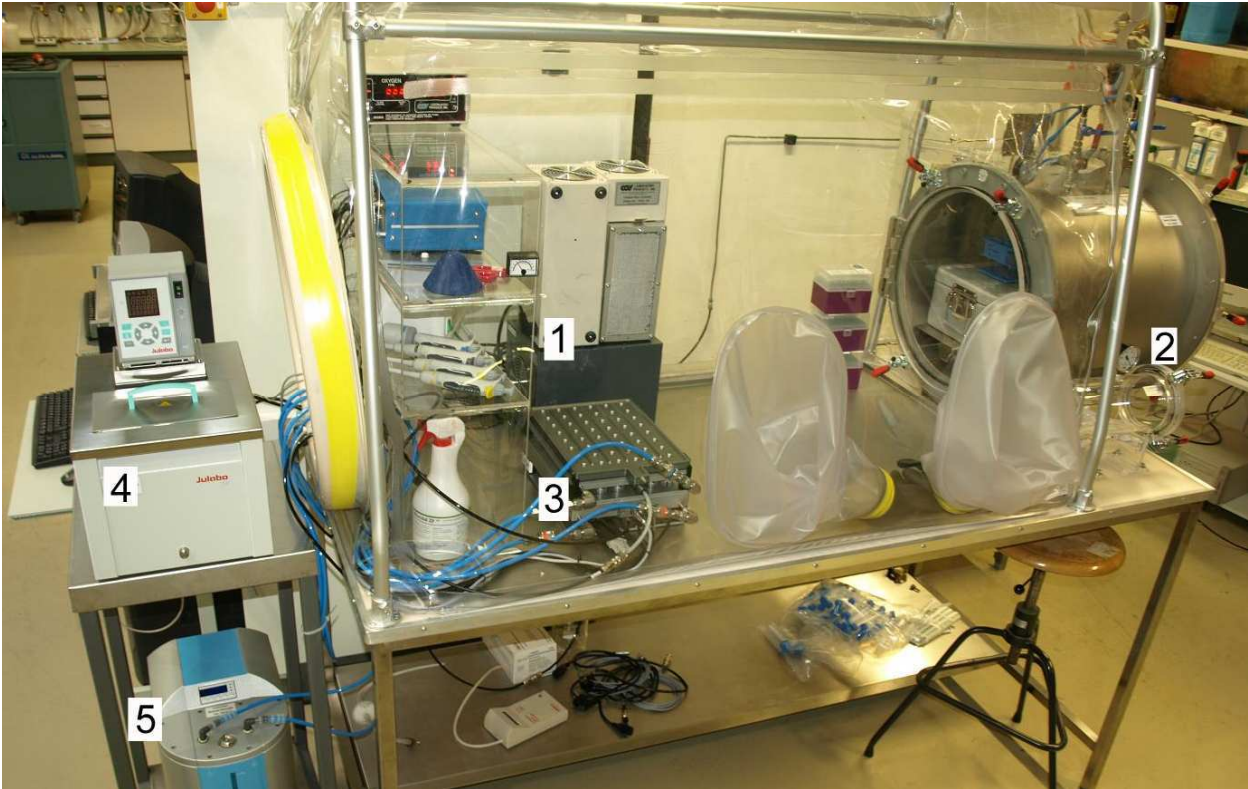


Abbildung 4.1: Anaerobwerkbank mit integriertem 48-fach Parallelrührkesselreaktorsystem im Milliliter-Maßstab;

(1) Gebläse mit Palladium-Katalysatoren/HEPA-Filtereinheit, (2) große und kleine Rundschleuse, (3) 48-fach Parallelrührkesselreaktorsystem für die autotrophe Kultivierung von strikt anaeroben Mikroorganismen, (4) Thermostat für die Temperierung des Reaktionsmediums, (5) Kühlelement für die Kühlung des Kopfraums des Parallelrührkesselreaktorsystems.

4.4.1 Stammhaltung

Kulturen von *A. woodii* wurden permanent in Flüssigkultur bei 30 °C in Hungate-Kulturröhrchen gehalten. Die Stammhaltung erfolgte alle drei bis vier Tage durch 10 %-iges Überimpfen in frisches Medium. Gefrierkulturen wurden hergestellt durch Abzentrifugation einer exponentiell wachsenden Kultur (50 mL) und Aufnahme des Pellets in 1 mL Saccharoselösung (120 g L⁻¹). Gelagert wurden die Gefrierkulturen bei -80 °C. Eine Wiederanzucht von Gefrierkulturen erfolgte durch Zugabe von 5 mL angewärmtem Medium und Anfertigen einer Verdünnungsreihe der Kultur.

4.4.2 Kultivierung in Septumflaschen

Kultivierungen in Septumflaschen wurden für die Anzucht von Vorkulturen für Kultivierungen in Laborrührkesselreaktoren und für Vorversuche unter hetero- und autotrophen Bedingungen verwendet. Dazu wurden Septumflaschen unter anaerober Atmosphäre mit sauerstofffreiem

Medium befüllt und sterilisiert. Als Kohlenstoffquelle für heterotrophe Versuche und die Vorkulturherstellung wurden standardmäßig 10 g L^{-1} Fructose verwendet.

Die Herstellung von Vorkulturen erfolgte mehrstufig durch 10 %-iges Überimpfen einer Kultur in der späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase mit Hilfe von Einwegspritzen, so dass für die jeweiligen Versuche ausreichend Inokulum zur Verfügung stand. Die Vorkulturen wurden nach etwa 24 Stunden durch anaerobe Zentrifugation (4500 g, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min) vom Medium getrennt und das Pellet im gewünschten Volumen an frischem Medium resuspendiert. Das Überimpfen der Kulturen in die jeweiligen Systeme erfolgte anaerob mit Hilfe von Einwegspritzen.

Vorversuche in Septumflaschen wurden in 1 L-Septumflaschen mit einem Füllvolumen von 200 mL durchgeführt. Für heterotrophe Wachstumsversuche wurde 10 g L^{-1} Fructose eingesetzt. Für autotrophe Wachstumsversuche wurde die Gasatmosphäre in der Flasche steril ausgetauscht gegen die jeweilige Substratgasmischung und diese mit einem Überdruck von etwa 1 bar beaufschlagt. Wachstumsversuche in Septumflaschen wurden mit einer Biomassekonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ gestartet.

4.4.3 Parallele Satzkultivierung im Millilitermaßstab

Vorversuche für die Kultivierung im Litermaßstab wurden in einem System aus 48-fach parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab durchgeführt, das am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelt wurde. Dieses System wurde einerseits dazu verwendet, um Einflüsse variierender Konzentration einzelner Medienbestandteile auf das Wachstum und die Produktbildung zu ermitteln und andererseits um unterschiedliche Bakterienstämme vergleichend zu kultivieren.

48-fach System aus parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab

Im Bioreaktorblock sind 48 Einweg-Bioreaktoren aus Polystyrol mit einem Arbeitsvolumen von 8 - 16 mL angeordnet in acht Reihen mit jeweils sechs Reaktoren, die parallel betrieben werden können (Abbildung 4.2). Auf den Bioreaktorblock sitzt eine autoklavierbare Sterilgasabdeckung, die 48 auf Hohlachsen gelagerte Rührorgane enthält, die über ein zentrales Antriebssystem innerhalb des Reaktorblock magnetisch-induktiven mit einer Geschwindigkeit von $500 - 3000 \text{ min}^{-1}$ angetrieben werden. Über das gas-induzierende Rührorgan wird bei ausreichend hoher Drehgeschwindigkeit ($\sim 1700 - 1800 \text{ min}^{-1}$) Gas über die Hohlachse aus dem Kopfraum des Reaktors angesaugt und fein im Medium dispergiert. Dabei können k_{La} für $\text{O}_2 > 0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht werden (Puskeiler *et al.*, 2005). Über die Sterilgasabdeckung wird zum einen die Gasversorgung der Reaktoren realisiert, indem steriles Prozessgas über eine zentrale

Gaszufuhr in den Kopfraum der Reaktoren geleitet wird. Zum anderen wird durch Ausströmen des sterilen Prozessgases über Bohrungen zur Probenahme im Deckel die Sterilität im System aufrechterhalten. Der Bioreaktorblock ist mit zwei Wärmetauschern versehen, die über externe Geräte betrieben werden. Unterhalb der Sterilgasabdeckung befindet sich eine Kühleinrichtung, über die durch Abkühlung des Kopfraums Feuchtigkeit kondensiert und somit die Verdunstung des Reaktionsmediums vermindert wird. Im unteren Teil des Blocks wird über einen zweiten Wärmetauscher das Reaktionsmedium temperiert. Außerdem ist der Reaktorblock ausgestattet mit einem System zur Rührerausfallerkennung mit Hilfe von Hall-Sensoren.

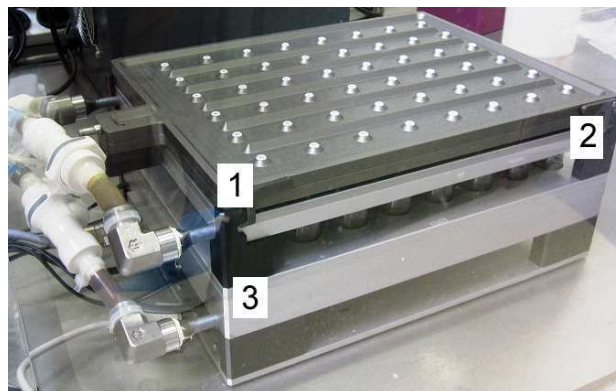


Abbildung 4.2: 48-fach Parallelrührkesselreaktorsystem;

(1) Reaktordeckel mit 48 gas-induzierenden Rührorganen auf Hohlachsen, (2) Kopfraumkühlung zur Reduktion der Verdunstung, (3) Wärmetauscher zur Temperierung des Mediums.

Parallelsystem für die hetero- und autotrophe Kultivierung von strikt anaeroben Mikroorganismen unter kontrollierter Gasatmosphäre

Für die Kultivierung von strikt anaeroben Bakterien wurde dieses Parallelsystem unter kontrollierter Gasatmosphäre in der in Abbildung 4.1 gezeigten Anaerobwerbank installiert. Das Bioreaktorsystem ist über gasdichte Durchführungen mit den Peripheriegeräten außerhalb der Werkbank verbunden. Für die Temperierung des Reaktionsmediums sorgt ein Umwälzthermostat und für die Kühlung des Kopfraums ein Durchlaufkühlelement. Begast wird das Parallelsystem über eine Gasmischstation mit einer individuell einstellbaren Gasmischung aus Stickstoff, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Das Abgas aus den Reaktoren wurde über eine 48-fache Absaugvorrichtung, die auf dem Reaktordeckel liegt, über eine Vakuumpumpe direkt der Sonderabluft außerhalb der Werkbank zugeführt. Um das Gasvolumen in der Anaerobwerbank nicht zu verändern, wurde das abgesaugte Gasvolumen über ein Nadelventil in der Absaugleitung gleich dem Volumen des über die Gasmischstation zugeführten Gases eingestellt.

Kultivierung im Parallelreaktorsystem

Die Kultivierungen erfolgten mit einem Startvolumen von 12 mL, einer Kultivierungstemperatur von 30 °C, einer Temperatur von 4 °C für die Kühlung des Kopfraums und einer Rührerdrehzahl von 2800 min⁻¹. Die Begasung des Kopfraums erfolgte mit einer Rate von 48 L h⁻¹, was einer Begasungsrate von 1 L h⁻¹ pro Reaktor entspricht. Bei autotrophen Wachstumsversuchen wurde das System mit einer Mischung aus 80 % Wasserstoff und 20 % Kohlenstoffdioxid begast, bei Versuchen auf 10 g L⁻¹ Fructose wurde rein mit Stickstoff begast. Da die Acetatbildung von *A. woodii* laut Buschhorn *et al.* (1989) abhängig ist von Kohlenstoffdioxid/Bicarbonat im Medium, wurden die Wachstumsversuche auf organischen Kohlenstoffquellen mit einem Anteil von 20 % Kohlenstoffdioxid im Medium durchgeführt, um den Bicarbonat-Puffer im Medium aufrechtzuerhalten. Da das Parallelrührkesselreaktorsystem für die Kultivierung von strikt anaeroben Mikroorganismen in einer Anaerobwerkbank unter kontrollierter Gasatmosphäre installiert wurde, sind in diesem System nur pH-unkontrollierte Kultivierungen möglich.

Vor Start des Versuchs wurden die Medien mit der Prozessgasmischung für etwa 0,5 - 1 h begast zur Ausbildung des Kohlensäuregleichgewichts und der pH mit Schwefelsäure (10 %) eingestellt. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wurde Polypropylenglykol (PPG) in der Konzentration 10 µL L⁻¹ zum Medium gegeben. Alle Kultivierungen wurden mit einer Biomassekonzentration von 0,1 g L⁻¹ gestartet und liefen für 48 Stunden. Nach Versuchsende wurde die Optische Dichte in den einzelnen Reaktoren bestimmt und Proben genommen zur Bestimmung der Konzentration der Metabolite mittels HPLC. Außerdem wurden die Reaktoren bei Versuchsende gewogen zur Bestimmung des verdunsteten Wassers. Die ermittelten Werte für die Biomassekonzentration und die gebildeten Metabolite wurden anschließend anhand des verdunsteten Volumens korrigiert. Im Parallelansatz wurde immer mindestens im Dreifachansatz gearbeitet.

4.4.4 Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab

Für anaerobe Kultivierungen im Satzverfahren im Litermaßstab wurde ein Labor-Rührkesselreaktor (Labfors, Infors GmbH) verwendet mit einem Nominalvolumen von 2 L. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.3 zu sehen, die Gerätespezifikationen sind im Anhang in Tabelle 13.20 aufgeführt.

Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Der Rührkesselreaktor war ausgestattet mit Sonden zur Messung von pH und Temperatur, sowie einem Probenahmesystem zur schnellen Probenahme ohne Totvolumen und wurde über einen Doppelmantel im Glasgefäß temperiert. Außerdem befand sich eine Drucksonde im Reaktordeckel, über die ein Druckhalteventil in der Abgasleitung gesteuert wurde und der Rührkesselreaktor mit einem Überdruck von 0,8 bar betrieben werden konnte. Die Begasung des Reaktors erfolgte über eine Gasmischstation, wobei manuell Gasgemische aus Stickstoff, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid eingestellt werden konnten. Die Gasmischung wurde mit einer Rate von 30 L h^{-1} über ein Tauchrohr steril in den Reaktor eingeleitet und durch zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen) im Medium dispergiert, die im Abstand von 1,5 und 7,0 cm vom unter Ende der Welle angebracht waren. Die Partialdrücke der einzelnen Gase am Eingang des Reaktors wurden durch Variation der Gaszusammensetzung und des Drucks im System eingestellt. Die Temperatur des Mediums betrug $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Rührerdrehzahl wurde zwischen 400 und 1500 min^{-1} variiert. Für die optimale Durchmischung des Reaktionsmediums war der Reaktor mit drei Strömungsbrechern ausgestattet. Zur Minimierung der Verdunstung des Reaktionsmediums verließ das Abgas den Reaktor über einem Rückflusskondensator, der auf eine Temperatur von $14 - 16 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt wurde. Die Konzentration an Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid im Abgas wurde für ausgewählte Versuche über einen Mikro-Gaschromatographen bestimmt, was im Anhang in Kapitel 13.5 beschrieben ist. Über die Messung des Abgasvolumenstroms mit einem Durchflussmessgerät konnten die Verbrauchsraten der einzelnen Gase durch die Mikroorganismen ermittelt werden. Um die Messgeräte im Abgasstrom des Reaktors vor kleinen Partikeln und evtl. aus dem Reaktor austretendem Schaum zu schützen, befand sich ein Sterilfilter mit einer Porengröße von $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ und eine 2 Liter-Schaumfalle in der Abgasleitung.

Kultivierung im Laborrührkesselreaktor

Der Rührkesselreaktor wurde zum Schutz vor schwefelhaltigen Verbindungen im Medium separat autoklaviert. Vor Versuchsbeginn wurde der sterile Glasreaktor über eine Schlauchpumpe mit sterilem anaerobem Medium befüllt und zur Entfernung von Resten von

Sauerstoff mit Stickstoff begast. Zur Lösung der gasförmigen Substrate und Ausbildung des Kohlensäuregleichgewichts im Medium wurde der Reaktor anschließend mit der Prozessgas-mischung für mindestens drei Stunden vor Versuchsbeginn begast und der pH mit Schwefelsäure (10 %) eingestellt. Während der Kultivierung erfolgte eine einseitige Regelung des pH auf 7,0 innerhalb eines Totbandes von 0,05 Einheiten mit Natronlauge (NaOH, 10 mol L⁻¹) als Titrationsmittel. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wurde das Antischaummittel PPG in der Konzentration 100 µL L⁻¹ eingesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (2 mL) entnommen zur Bestimmung der optischen Dichte und der Konzentration der Metabolite mittels HPLC. In ausgewählten Proben wurde zudem die Ammoniumkonzentration ermittelt.

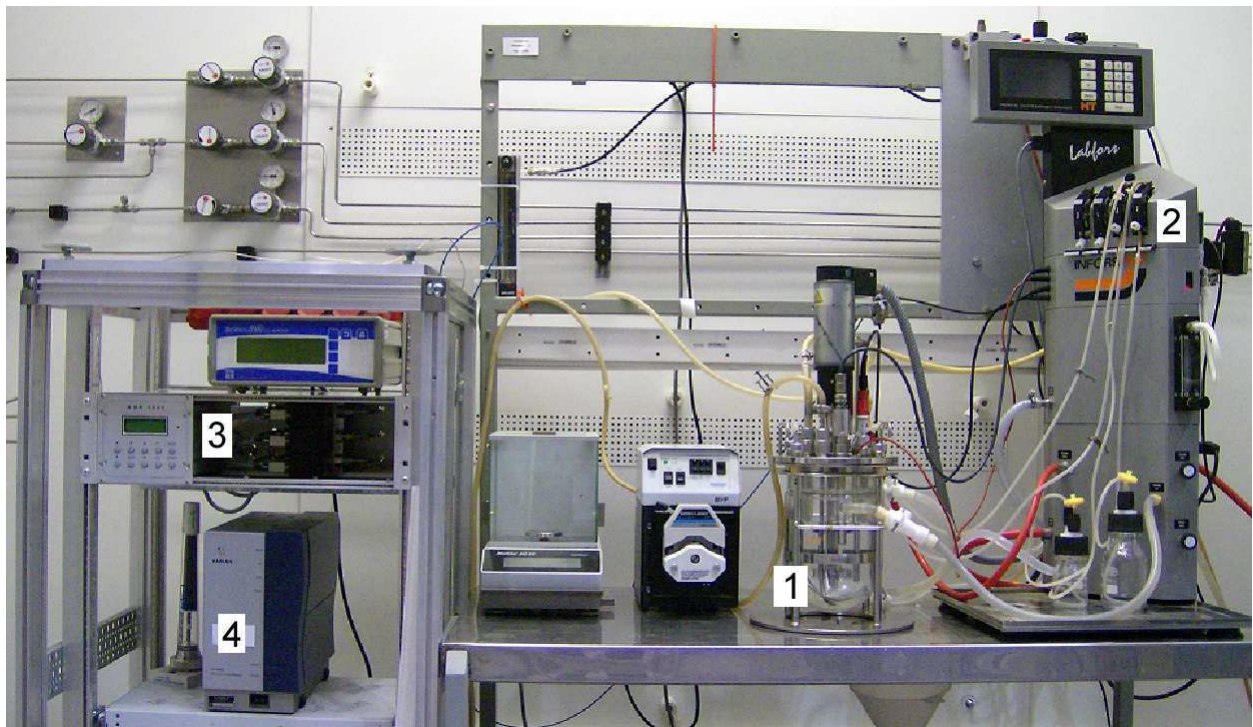


Abbildung 4.3: Versuchsaufbau für Satzexperimente im Laborrührkesselreaktor im Liter-Maßstab.

(1) 2 L-Laborrührkesselreaktor, (2) Steuereinheit, (3) Gasmischstation für N₂, H₂, CO₂, (4) Mikro-Gaschromatograph für die Analyse von H₂ und CO₂ im Reaktorabgas.

4.5 Bestimmung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten

Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_{L,a}$ wurde unter Prozessbedingungen in 1 L Medium ohne Bakterienzellen für verschiedene Kombinationen an Rührerdrehzahl und Begasungsrate ermittelt. Das Medium enthielt alle Bestandteile für eine autotrophe Kultivierung von *A. woodii* außer den schwefelhaltigen Verbindungen L-Cystein und Natriumsulfid, da pO_2 -Elektroden gegenüber diesen Verbindungen sehr empfindlich reagieren (Suresh *et al.*, 2009). Es wurde ebenso das Antischaummittel PPG in der Konzentration $100 \mu\text{L L}^{-1}$ zum Medium gegeben. Die Temperatur des Mediums betrug 30°C und der pH wurde mit Schwefelsäure auf 7,0 eingestellt.

Für die Bestimmung des $k_{L,a}$ kam als dynamische Messmethode die Methode der Stickstoffdesorption zum Einsatz unter Verwendung eines amperometrischen Sauerstoffsensors (Puskeiler, 2004). Die pO_2 -Elektrode wurde vor Versuchsbeginn mindestens 8 Stunden polarisiert und anschließend kalibriert auf 0 und 100 % Sauerstoffsättigung im Medium. Vor Aufnahme einer Aufsättigungskinetik wurde der im Medium gelöste Sauerstoff durch Desorption mit Stickstoff entfernt. Anschließend wurde von Stickstoff auf Begasung mit Luft umgestellt, wobei der Volumenstrom an Druckluft über einen Durchflussregler auf den gewünschten Wert eingestellt wurde.

Die Auswertung der Aufsättigungskurven erfolgte unter Annahme einer ideal durchmischten Gas- und Flüssigphase im Bioreaktor mit Hilfe von Gleichung 3.22. Da die Ansprechzeit der Sauerstoffelektrode im Bereich des Kehrwerts des größten zu messenden $k_{L,a}$ lag, wurde die Ansprechzeit t_E der Elektrode bei der Ermittlung des $k_{L,a}$ berücksichtigt (Gaddis, 1999). Auch berücksichtigt wurde die zeitliche Verzögerung zwischen Stickstoff- und Luftbegasung. Die Umrechnung der ermittelten Werte für $k_{L,a}(O_2)$ für die Gase Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid erfolgte über die Diffusionskoeffizienten aus Tabelle 3.4 über Gleichung 3.25.

Die ermittelten Werte für $k_{L,a}(O_2)$ wurden unter der Annahme der Penetrationstheorie über die Diffusionskoeffizienten der Gase korreliert (Löser *et al.*, 2005). Die Diffusionskoeffizienten der Gase O_2 , H_2 und CO_2 unterscheiden sich je nach Literaturquelle sehr stark. Daher wurden alle verwendeten Diffusionskoeffizienten laut Kodama *et al.* (1976) über die Wilke-Chang-Korrelation für das Lösungsmittel Wasser abgeschätzt. Aufschluss über die tatsächliche Gelöstkonzentration an H_2 und CO_2 könnte die direkte Messung der Gelöstkonzentrationen der autotrophen Kultivierung über geeignete Messsonden geben.

5 Autotrophe Herstellung von Acetat unter definierten Reaktionsbedingungen

Für die reaktionstechnischen Untersuchungen der biologischen Acetatherstellung unter autotrophen Bedingungen wurde der acetogene Mikroorganismus *Acetobacterium woodii* DSM 1030 ausgewählt. Daher wurden die im Folgenden gezeigten Kultivierungen soweit nicht anders beschrieben mit diesem Stamm durchgeführt. Zu Beginn der autotrophen Kultivierungen wurden die verfahrenstechnischen Rahmenbedingungen im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab für einen autotrophen Acetatproduktionsprozess ermittelt. Die hierfür notwendigen Schritte sind im Folgenden beschrieben.

5.1 pH

Der Einfluss des pH auf Wachstum und Produktbildung von *A. woodii* wurde durch Aufzeichnung des pH-Verlaufs während einer autotrophen Kultivierung im Laborrührkesselreaktor ermittelt werden. Als Medium wurde das von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlene Medium DSMZ 135 eingesetzt. Die Temperatur des Mediums betrug 30 °C, was laut Balch *et al.* (1977) die optimale Wachstumstemperatur für diesen Mikroorganismus ist. Die Begasungsrate wurde analog zu vorangegangenen autotrophen Arbeiten mit *Cupriavidus necator* im Laborrührkesselreaktor auf 2 L h⁻¹ eingestellt (Tiemeyer, 2007). Die Partialdrücke der einzelnen Gase in der Gaszufuhr betragen dabei 400 mbar (H₂) und 200 mbar (CO₂). Dies ergibt laut Henry-Gesetz (Gleichung 3.27) eine Sättigungskonzentration von $c^*_{\text{H}_2} = 0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ und $c^*_{\text{CO}_2} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$ in der Flüssigphase. Balch *et al.* (1977) kultivierten *A. woodii* bei einer Rührerdrehzahl von 400 min⁻¹. Diese Drehzahl wurde in den ersten Kultivierungen übernommen. Gestartet wurde die Kultivierung durch Zugabe einer Biomassekonzentration von 0,7 g L⁻¹ aus einer Vorkultur, die auf Fructose als Kohlenstoffquelle angewachsen war.

Der Verlauf der Biomassekonzentration bei der pH-ungeregelten Kultivierung von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen in Abbildung 5.1a zeigt, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen nahezu kein Wachstum stattfand ($\mu_{\text{max}} = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Die integrale Biomassezunahme innerhalb von zwei Tagen betrug 0,1 g L⁻¹ auf eine Konzentration von 0,8 g L⁻¹. Die Biomassekonzentration blieb anschließend bis zu einer Prozesszeit von etwa 7 Tagen konstant und nahm im Folgenden wieder leicht ab. Dabei wurde von Beginn an Acetat kontinuierlich mit einer volumetrischen Rate von 1,2 g L⁻¹ d⁻¹ gebildet, bis nach etwa 7 Tagen eine Konzentration von 7,8 g L⁻¹ im Medium erreicht waren. Der pH im Medium war zu diesem Zeitpunkt von 7,6 auf etwa 6,0 gefallen. Unterhalb von pH 6,0 wurde Acetat nur noch minimal gebildet, so dass bis Versuchsende nach 9 Tagen 8,2 g L⁻¹ Acetat im Medium vorlagen.

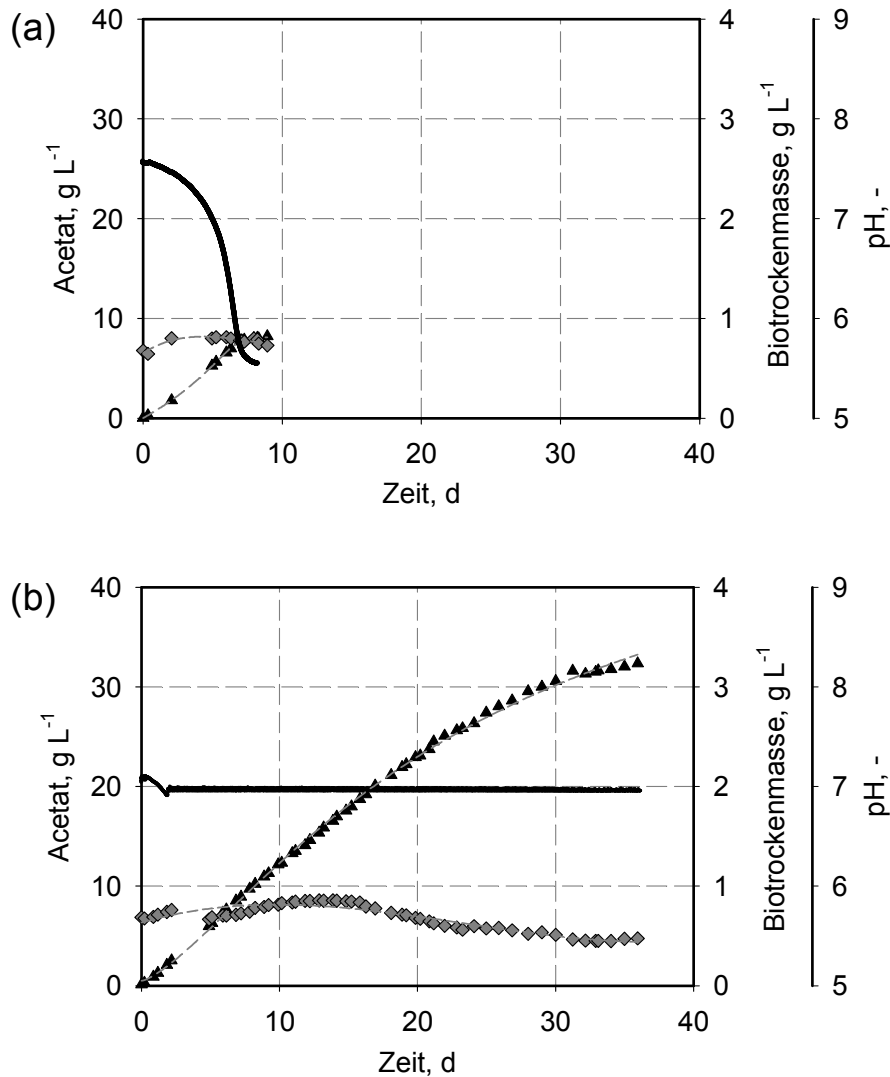


Abbildung 5.1: Verlauf des (—) pH und der Konzentrationen an (◆) Biotrockenmasse und (▲) Acetat bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* (a) ohne und (b) mit Regelung des pH im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (3 mol L^{-1}), $n = 400 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 2 \text{ L h}^{-1}$ ($0,033 \text{ vvm}$), $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$, $p_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Für die pH-geregelte Kultivierung von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen wird zunächst ein pH von 7,0 gewählt. Als Titrationsmittel wurde Natronlauge (3 mol L^{-1}) verwendet.

Der Verlauf der Biomassekonzentration in der pH-geregelten Kultivierung in Abbildung 5.1b verhielt sich in der Anfangsphase ähnlich wie unter pH-ungeregelten Bedingungen, fiel jedoch erst nach fast 17 Tagen langsam wieder bis auf eine Konzentration von $0,4 \text{ g L}^{-1}$ bei Versuchsende nach 35,9 Tagen ab. Acetat wurde unter diesen Bedingungen mit derselben Geschwindigkeit von $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gebildet wie im vorherigen Versuch. Dabei stagnierte die Acetatbildung nicht bei einer Konzentration von 8 g L^{-1} , sondern lief kontinuierlich weiter, bis nach 35,9 Tagen eine Konzentration von $32,4 \text{ g L}^{-1}$ im Medium erreicht war.

Diskussion

Durch Regelung des pH auf pH 7,0 während der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor konnte eine Produktkonzentration von mehr als 32 g L^{-1} nach etwa 36 Tagen erreicht werden im Vergleich zu 8 g L^{-1} ohne Regelung des pH. Balch *et al.* (1977) erreichten durch Kontrolle des pH auf pH 6,7 eine Acetatkonzentration von $10,7 \text{ g L}^{-1}$ nach 5,8 Tagen mit diesem Bakterium. Im Vergleich zu diesen Arbeiten stagnierte die Acetatbildung jedoch nicht bei einer Acetatkonzentration von etwa 10 g L^{-1} , sondern lief weiter bis etwa 30 g L^{-1} Acetat im Medium erreicht waren. Ein ähnlicher Effekt konnte durch Regelung des pH mit dem thermophilen Acetogen *Moorella* sp. HUC22-1 erzielt werden. Bei der autotrophen Kultivierung konnte die erreichte Acetatkonzentration durch Regelung des pH auf pH 6,2 von $3,0 \text{ g L}^{-1}$ auf $20,4 \text{ g L}^{-1}$ erhöht werden (Sakai *et al.*, 2005). Dies zeigt deutlich, dass die Kontrolle des pH für die Erreichung hoher Acetatkonzentrationen von entscheidender Bedeutung ist.

Für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* finden sich in der Literatur pH-Werte zwischen pH 6,7 und pH 7,3 (Balch *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1992), es wurde aber kein pH-Optimum für das autotrophe Wachstum von *A. woodii* angegeben. Anhand der pH-ungeregelten Kultivierung in Abbildung 5.1a lässt sich zwar feststellen, dass die Produktbildungsrate im Bereich von pH 7,5 bis pH 6,0 linear ist, jedoch nicht, ob pH 7,0 für die autotrophe Acetatbildung optimal ist.

Neben der Erreichung hoher Acetatkonzentrationen spielt die Produktbildungsrate bei Produktionsprozessen eine wichtige Rolle. Kommen gasförmige Substrate mit niedriger Löslichkeit in Wasser bei biologischen Produktionsprozessen zum Einsatz so ist eine Limitierung des Stofftransports aus der Gas- in die Flüssigphase sehr wahrscheinlich (Mohammadi *et al.*, 2011). So könnte unter den Bedingungen der gezeigten Experimente eine Limitierung des gasförmigen Substrats Wasserstoff durch die gewählte Rührerdrehzahl und den eingestellten Gasvolumenstroms möglich sein, was in den folgenden Kapiteln untersucht werden soll.

5.2 Wasserstoffpartialdruck

Eine Möglichkeit, die Verfügbarkeit von gasförmigen Substraten für die Bakterienzellen zu erhöhen, ist die Erhöhung der Gelöstkonzentration in der Flüssigphase. Zwei wichtige Faktoren zur Kontrolle der Löslichkeit von Gasen im Medium sind die Rührerdrehzahl und der Druck im Reaktor. Dabei wurde zunächst der Einfluss einer Erhöhung des Partialdrucks des möglicherweise limitierenden Substrats H_2 untersucht. In der verwendeten Versuchsanlage erfolgte dies durch Erhöhung des Anteils des entsprechenden Gases im Gesamtvolumenstrom und Variation des Gesamtdrucks im Reaktor. Die jeweiligen Sättigungskonzentrationen wurden mit Hilfe der Henrykonstanten der Gase bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ über das Henry-Gesetz (Gleichung 3.27) ermittelt und sind im Anhang (Kapitel 13.1) aufgeführt.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die schrittweise Erhöhung des Wasserstoffpartialdrucks (p_{H_2}) auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen auswirkt. Die Bedingungen für die einzelnen Versuche sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Da die Löslichkeit von CO_2 um ein Vielfaches höher ist als H_2 wurde dieses Substrat für alle Kultivierungen als nicht-limitierend angenommen. Um eine Limitierung des Mediums auszuschließen, wurde in den Kultivierungen mit $p_{H_2}^{\text{Eingang}} > 800$ mbar die Konzentration an Hefeextrakt von 2 auf 4 g L^{-1} verdoppelt (Medium DSMZ 135H).

Des Weiteren wurde der Gasvolumenstrom in Kultivierungen mit $p_{H_2}^{\text{Eingang}} > 800$ mbar von 2 auf 15 L h^{-1} erhöht. Damit ein p_{H_2} von mehr als 1,0 bar erreicht werden kann, wurde zusätzlich der Druck im System auf 1,8 bar erhöht. Alle Kultivierungen wurden mit einer Biomassekonzentration von $0,76 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ gestartet. Auf Grund der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen bezüglich des Mediums und des Gas-Flüssig-Stofftransports (horizontale Trennlinie in Tabelle 5.1) werden diese Versuchsreihen im Folgenden zwar gemeinsam dargestellt, jedoch getrennt voneinander betrachtet.

Tabelle 5.1: Bedingungen für die autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor unter pH-geregelten Bedingungen ($pH = 7,0$) mit ansteigendem Wasserstoffpartialdruck am Gaseingang des Reaktors.

$p_{CO_2}^{\text{Ein}}$, mbar	$p_{H_2}^{\text{Ein}}$, mbar	$c_{H_2}^*$, mmol L^{-1}	Medium	Konzentration des Tit.-mittels, NaOH	Volumen- strom, L h^{-1}	Druck im Reaktor, bar
200	400	0,30	DSMZ 135	3	2	1,0
200	800	0,60	DSMZ 135	3	2	1,0
200	1200	0,90	DSMZ 135H	6	15	1,8
360	1440	1,08	DSMZ 135H	6	15	1,8
100	1700	1,27	DSMZ 135H	6	15	1,8

DSMZ 135H = Medium DSMZ 135 mit verdoppelter Konzentration an Hefeextrakt, Spurenelementen und Vitaminen

In Abbildung 5.2 sind die Verläufe der Konzentrationen an Acetat und die erreichten Wachstums- und zellspezifische Produktbildungsraten vergleichend dargestellt. An den linearen Abschnitten der Verläufe der Acetatbildung bei ansteigendem Wasserstoffpartialdruck im zugeführten Gas am Eingang des Reaktors ($p_{H_2}^{\text{Eingang}}$) in Abbildung 5.2a lässt sich erkennen, dass die Produktbildungsraten durch Erhöhung des $p_{H_2}^{\text{Eingang}}$ deutlich gesteigert werden konnten. Wurde im Ansatz mit 400 mbar eine volumetrische Acetatbildungsrate (Q_P) von $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht, so konnte diese durch Verdopplung des $p_{H_2}^{\text{Eingang}}$ auf $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden. Dies spiegelt sich auch in den zellspezifischen Acetatbildungsrate (q_P) wieder, die durch Verdopplung des $p_{H_2}^{\text{Eingang}}$ von $1,7 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $2,3 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden konnte. Auch

die ermittelte Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$) lag höher als bei $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ ($\mu_{\max} = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$).

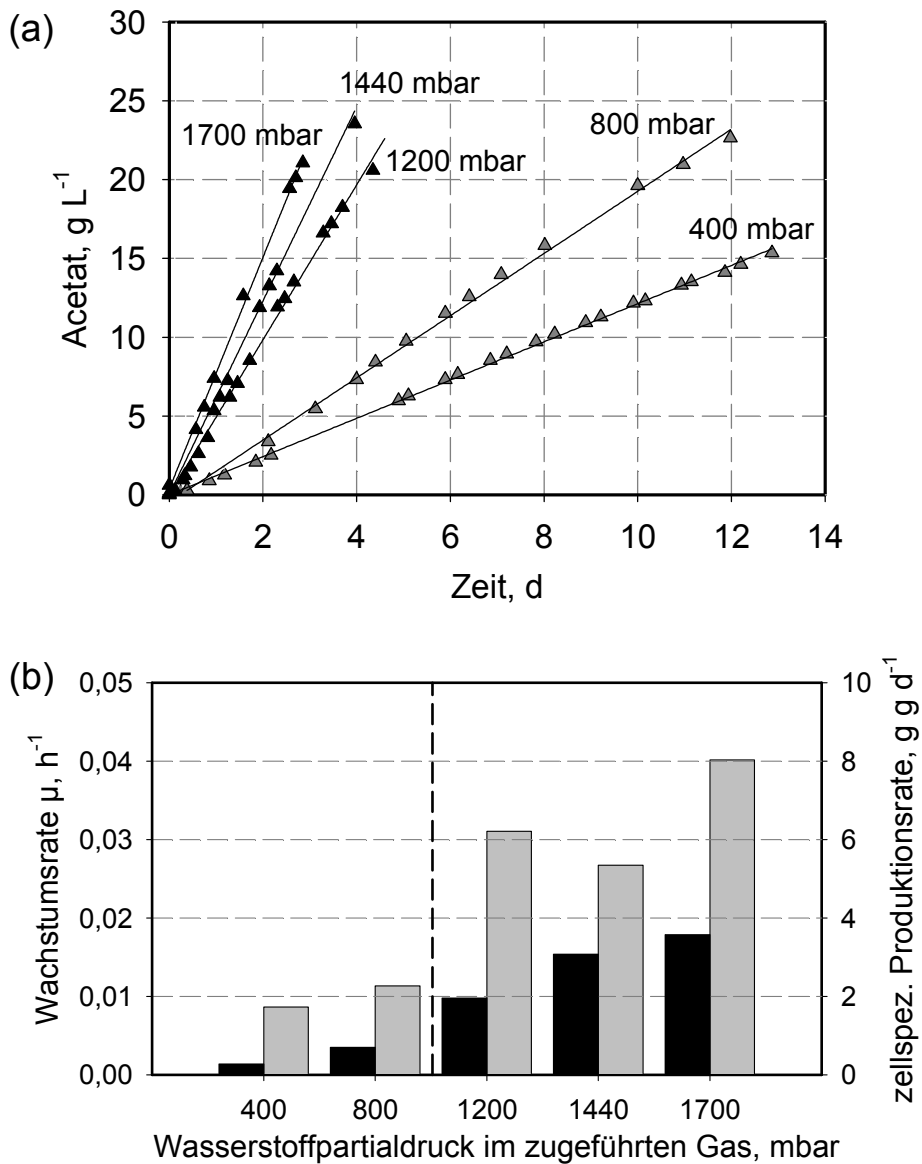


Abbildung 5.2: (a) Verlauf der Acetatkonzentrationen bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* bei ansteigendem Wasserstoffpartialdruck im Gasvolumenstrom am Eingang des Reaktors unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$); (▲) = Kultivierungen wurden in Medium DSMZ 135 durchgeführt bei $\dot{V}_g = 2 \text{ L h}^{-1}$ ($0,033 \text{ vvm}$), einem Druck von $1,0 \text{ bar}$ und als Titrationsmittel NaOH (3 mol L^{-1}), (▲) = Kultivierungen wurden in DSMZ 135H durchgeführt bei $\dot{V}_g = 15 \text{ L h}^{-1}$ ($0,25 \text{ vvm}$), einem Druck von $1,8 \text{ bar}$ und Titrationsmittel NaOH (6 mol L^{-1}), (b) erreichte maximale Wachstums- (■) und zellspezifische Produktbildungsrate (□); die vertikale Linie symbolisiert die unter (a) beschriebenen Änderungen der Versuchsbedingungen außer dem p_{H_2} . Die Sättigungskonzentrationen in der Flüssigphase beim jeweiligen $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}}$ sind in Tabelle 5.1 angegeben. $n = 400 \text{ min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. DSMZ 135H = verdoppelte Konzentrationen an Hefeextrakt, Spurenelementen und Vitaminen.

Durch weitere schrittweise Erhöhung des pH_2^{Eingang} , Erhöhung des Volumenstroms auf 15 L h^{-1} und Verdopplung der Konzentrationen an Hefeextrakt, Vitaminen und Spurenelementen konnten sowohl die volumetrische als auch die zellspezifische Acetatbildungsrate weiter erhöht werden auf jeweils maximal $7,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beziehungsweise $7,7 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einem pH_2^{Eingang} von 1700 mbar. Der höhere Wert für zellspezifische Acetatbildungsrate bei der Kultivierung mit $pH_2^{\text{Eingang}} = 1200 \text{ mbar}$ in Abbildung 5.2b kann an dieser Stelle nicht erklärt werden. Der förderliche Effekt der veränderten Reaktionsbedingungen lässt sich auch an den ermittelten Wachstumsraten ablesen. So konnte diese bei Erhöhung des pH_2^{Eingang} von 800 mbar ($\mu_{\text{max}} = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) schrittweise auf $\mu_{\text{max}} = 17,9 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($pH_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$) weiter erhöht werden.

An der Erhöhung der volumetrischen Rate und der nahezu linearen Erhöhung der zellspezifischen Produktionsrate (vgl. Abbildung 5.2b) lässt sich eindeutig erkennen, dass Wasserstoff unter diesen Bedingungen das limitierende Substrat darstellt.

Bei den vorherigen Kultivierungen hatte sich gezeigt, dass sich durch Erhöhung des Wasserstoffpartialdrucks am Eingang des Reaktors und somit der Gelöstwasserstoffkonzentration im Medium die zellspezifische Produktbildungsrate erhöhen lässt. Die höchsten Produktbildungsraten wurden beim maximal möglichen Gesamtdruck von 1,8 bar im verwendeten Laborrührkesselreaktor bei einem pH_2^{Eingang} von 1700 mbar in Anwesenheit von 100 mbar CO_2 erreicht. In der folgenden Kultivierung wurde die maximale Acetatkonzentration unter diesen Bedingungen ermittelt.

Abbildung 5.3 zeigt, dass die Biomassekonzentration von anfangs $0,8 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von zwei Tagen zunahm bis auf $1,2 \text{ g L}^{-1}$ und anschließend wieder leicht abfiel. Ab Tag 6 blieb die Biomassekonzentration bis zum Ende der Kultivierung konstant bei $0,8 \text{ g L}^{-1}$. Acetat wurde nach einer Verzögerungsphase im Vergleich zur vorherigen Kultivierung unter diesen Bedingungen mit vergleichbaren Produktbildungsraten von $7,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (volumetrisch) und $7,7 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (zellspezifisch) gebildet. Im Verlauf der Kultivierung verlangsamte sich die Acetatbildung jedoch und die Acetatkonzentration stagnierte am Ende der Kultivierung schließlich bei $44,8 \text{ g L}^{-1}$. Mit Überschreiten einer Acetatkonzentration von etwa 30 g L^{-1} konnte eine Akkumulation von Formiat bis zu einer Konzentration von $0,7 \text{ g L}^{-1}$ im Medium nach 15 Tagen festgestellt werden.

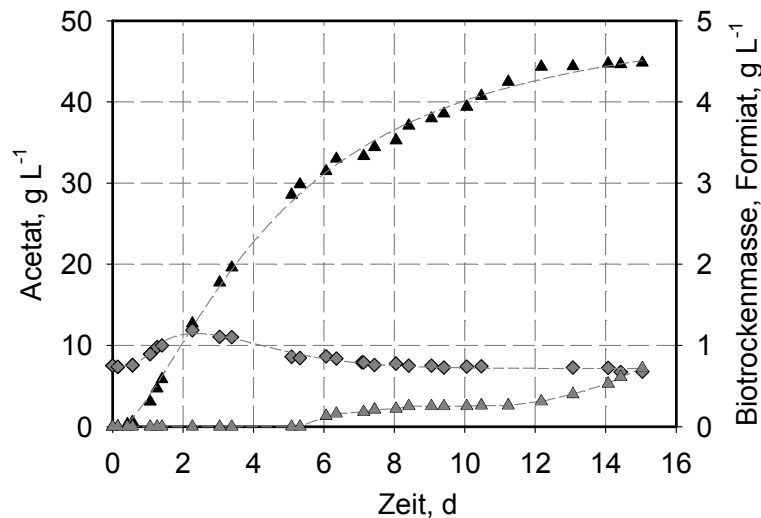


Abbildung 5.3: Verlauf des pH und der Konzentrationen an Biotrockenmasse (◆), Acetat (▲) und Formiat (△) bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* bei einem $p_{H_2}^{\text{Eingang}}$ von 1700 mbar unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, $pH = 7,0$, Medium = DSMZ 135H, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (6 mol L^{-1}), $n = 400 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 15 \text{ L h}^{-1}$ (0,25 vvm), $p_{CO_2}^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $p_{\text{tot}} = 1,8 \text{ bar}$).

Diskussion

Anhand der gezeigten Kultivierungen lässt sich eindeutig feststellen, dass in den dargestellten Prozessen Wasserstoff das limitierende Substrat war. Da die Bedingungen während der gezeigten Kultivierungen bezüglich der Zusammensetzung des Mediums und des Gasvolumenstroms zusätzlich zum Wasserstoffpartialdruck verändert wurden, kann die Erhöhung der Wachstums- und Produktionsraten nicht allein auf die Erhöhung des Wasserstoffpartialdrucks zurückgeführt werden. So zeigte sich in Abbildung 5.2a eine größere Steigerung der Acetatbildung bei Erhöhung des $p_{H_2}^{\text{Eingang}}$ von 800 auf 1200 mbar als von 400 auf 800 mbar, was auf die gleichzeitige Erhöhung des Gasvolumenstroms und Veränderung des Mediums zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen sein kann. Neben dem treibenden Konzentrationsgefälle in der Flüssigphase ($c_{H_2}^* - c_{H_2}$) hat auch die Erhöhung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ durch Erhöhung des Gasvolumenstroms einen förderlichen Effekt auf den Gas-Flüssig-Stofftransport (Doran, 2006).

Ein Einfluss des erhöhten Systemdruck auf die erhöhte Acetatbildung bei einem Wasserstoffpartialdruck von mehr als 1,0 bar kann ausgeschlossen werden. Maier *et al.* (2001) zeigten, dass der $k_L a$ und somit der Gas-Flüssig-Stofftransport unabhängig bis zu einem Druck von 100 bar im Bioreaktor ist. So ist unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen der Konzentrationsgradient des gasförmigen Substrats Δc in der Flüssigphase die Triebkraft für den Transfer der gasförmigen Moleküle aus der Gasblase in die Flüssigphase (Bredwell *et al.*, 1999). Es zeigte sich in Kultivierungen deutlich, dass bei ansonsten gleichbleibenden

Bedingungen die Verfügbarkeit des gasförmigen Substrats H_2 durch Erhöhung des Partialdrucks bei gleichen Versuchsbedingungen deutlich verbessert und die Acetatbildungsrate erhöht werden konnte.

Die erhöhte Verfügbarkeit des limitierenden Substrats H_2 führt neben einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit außerdem dazu, dass eine höhere Endkonzentration an Acetat erreicht werden kann. Wurden bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* bei einem pH_2^{Eingang} von 400 mbar 32 g L^{-1} Acetat erreicht, so wurde Acetat bis zu einer Konzentration von fast 45 g L^{-1} bei einem pH_2^{Eingang} von 1700 mbar in einem Drittel der Zeit gebildet. So lässt sich für weitere autotrophe Prozesse schließen, dass eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen Substrats H_2 von entscheidender Bedeutung für die Erreichung schneller Produktbildungsraten und hoher Acetatkonzentrationen ist. Die Verfügbarkeit von CO_2 war auch bei einem Partialdruck von 100 mbar noch ausreichend für eine hohe Acetatbildungsrate.

Neben Acetat als Hauptprodukt des Stoffwechsels von *A. woodii* konnte mit der vorhandenen Messtechnik gegen Ende der Fermentation eine Akkumulation der organische Säure Formiat im Medium bis zu einer Konzentration $< 1 \text{ g L}^{-1}$ festgestellt werden. Formiat wird im Acetyl-CoA-Weg durch Reduktion von CO_2 in Anwesenheit von H_2 durch das Enzym Formiat-Dehydrogenase gebildet und stellt ein Zwischenprodukt des autotrophen Stoffwechsels dar. Formiat ist ein typisches Produkt von acetogenen Bakterien beim autotrophen Wachstum auf H_2 , das anschließend wieder verbraucht wird (Peters *et al.*, 1999). Zudem kann *A. woodii* Formiat als Substrat verwenden (Balch *et al.*, 1977). In einer Kultivierung von *A. woodii* auf 10 g L^{-1} Formiat in Septumflaschen konnte dies bestätigt werden. So war die eingesetzte Kohlenstoffquelle nach 92 Stunden zu über 90 % verbraucht und es konnten $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass unter den Prozessbedingungen bei einer Konzentration von über 30 g L^{-1} Acetat im Medium kein Verbrauch von Formiat festgestellt werden kann, legt die Vermutung nahe, dass der Stofffluss durch den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg unter diesen Bedingungen möglicherweise reduziert sein könnte. Die letzten Reaktionen des Acetyl-CoA-Wegs werden durch die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase katalysiert und sind reversibel. Bei hohen Acetatkonzentrationen im Medium steigt auch die zellinterne Acetatkonzentration, was zu einer Erhöhung der terminalen Rückreaktion des Acetyl-CoA-Wegs führen könnte. Dies würde eine Verknappung der Zwischenstufen Acetyl-Phosphat und Coenzym A mit sich bringen und somit zur Stagnation der Acetatbildung führen (Menzel und Gottschalk, 1985). Diese Hypothese wird möglicherweise von der Tatsache gestützt, dass die Acetatbildung im späteren Verlauf der Kultivierung verlangsamt wird und schließlich bei einer Konzentration von etwa 45 g L^{-1} in dem gezeigten Prozess ganz zum Erliegen kommt. Die Stagnation der Acetatbildung könnte aber auch durch Limitierung eines Medienbestandteils ausgelöst werden, was später untersucht wird.

5.3 Gas-Flüssig-Stofftransport

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Eintrag des gasförmigen Substrats Wasserstoff aus der Gas- in die Flüssigphase eine wichtige Rolle für die autotrophe Herstellung von Acetat mit *A. woodii* spielt. Durch Erhöhung des treibenden Konzentrationsgefälles ($c_{\text{H}_2}^* - c_{\text{H}_2}$) konnte der Eintrag des gasförmigen Substrats H_2 aus der Gas- in die Flüssigphase und somit die autotrophe Bildung von Acetat deutlich gesteigert werden. Neben der Erhöhung des Partialdrucks eines Gases kann der Gas-Flüssig-Stofftransport auch durch Erhöhung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ erhöht werden. Dieser Parameter ist unter anderem von der Größe der Stoffaustauschfläche a abhängig, die in Rührkesselreaktoren durch die Begasungsrate und den Leistungseintrag bestimmt wird (Doran, 2006).

5.3.1 Leistungseintrag

Die Erhöhung des Leistungseintrags führt zu einer effektiveren Zerkleinerung der eingetragenen Gasblasen. Dies führt zu einer Erhöhung der Stoffaustauschfläche a und somit zu erhöhtem Stofftransport aus der Gas- in die Flüssigphase (Doran, 2006). Das Wachstum von anaeroben Bakterien kann jedoch durch hohen Leistungseintrag bei hohen Rührerdrehzahlen behindert werden (Yerushalmi und Volesky, 1985; Kadic, 2010). Bisherige Kultivierungen wurden daher bei einer Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} im Laborrührkesselreaktor durchgeführt, was einem abgeschätzten volumenbezogenen Leistungseintrag von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ in begastem Zustand entspricht.

Bei den eingesetzten parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab findet der Gas-Flüssig-Stofftransport zum einen durch Gasaustausch über die Flüssigkeitsoberfläche (Oberflächenbegasung) und zum anderen durch Verteilung der Gasblasen im Medium durch die Drehbewegung des gas-ansaugenden Rührorgans (Submersbegasung) statt. Aktiver Gaseintrag durch das Rührorgan ist im Milliliter-System jedoch erst ab einer Rührerdrehzahlen von etwa 1800 min^{-1} messbar (Hortsch, 2011). Da der Gaseintrag für Prozesse, in denen gasförmige Substrate mit niedriger Löslichkeit zum Einsatz kommen eine entscheidende Rolle spielt, wurde im Folgenden die Acetatbildung von *A. woodii* im Parallelsatz bei erhöhter Rührerdrehzahl und folglich erhöhtem Stofftransport aus der Gas- in die Flüssigphase untersucht. Die angegebenen Werte für den volumenbezogenen Leistungseintrag in begastem Zustand wurden von Puskeiler (2004) übernommen.

Abbildung 5.4 zeigt deutlich, dass der Gaseintrag und somit auch die gebildete Acetatkonzentration innerhalb der Versuchszeit von 48 Stunden stark vom Gaseintrag in die Flüssigphase abhängt. So wurde im Bereich reiner Oberflächenbegasung bei einem volumenbezogenen Leistungseintrag (P/V) von $0,8 \text{ W L}^{-1}$ ($n = 1000 \text{ min}^{-1}$) bei Versuchsende

eine Acetatkonzentration von nur $0,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Im Bereich der aktiven Begasung bei $P/V = 5,9 \text{ W L}^{-1}$ ($n = 2000 \text{ min}^{-1}$) bzw. $15,3 \text{ W L}^{-1}$ ($n = 2800 \text{ min}^{-1}$) wurden dagegen in der gleichen Zeit Acetatkonzentrationen von $3,4 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $5,2 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Dies zeigt deutlich, dass der Eintrag der gasförmigen Substrate ins Reaktionsmedium durch die Rührergeschwindigkeit ein entscheidender Faktor für die autotrophe Acetatbildung im Parallelansatz ist.

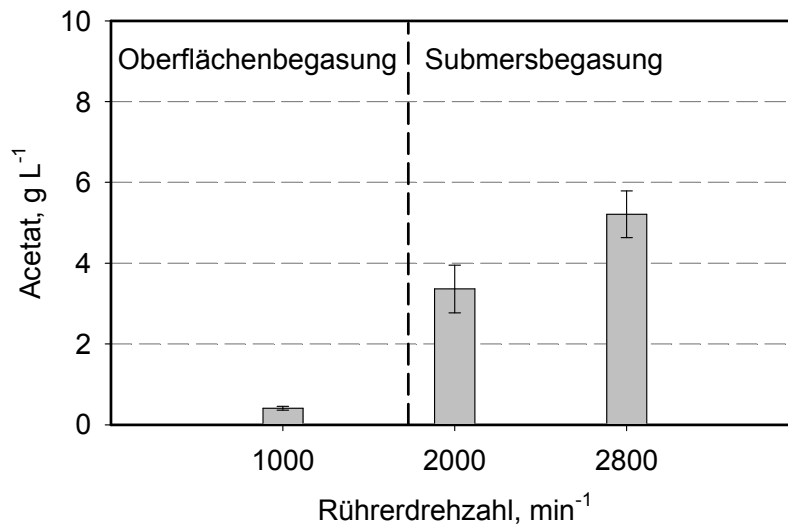


Abbildung 5.4: Acetatkonzentrationen nach 48 h bei der vergleichenden autotrophen Satzkultivierung von *A. woodii* bei ansteigender Rührerdrehzahl unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren ($c_{x0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Medium = DSMZ 135, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $p\text{H}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $p\text{CO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Der Übergangsbereich von passiver Oberflächenbegasung zu aktiver Submersbegasung bei einer Drehzahl von $\sim 1800 \text{ min}^{-1}$ ist durch die vertikale Linie gekennzeichnet. Es wurden Sechsfachbestimmungen durchgeführt.

Wie bei Kultivierungen von *A. woodii* im Parallelansatz gezeigt werden konnte, konnte die Acetatbildung durch Erhöhung der Rührerdrehzahl deutlich gesteigert werden. Daher wurde im Folgenden der Stofftransport für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab ebenso erhöht. Dazu wurde zum einen die Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} auf 1200 min^{-1} erhöht, was zu einer Steigerung des volumenbezogenen Leistungseintrags in begastem Zustand von $0,2$ auf $5,5 \text{ W L}^{-1}$ führt (abgeschätzte Werte). Zum anderen wurde der Volumenstrom von 15 auf 30 L h^{-1} gesteigert, um einen erhöhten Gas-Flüssig-Stofftransport zu gewährleisten. Des Weiteren wurde die Konzentration an Eisen(II)-Ionen im eingesetzten Medium von $0,4$ auf $5,4 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht (Medium DSMZ 135HF).

Im Folgenden wird der Prozessverlauf bei erhöhtem Stofftransport zu den Prozessverläufen aus Kapitel 5.2 bei einem $p\text{H}_2^{\text{Eingang}}$ von 400 mbar und 1700 mbar vergleichend dargestellt. Die veränderten Reaktionsbedingungen der einzelnen Prozesse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Bedingungen für die vergleichenden autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor (pH = 7,0) bei ansteigendem $p\text{H}_2^{\text{Eingang}}$ und ansteigender Rührerdrehzahl.

Ansatz	Rührerdrehzahl, min^{-1}	$p\text{CO}_2^{\text{Ein}}$, mbar	$p\text{H}_2^{\text{Ein}}$, mbar	$c^*_{\text{H}_2}$, mmol L^{-1}	Medium	Volumenstrom, L h^{-1}
1	400	200	400	0,30	DSMZ 135	2
2	400	100	1700	1,27	DSMZ 135H	15
3	1200	100	1700	1,27	DSMZ 135HF	30

In Abbildung 5.5 ist der Prozessverlauf bei erhöhtem Stofftransport im Vergleich zu den minimal und maximal erreichten Acetatbildungsraten bei autotrophen Prozessen aus Kapitel 5.2 bei einem Wasserstoffpartialdruck von 400 mbar und 1700 mbar dargestellt. An den volumetrischen Produktbildungsraten in Tabelle 5.3 lässt sich erkennen, dass diese durch Erhöhung des Stofftransports im Vergleich zu den Kultivierungen unter wasserstofflimitierten Bedingungen deutlich gesteigert werden konnte auf $29,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Auch die zellspezifische Produktbildungsrate konnte auf $17,0 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Wachstumsraten und der volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten der vergleichenden Kultivierung von *A. woodii* in den Ansätzen 1 - 3 (Bedingungen siehe Tabelle 5.2).

Ansatz	Wachstums- rate μ_{max} , h^{-1}	vol. Produktionsrate Q_P , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	zellspez. Produktionsrate q_P , $\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
1	$0,14 \cdot 10^{-3}$	1,2	1,6
2	$14,4 \cdot 10^{-3}$	7,3	7,7
3	$24,4 \cdot 10^{-3}$	29,6	17,0

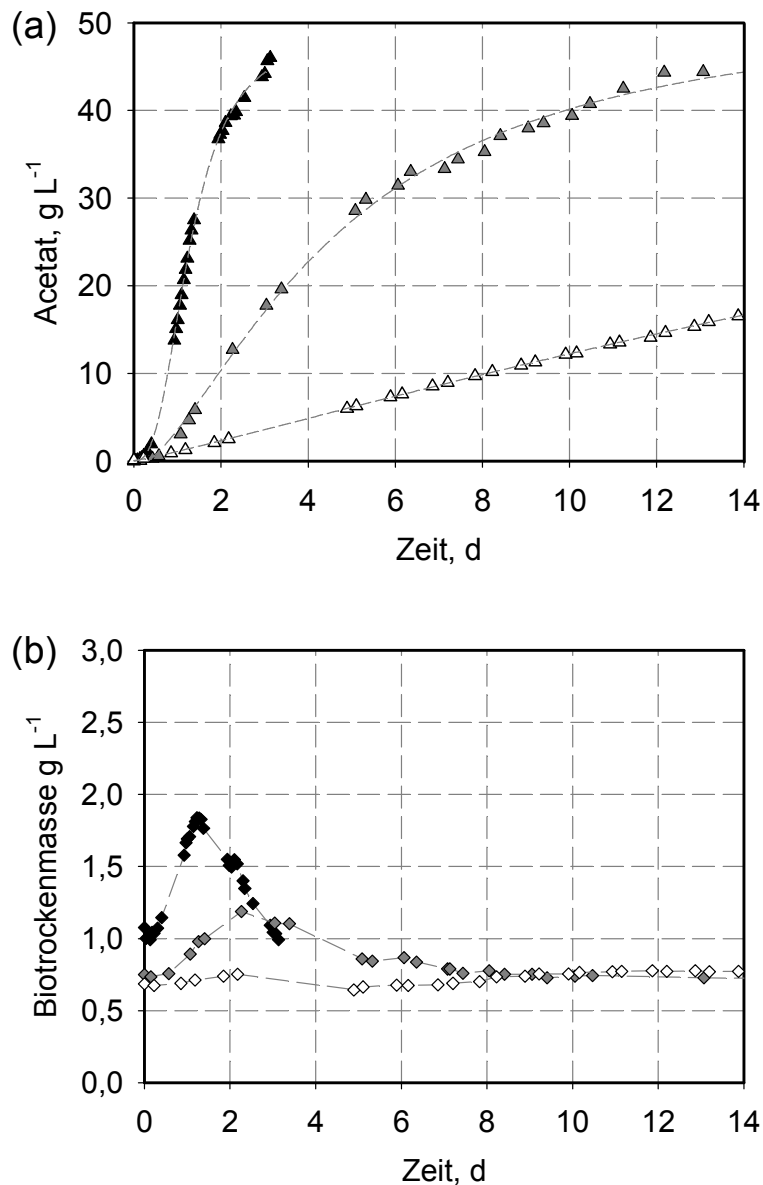


Abbildung 5.5: Verlauf der Konzentrationen an (a) Acetat und (b) Biotrockenmasse bei vergleichenden autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V = 1,0 \text{ L}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$) mit erhöhtem Stofftransport in Ansatz 1 (▲, ◆), Ansatz 2 (▲, ◆) und Ansatz 3 (▲, ◆); die Bedingungen der einzelnen Ansätze sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Diskussion

Durch Erhöhung der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* konnte wie erwartet eine Erhöhung des Gas-Flüssig-Stofftransports erreicht werden. So konnte der Gaseintrag der parallelen Rührkesselreaktoren durch Umschalten von passiver auf aktive Begasung durch Erhöhung des volumenbezogenen Leistungseintrags von $0,8 \text{ W L}^{-1}$ auf $15,3 \text{ W L}^{-1}$ deutlich gesteigert werden. Dies zeigte sich durch eine zehnfach erhöhte Acetatbildung unter pH-ungeregelten Bedingungen, so dass nach einer Versuchszeit von

48 Stunden eine Acetatkonzentration von etwa 5 g L^{-1} erreicht werden konnten. Auf Grund der fehlenden Möglichkeit zur pH-Regelung im bestehenden Versuchsaufbau, ist die Acetatbildung im Parallelreaktorsystem begrenzt durch den pH. Wie in Kapitel 5.1 gezeigt wurde, konnten unter pH-ungeregelten Bedingungen im verwendeten Medium etwa 8 g L^{-1} Acetat gebildet werden, bevor die Produktbildung bei einem $\text{pH} < 6,0$ zum Erliegen kommt. Somit eignen sich die eingesetzten parallelen Rührkesselreaktoren für die Untersuchung von unterschiedlichen Startbedingungen der autotrophen Acetatproduktion, nicht jedoch für die Erreichung hoher Acetatkonzentrationen.

Im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab führten eine Erhöhung des Gasvolumenstroms von 15 L h^{-1} auf 30 L h^{-1} und eine Erhöhung der Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} auf 1200 min^{-1} zu einer Steigerung des volumenbezogenen Leistungseintrags von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ auf $5,5 \text{ W L}^{-1}$. Das wiederum hatte eine deutliche Erhöhung der Wachstums- und Produktbildungsraten von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen zur Folge. Unter Prozessbedingungen bei einem volumenbezogenen Leistungseintrag von $5,5 \text{ W L}^{-1}$ konnte eine Acetatkonzentration von 46 g L^{-1} mit einer Acetatbildungsrate von $29,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in einer Prozesszeit von drei Tagen gebildet werden, was einer fünfmal schnelleren Produktbildungsrate im Vergleich zu Kultivierungen bei einem volumenbezogenen Leistungseintrag von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ entspricht.

So wurden Bedingungen für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* im Parallelreaktorsystem und im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab gefunden, unter denen im Folgenden weitere Reaktionsbedingungen untersucht werden können.

In der Literatur ist die maximale Acetatkonzentration für *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen mit $10,8 \text{ g L}^{-1}$ angegeben (Balch *et al.*, 1977). Diese wurde nach 5,8 Tagen unter pH-geregelten Bedingungen ($\text{pH} = 6,7$) im 12-L-Laborrührkesselreaktor erreicht (Rührerdrehzahl = 400 min^{-1} ; Begasungsrate = $0,04 \text{ vvm}$ ($2,4 \text{ L h}^{-1}$); $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Hier wurde Acetat mit einer ähnlichen Geschwindigkeit gebildet wie in der anfänglichen Kultivierung von *A. woodii* unter wasserstofflimitierten Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit ($Q_P = 2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Eine Betrachtung der Versuchsbedingungen der Kultivierung von *A. woodii* von Balch *et al.* (1977) lässt vermuten, dass hier ebenfalls eine Limitierung des Stofftransports der gasförmigen Substrate in das Reaktionsmedium vorlag. Suzuki *et al.* (1993) berichteten von einer Produktbildungsrate von $2,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Satzverfahren für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* in einer 300 mL-Blasensäule (Begasungsrate = 4 vvm , $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 545 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 136 \text{ mbar}$). Eine Betrachtung der eingesetzten Versuchsbedingungen lässt auch hier eine Stofftransportlimitierung vermuten. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Produktbildungsgraten von *A. woodii* durch Aufhebung der Stofftransportlimitierung der gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 deutlich erhöht werden konnten.

Eine ähnlich hohe Acetatkonzentration von 51 g L^{-1} wurde mit *Acetobacterium sp.* BR-446 unter autotrophen Bedingungen im Satzverfahren bei einem pH von 7,3 erreicht. Die volumetrische Acetatbildungsrate wurde dabei mit $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ angegeben (Morinaga und Kawada, 1990). Schmidt und Cooney (1986) berichten von einer Produktbildungsrate von $7,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mit dem Thermophil *Moorella thermoacetica* ATCC 29797 unter autotrophen Bedingungen in einem Hochdruckreaktor bei einem Wasserstoffpartialdruck von mehr als 3 bar. Im Vergleich dazu konnte in der vorliegenden Arbeit mit *A. woodii* bei einem $\text{pH}_2^{\text{Eingang}}$ von 1700 mbar, einem Leistungseintrag von $5,5 \text{ W L}^{-1}$ und einer Zelldichte von $1,8 \text{ g L}^{-1}$ eine volumetrische Acetatbildungsrate von $29,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Satzverfahren erreicht werden. Diese Bildungsrate liegt somit deutlich über den Raten, die mit anderen acetogenen Mikroorganismen unter autotrophen Bedingungen im Satzverfahren erreicht wurden.

5.3.2 Gas-Flüssig-Stoffübergangskoeffizient

Im Folgenden wurde der verwendete Laborrührkesselreaktor bezüglich seiner Kapazität zum Eintrag der gasförmigen Substrate aus der Gas- in die Flüssigphase charakterisiert. Ein Maß für die Effizienz des Gaseintrags ist der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_{\text{L}}a$. Der $k_{\text{L}}a$ wird durch das Zusammenwirken von Rührerdrehzahl und Begasungsrate bestimmt. Daher wurde dieser im Folgenden für unterschiedliche Betriebsbedingungen des eingesetzten Laborrührkesselreaktors im Litermaßstab bestimmt. Die Messungen wurden in zellfreiem Medium unter Prozessbedingungen durchgeführt. Wie in Kapitel 5.2 gezeigt, stellt Wasserstoff unter den verwendeten Bedingungen das limitierende Substrat dar. Daher sind vor allem die Werte für $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ von Interesse. Da keine direkte Messtechnik für die Bestimmung der Gelöstkonzentration an Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zur Verfügung stand, wurden die Werte für Sauerstoff über die dynamische Methode der Stickstoffdesorption bestimmt und über die Diffusionskoeffizienten nach Gleichung 3.25 in $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ und $k_{\text{L}}a(\text{CO}_2)$ umgerechnet.

Wie an den ermittelten Werte für $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ in Abbildung 5.6a zu sehen ist, nahmen diese sowohl bei Erhöhung des Volumenstroms bei gleicher Rührerdrehzahl, als auch bei Erhöhung der Rührerdrehzahl bei gleicher Begasungsrate zu. Durch Erhöhung der Rührerdrehzahl wurde dabei im Bereich einer erhöhten Begasungsrate von $22,5 \text{ L h}^{-1}$ und 30 L h^{-1} ein größerer Effekt als im Bereich kleinerer Begasungsgraten erzielt. So änderte sich der $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ bei einem Volumenstrom von 5 L h^{-1} durch Erhöhung der Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} auf 1200 min^{-1} kaum, wohingegen der $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ bei einer Begasungsrate von 30 L h^{-1} durch Erhöhung der Rührerdrehzahl von 400 auf 1200 min^{-1} von $0,007$ auf $0,079 \text{ s}^{-1}$ erhöht werden konnte.

Das gleiche Bild ergab sich für die aus $k_{\text{L}}a(\text{O}_2)$ abgeschätzten Werten für $k_{\text{L}}a(\text{CO}_2)$. Diese liegen auf Grund des niedrigeren abgeschätzten Diffusionskoeffizienten für CO_2 ($D_{\text{CO}_2}^* = 2,320 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) gegenüber für Wasserstoff ($D_{\text{H}_2}^* = 3,901 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) insgesamt niedriger. Bei

einer Rührerdrehzahl und einer Begasungsrate von 30 L h^{-1} konnte ein maximaler volumetrischer Stoffübergangskoeffizient $k_{\text{L}}a(\text{CO}_2)$ von $0,061 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

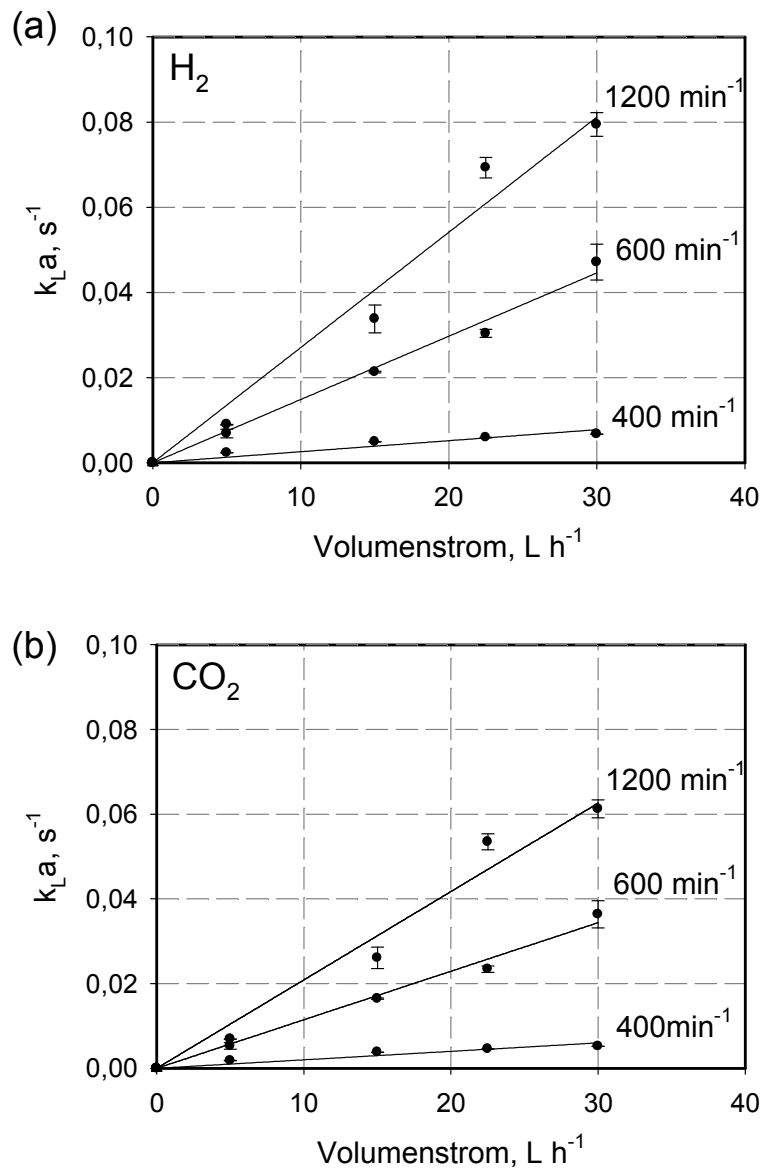


Abbildung 5.6: Werte für (a) $k_{\text{L}}a(\text{H}_2)$ und (b) $k_{\text{L}}a(\text{CO}_2)$ in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate in zellfreiem Kulturmedium unter Prozessbedingungen im Laborrührkesselreaktor ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$, $p_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$). Die Werte wurden für Sauerstoff durch die Methode der Stickstoffdesorption bestimmt (Linek *et al.*, 1989) durch Begasung mit Druckluft unter den jeweiligen Prozessbedingungen. Die ermittelten Werte wurden über die in Tabelle 3.4 angegebenen abgeschätzten Diffusionskoeffizienten umgerechnet. Alle Werte wurden dreifach bestimmt.

Diskussion

Der $k_{L,a}$ für die Gase H_2 und CO_2 konnte nicht direkt bestimmt werden, sondern wurden auf der Basis des ermittelten $k_{L,a}$ für Sauerstoff für die jeweilige Betriebsbedingung geschätzt. Die Werte für $k_{L,a}(O_2)$ wurden durch die dynamische Methode der Stickstoffdesorption mit Luftbegasung bestimmt. Die Begasung mit Luft kann jedoch bei hohem Leistungseintrag zu einer Unterschätzung des realen $k_{L,a}$ führen (Linek *et al.*, 1989). Diese Abweichungen bei hohem Leistungseintrag sind die Folge von unterschiedlich großen Blasen im Medium ("*small bubble*" Effekt). Durch den hohen Leistungseintrag entstehen an Orten mit hoher lokaler Energiedissipationsdichte sehr kleine Blasen mit hoher Verweilzeit, die durch das große Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen schnell das Diffusionsgleichgewicht erreichen. Beim Diffusionsgleichgewicht stellt sich eine Konzentrationsverteilung des Gases zwischen Gas- und Flüssigphase ein, bei der keine Diffusion des Gases über die Phasengrenze mehr stattfindet. Diese Blasen enthalten hauptsächlich Stickstoff und tragen somit nicht mehr zur Aufsättigung des Mediums mit Sauerstoff bei, was zu einer Reduktion des tatsächlichen $k_{L,a}$ führt. Der "*small bubble*" Effekt kann durch Begasung mit reinem Sauerstoff umgangen werden, was im vorhandenen Versuchsaufbau technisch jedoch nicht möglich war.

5.3.3 Abschätzung der maximalen Gaseintragsraten

Für die in Abbildung 5.5 gezeigten Kultivierungen wurden auf der Basis der ermittelten Werte für $k_{L,a}(O_2)$ die maximalen Eintragsraten für die gasförmigen Substrate H_2 (HTR = "*hydrogen transfer rate*") und CO_2 (CTR = "*carbon dioxide transfer rate*") für die eingestellten Betriebsbedingungen im Rührkesselreaktor abgeschätzt. Diese sollten anschließend mit den ermittelten Substratverbrauchsrate für H_2 (HUR = "*hydrogen uptake rate*") und CO_2 (CUR = "*carbon dioxide uptake rate*") verglichen werden. Die maximal mögliche Gaseintragsrate in einem Bioreaktor tritt auf, wenn das treibende Konzentrationsgefälle der Gelöstgas-konzentration in der Flüssigphase maximal ist, also die Gelöstkonzentration des Gases gegen Null geht (Doran, 2006). Die Substratverbrauchsrate werden dabei unter der Annahme, dass Acetat das einzige Produkt ist und unter Vernachlässigung der Biomassebildung über die gemessene volumetrische Produktbildung mit Hilfe der Stöchiometrie der Homoacetatbildung für *A. woodii* in Gleichung 3.4 (Balch *et al.*, 1977) ermittelt.

Ein Vergleich der maximal möglichen HTR zur ermittelten HUR für Ansatz 1 in Abbildung 5.7a zeigt, dass die maximale HTR von $0,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ unter der ermittelten HUR von $3,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ liegt. In Ansatz 2 liegen die HTR und HUR mit $22,6$ und $21,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sehr nah beinander, was daraufhin deutet, dass die maximal mögliche Acetatbildungsrate hier durch den Transfer von H_2 aus der Gas- in die Flüssigphase begrenzt werden könnte. Für Ansatz 3 konnte ermittelt werden, dass die Wasserstoffverbrauchsrate mit $86,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ weit unter

der abgeschätzten maximalen Eintragsrate von Wasserstoff liegt ($364,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Daraus lässt sich schließen, dass das gasförmige Substrat in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen sollte.

Ein Vergleich der maximalen CTR mit der ermittelten CUR für die jeweiligen Betriebsbedingungen in Abbildung 5.7b zeigt, dass jeweils nur eine Bruchteil des CO_2 verbraucht wurde, das über die Gas-Flüssig-Phasengrenze transportiert werden kann. Die CUR betrug jeweils für die einzelnen Ansätze 9 % (Ansatz 1), 25 % (Ansatz 2) und 6 % (Ansatz 3) der maximal möglichen CTR.

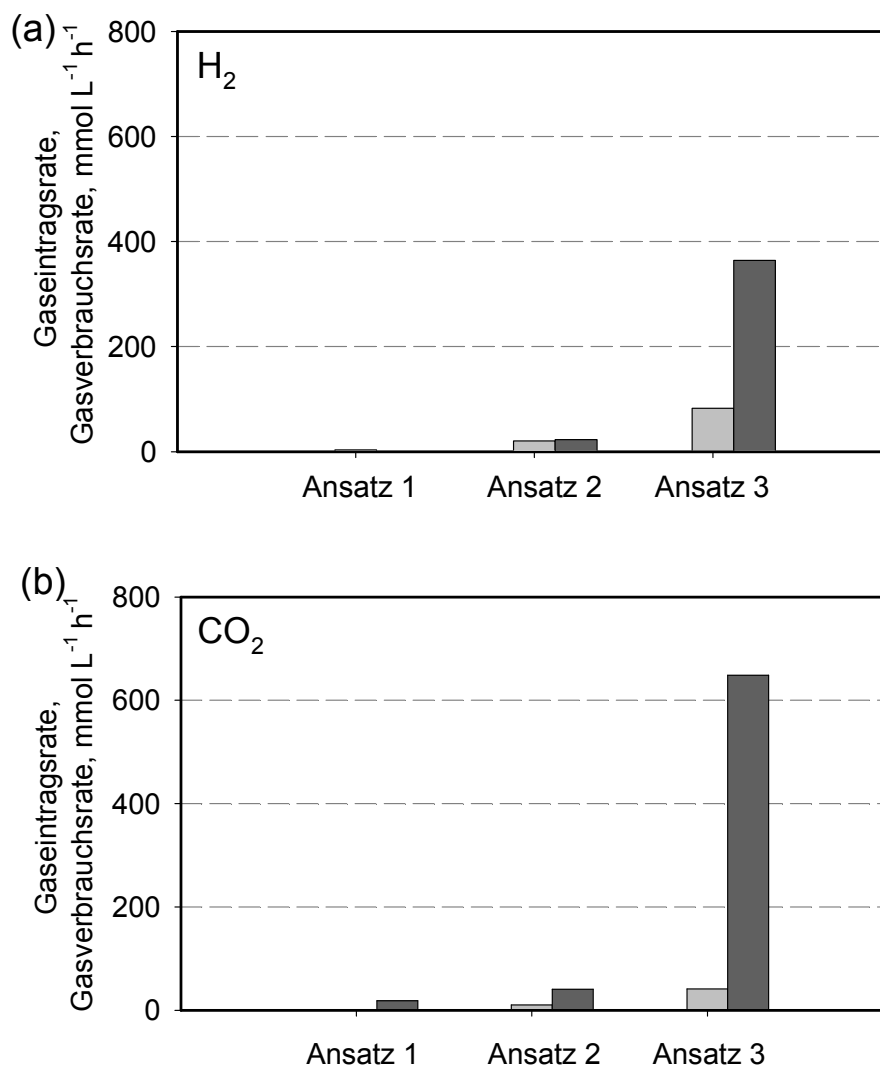


Abbildung 5.7: Vergleich der abgeschätzten maximalen Gaseintragsraten (■) mit aus der Produktbildung abgeschätzte Gasverbrauchsrate (□) für (a) Wasserstoff und (b) Kohlenstoffdioxid bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor in den Ansätzen 1 - 3 (Bedingungen siehe Tabelle 5.2).

Da gezeigt werden konnte, dass der maximale Wasserstoffeintrag bei einer Rührerdrehzahl von 1200 min^{-1} und einem Wasserstoffpartialdruck am Eingang des Reaktors von 1700 mbar um ein Vielfaches höher lag als die ermittelte volumetrische Wasserstoffverbrauchsrate wurde im Folgenden untersucht, ob unter den als maximal ermittelten Betriebsbedingungen ein hoher Wasserstoffpartialdruck für hohe Acetatbildungsraten notwendig ist. Dazu wurde *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen bei einem $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}}$ von 400 mbar und 1700 mbar unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen vergleichend kultiviert.

Wie in Abbildung 5.8a am Verlauf der Biotrockenmassekonzentration zu sehen ist, nimmt diese in beiden Ansätzen mit einer Wachstumsrate von $0,038 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ zu. Dabei wird jedoch im Ansatz mit einem $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}}$ von 400 mbar eine höhere maximale Biotrockenmasse von $2,19 \text{ g L}^{-1}$ im Vergleich zu $1,95 \text{ g L}^{-1}$ im Ansatz mit $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$ erreicht. Anschließend fällt diese im Ansatz mit $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ wieder stärker ab als im Ansatz mit $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$.

Auch die Verläufe der Acetatkonzentrationen in Abbildung 5.8b ähneln sich sehr zu Beginn der Prozesse. Anschließend wird Acetat im Ansatz mit $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$ mit einer maximalen volumetrischen Produktbildungsrate von $28,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ etwas langsamer gebildet als im Ansatz mit $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ ($Q_P = 32,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Dabei werden in beiden Ansätzen ähnliche zellspezifische Produktbildungsraten erreicht ($q_P = 16,1 \pm 0,3 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

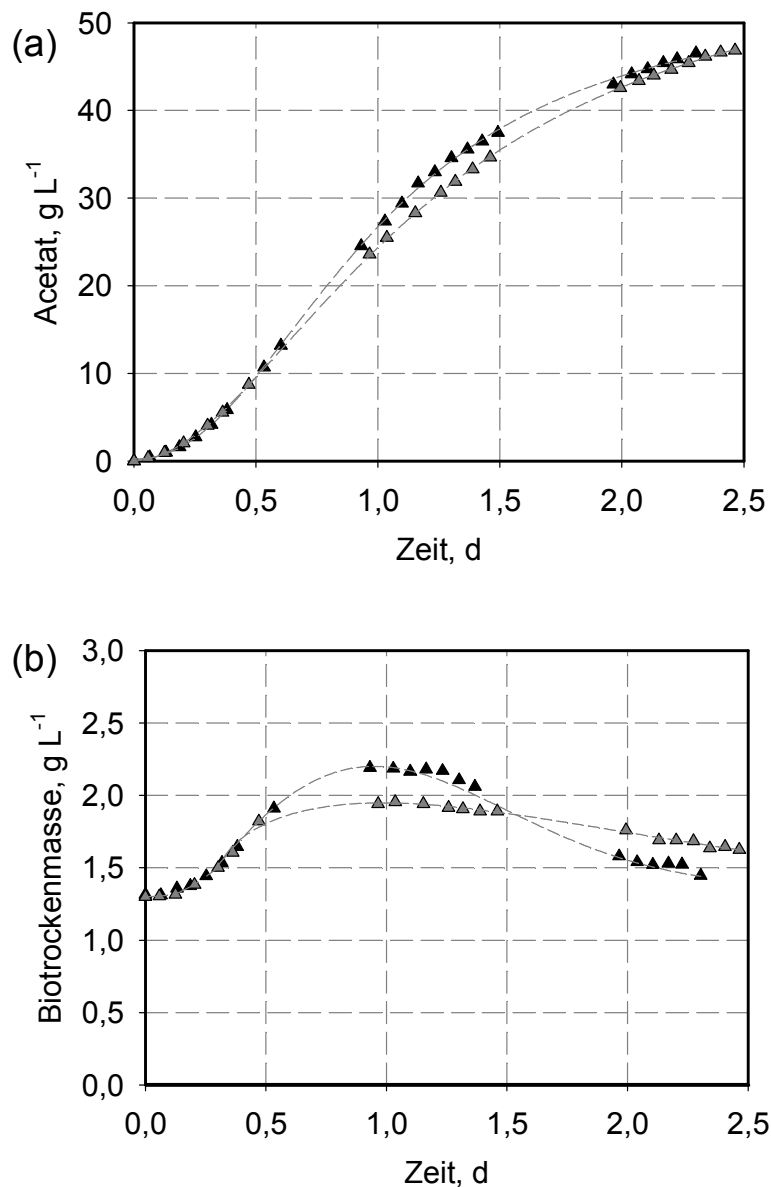


Abbildung 5.8: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei der vergleichenden autotrophen Kultivierung von *A. woodii* bei einem $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}}$ von ($\blacklozenge, \blacktriangle$) 400 mbar und ($\blacklozenge, \blacktriangle$) 1700 mbar unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ (0,5 vvm), $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $p_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Diskussion

Ein Vergleich der in dieser Arbeit abgeschätzten Substrataufnahmeraten mit der für den jeweiligen Betriebspunkt ermittelten maximalen Gaseintragsrate, hat gezeigt, dass eine mögliche Stofftransportlimitierung des gasförmigen Substrats Wasserstoff bei einer Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} durch Erhöhung auf 1200 min^{-1} aufgehoben werden konnte. Bei einer Rührerdrehzahl von 400 min^{-1} lagen die maximal möglichen Gaseintragsraten des Rührkesselreaktors für H_2 sehr nah an den tatsächlich ermittelten volumetrischen Substrat-

aufnahmeraten, was auf eine Stofftransportlimitierung unter diesen Bedingungen hindeuten könnte. Die maximal mögliche Gaseintragsrate für CO₂ lag in allen gezeigten Prozessen deutlich über der ermittelten Substrataufnahmerate, was eine Limitierung dieses gasförmigen Substrats klar ausschließt. Unter Bedingungen mit erhöhter Rührerdrehzahl (1200 min⁻¹) konnte eine Stofftransportlimitierung an Wasserstoff ausgeschlossen werden.

Die ermittelten Gaseintragsraten für die gasförmigen Substrate H₂ und CO₂ sind jedoch nur als Näherung zu sehen. Diese Gaseintragsraten wurden auf der Basis der Sättigungskonzentration des Gases in der Flüssigphase und dem k_La für das jeweilige Gas abgeschätzt. Die Sättigungskonzentrationen der Gase wurden auf der Basis der eingestellten Partialdrücke für das Lösungsmittel Wasser ohne Berücksichtigung der Medienbestandteile berechnet, die zu einer Reduktion der Gelöstkonzentration von Gasen führen können. So kann die Löslichkeit eines Gases in einem typischen Fermentationsmedium zwischen 5 - 25 % niedriger liegen als in reinem Wasser (Doran, 2006). Auch die ermittelten k_La für H₂ und CO₂ können wegen der im letzten Kapitel genannten Gründe zu niedrig liegen, was zu einer Unterschätzung der tatsächlich möglichen Gaseintragsraten führt.

Bei einem Leistungseintrag von 5,5 W L⁻¹ und einer Begasungsrate von 0,5 vvm konnte gezeigt werden, dass ein p_{H₂}^{Eingang} von 400 mbar ausreichend ist. Eine Verringerung des p_{H₂}^{Eingang} von 1700 mbar auf 400 mbar führte zu einer fast identischen Produktbildung unter ansonsten identischen Prozessbedingungen. Dies zeigt, dass der Stofftransport auch unter Bedingungen mit reduziertem p_{H₂} ausreicht, um hohe Acetatbildungsraten zu erreichen. Eine Reduktion des p_{H₂}^{Eingang} macht bei genügend hohem Leistungseintrag einen Überdruck im Reaktionssystem überflüssig. Eine Abschätzung der maximal möglichen HTR (HTR_{max} = 85,7 mmol L⁻¹ h⁻¹) zeigte, dass diese sehr nah an der ermittelten Wasserstoffverbrauchsrate unter diesen Bedingungen (HUR_{max} = 90,7 mmol L⁻¹ h⁻¹) lag. Ein Vergleich des geschätzten k_La(H₂) für diese Bedingungen (k_La(H₂) = 286 h⁻¹) mit einem tatsächlich gemessenem Wert von 869 h⁻¹ unter ähnlichen Prozessbedingungen (n = 1000 min⁻¹, Begasungsrate = 1,0 vvm; Kodama *et al.*, 1976) zeigte jedoch, dass dieser Wert bei diesem hohen Leistungseintrag wahrscheinlich aus Gründen, die schon im vorherigen Kapitel beschrieben wurden, deutlich unterschätzt wurde. Da bei p_{H₂}^{Eingang} = 400 mbar eine ähnliche Acetatbildungsrate erreicht wurde wie bei p_{H₂}^{Eingang} = 1700 mbar, sollte unter diesen Bedingungen keine Limitierung des Stofftransports an Wasserstoff vorliegen. Die verringerte volumetrische Acetatbildungsrate bei p_{H₂}^{Eingang} = 1700 mbar war anscheinend auf die geringere maximale Biotrockenmasse im Vergleich zum Ansatz mit p_{H₂}^{Eingang} = 400 mbar zurückzuführen.

5.3.4 Ermittlung der Substratverbrauchsdaten

In der folgenden Kultivierung wurden die Verbrauchsdaten der gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 bei der autotrophen Acetatbildung im Satzverfahren ermittelt. Dies erfolgte zum einen mit Hilfe der Messung der H_2 - und CO_2 -Konzentrationen im Abgas und zum anderen durch Messung des Abgasvolumenstroms. Um eine zuverlässige Messung des Volumenstroms zu erhalten, muss dieser kontinuierlich sein. Für eine zuverlässige Messung der H_2 - und CO_2 -Konzentrationen muss Stickstoff als Trägergas im Gasstrom mitgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass unter den vorherrschenden Betriebsbedingungen bei einer Rührerdrehzahl von 1200 min^{-1} und einem Volumenstrom von 30 L h^{-1} ein Wasserstoffpartialdruck von 400 mbar im zugeführten Gas ausreicht, um hohe Acetatbildungsdaten zu erreichen. So konnte bei einem pCO_2^{Eingang} von 100 mbar noch ausreichend Stickstoff zum Gasstrom gemischt werden, um eine Messung der H_2 - und CO_2 -Konzentrationen im Abgas zu ermöglichen.

In Abbildung 5.9a ist der Verlauf der Konzentrationen an Biotrockenmasse und Acetat bei einer autotrophen Kultivierung unter nichtlimitierten Bedingungen bezüglich des Gas-Flüssig-Stofftransports dargestellt. Die Biomassekonzentration nahm in der exponentiellen Phase mit einer Wachstumsrate von $0,037 \text{ h}^{-1}$ bis auf $2,2 \text{ g L}^{-1}$ zu und fiel anschließend wieder auf $1,5 \text{ g L}^{-1}$ bei Versuchsende nach 2,3 Tagen. Acetat wurde nach einer kurzen Verzögerungsphase mit einer maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate von $32,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einer zellspezifischen Rate von $16,4 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gebildet.

Der Partialdruck an Wasserstoff im Abgas des Reaktors fällt während dem Prozess von $pH_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ auf $pH_2^{\text{Ausgang}} = 367 \text{ mbar}$ nach 0,6 Tagen (vgl. Abbildung 5.9b). Zur gleichen Zeit fällt der Partialdruck an CO_2 von $pCO_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$ auf $pCO_2^{\text{Ausgang}} = 59 \text{ mbar}$.

In Abbildung 5.9c sind die aus der Abgasmessung ermittelten molaren Substratverbrauchsdaten für H_2 und CO_2 im Vergleich zur molaren Bildungsrate von Acetat dargestellt. Dabei wurden bei einer maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate von $25,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ maximale volumetrische Substratverbrauchsdaten von $60,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für CO_2 und $109,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für H_2 ermittelt.

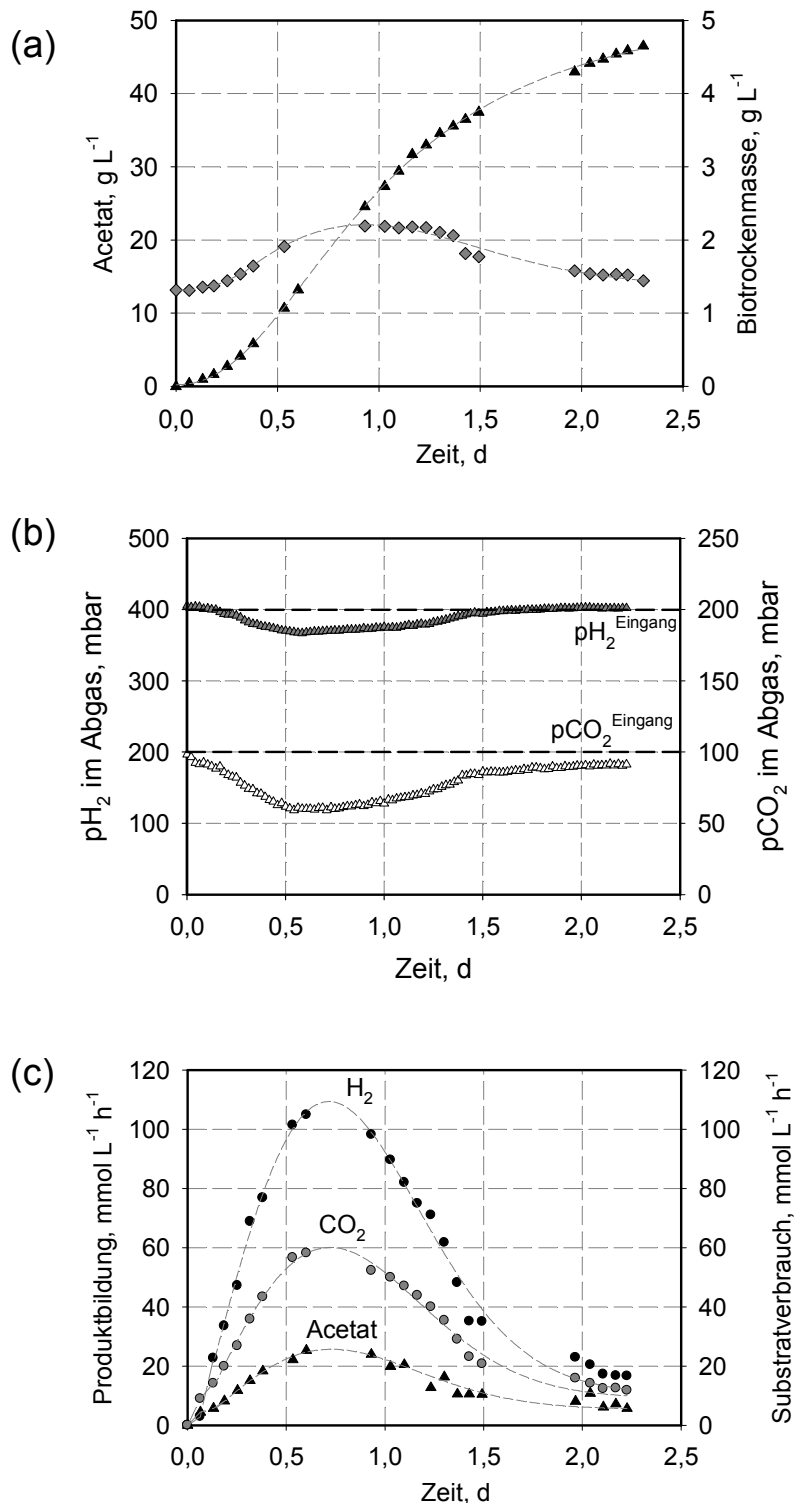


Abbildung 5.9: (a) Verlauf der Konzentrationen an (◆) Biotrockenmasse und (▲) Acetat bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor zur Ermittlung Substratverbrauchsrate bei der autotrophen Acetatbildung ($V_0 = 1,0$ L, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ (0,5 vvm), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $p_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$); (b) Partialdrücke an (▲) H₂ und (▲) CO₂ im Reaktorabgas; (c) ermittelte Raten für die (▲) Acetatbildung und den Substratverbrauch an (●) H₂ und (●) CO₂.

Aus dem Vergleich der über Bilanzierung der Gasphase ermittelten Substratverbrauchsrate mit den aus der Acetatbildung abgeschätzten Raten lässt sich erkennen, dass diese Raten in der exponentiellen Phase bis zu einer Prozesszeit von etwa 0,5 Tagen sehr gut übereinstimmen (vgl. Abbildung 5.10a und b). Auch im weiteren Prozessverlauf sind diese Raten im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbar. Aus den ermittelten Substratverbrauchsrate konnte in der exponentiellen Phase die Stöchiometrie der autotrophen Acetatbildung von *A. woodii* ermittelt werden. Für die Bildung von einem Molekül Acetat unter autotrophen Bedingungen wurden $4,08 \pm 0,08$ Moleküle H_2 und $2,28 \pm 0,12$ Moleküle CO_2 benötigt.

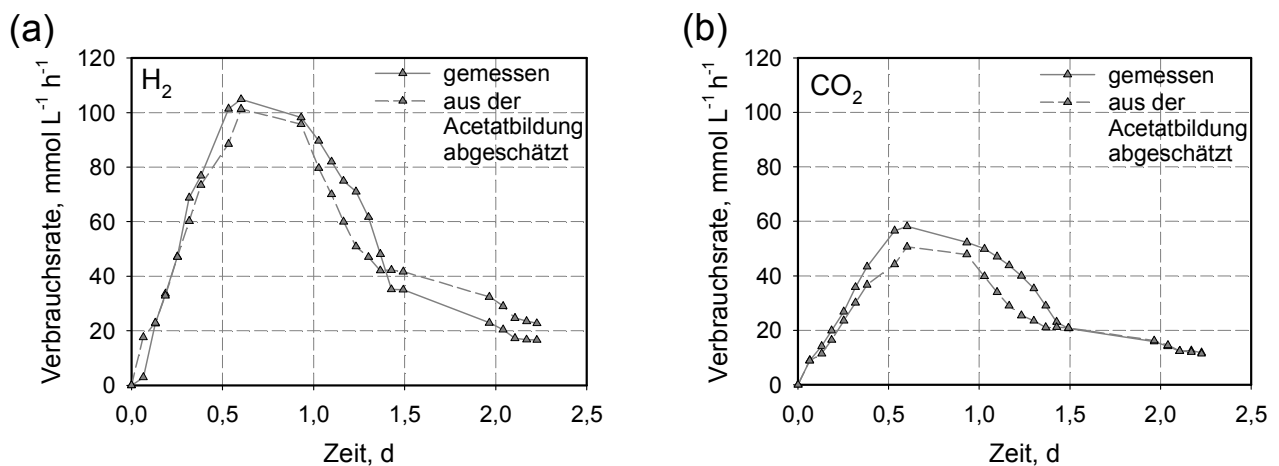


Abbildung 5.10: Vergleich der über Bilanzierung des Gasphase gemessenen Substratverbrauchsrate mit aus der Acetatbildung abgeschätzten Substratverbrauchsrate für (a) Wasserstoff und (b) Kohlenstoffdioxid. Die Substratverbrauchsrate wurden aus der Acetatbildung ohne Berücksichtigung der Biomassebildung bestimmt.

Diskussion

Die ermittelten Koeffizienten von $4,08$ Molekülen H_2 und $2,28$ Molekülen CO_2 für die autotrophe Bildung von einem Molekül Acetat durch *A. woodii* stimmen mit einem Fehler von 2 % für H_2 und 14 % für CO_2 mit der von Balch *et al.* (1977) angegebenen Stöchiometrie von 4 Molekülen H_2 und 2 Molekülen CO_2 für ein Molekül Acetat gut überein. Dieser Fehler kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass die Biomassebildung bei der Ermittlung der Stöchiometrie nicht berücksichtigt wurde. Laut Angaben von Daniel *et al.* (1990) werden etwa 4 % des verbrauchten CO_2 für den Aufbau von Biomasse von *Moorella thermoacetica* verwendet. Wird dies bei der Ermittlung der Stöchiometrie berücksichtigt, so würden sich die die Koeffizienten $3,93$ Moleküle H_2 und $2,21$ Moleküle CO_2 für ein Molekül Acetat ergeben.

5.3.5 Einfluss der Ionenstärke auf den Stofftransport

Der Salzgehalt des Mediums und damit die Ionenstärke übt einen reduzierenden Einfluss auf die Gelöstkonzentration der Sustratgase ("Aussalz-Effekt") und damit auch auf den Stofftransport dieser Gase in die Flüssigkeit aus. Daher muss der Einfluss der Ionenstärke bei autotrophen Kultivierungen mit steigender Konzentration an Elektrolyten wie dem Acetatsalz und der zudosierten Natronlauge berücksichtigt werden. Der Einfluss des Aussalz-Effekts auf die Gaslöslichkeit wurde anhand einer repräsentativen autotrophen Kultivierung untersucht. Der Anstieg der Ionenstärke im Medium wurde auf der Basis des gebildeten Acetats und der zudosierten Natronlauge über Gleichung 3.30 nach Sechenov abgeschätzt. Diese Gleichung basiert auf empirischen Modellen und enthält sowohl Ionen- als auch Gas-spezifische Parameter. Da kein Ionen-spezifischer Wert für Acetat aus der Literatur verfügbar war, wurde stattdessen der Wert für Chloridionen verwendet (Weisenberger und Schumpe, 1996). Die Anwesenheit von Biomasse wurde bei der Abschätzung der Gaslöslichkeit vernachlässigt.

Zu jedem Messpunkt wurde die verminderte Gaslöslichkeit an Hand der gebildeten Menge an Acetat und der zudosierten Menge an Natronlauge ermittelt. Die ermittelten Werte für die reduzierte Gaslöslichkeit sind in Abbildung 5.11 exemplarisch für Wasserstoff dargestellt. Es lässt sich feststellen, dass die Ionenstärke durch die Acetatbildung und die gleichzeitige Zudosierung von Natronlauge während der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* um $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ ansteigt bei einer Acetatkonzentration von $46,5 \text{ g L}^{-1}$ nach 2,3 Tagen (und äquivalent zudosierter Natronlauge). Der Anstieg der Ionenstärke führte zu einer Reduktion der ursprünglichen Sättigungskonzentration um etwa 20 % von $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $0,24 \text{ mmol L}^{-1}$. Für CO_2 wurde unter den gleichen Bedingungen eine ähnliche Reduktion um etwa 20 % von $0,54 \text{ mmol L}^{-1}$ auf $0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion der Gaslöslichkeit führt zu einer ebenso großen Verringerung des Stofftransports der gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 aus der Gas- in die Flüssigphase.

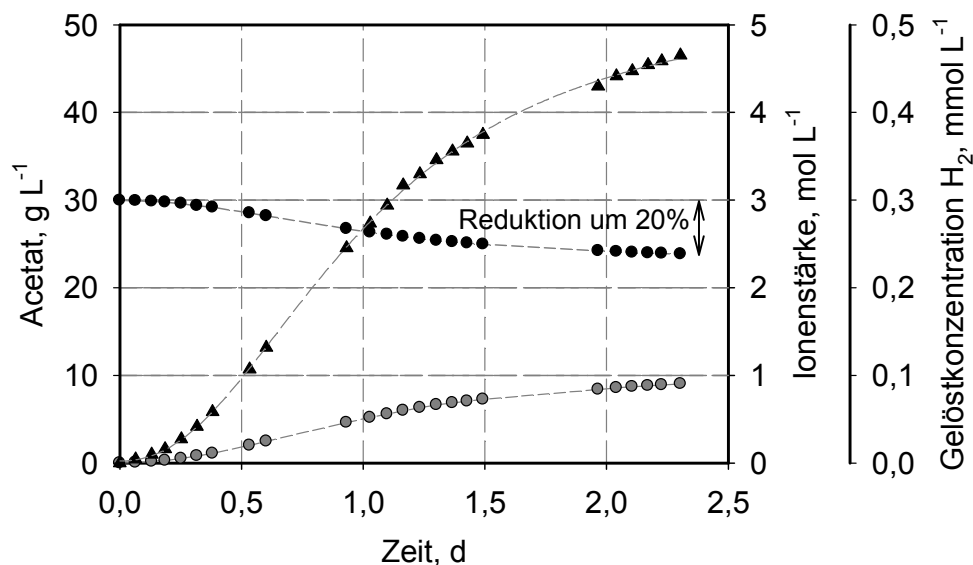


Abbildung 5.11: Verlauf der Acetatkonzentration (▲), der abgeschätzten Ionenstärke (●) und der abgeschätzten Gelöstkonzentration an H₂ (●) für eine repräsentative autotrophe Kultivierung von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L⁻¹), $n = 1200$ min⁻¹, $\dot{V}_g = 30$ L h⁻¹ (0,5 vvm), $p_{H_2}^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $p_{CO_2}^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar).

Diskussion

Anhand der gezeigten Abschätzung der Reduktion der Gaslöslichkeiten an H₂ und CO₂ konnte ermittelt werden, dass die Bildung von Acetat und die gleichzeitige Neutralisierung dieser organischen Säure mit Natronlauge zu einer etwa 20 %-igen Reduktion der Gaslöslichkeit während einer autotrophen Kultivierung mit einer Acetatendkonzentration von etwa 50 g L⁻¹ führt. Es muss dabei jedoch angemerkt werden, dass dies nur als grobe Abschätzung zu sehen ist. Da bisher noch kein Acetat-spezifischer Wert für die Berechnung der Sechenov-Konstante, die ein Maß ist für den Aussalz-Effekt, beschrieben wurde, wurde mit dem Wert für Chlorid-Ionen gerechnet (Weisenberger und Schumpe, 1996).

In Folge der Reduktion der Gaslöslichkeit während der autotrophen Acetatbildung reduziert sich dementsprechend auch der Stofftransport aus der Gas- in die Flüssigphase. Wären die Bakterienzellen stofftransportlimitiert und würden die gasförmigen Substrate mit der maximal möglichen Gaseintragsrate des Rührkesselreaktors verbrauchen, so würde sich die Geschwindigkeit der Acetatbildung als Folge des abfallenden Stofftransports auch verlangsamen. Bei Betrachtung der gezeigten Kultivierung lässt sich jedoch feststellen, dass sich der Abfall der volumetrischen Produktbildungsrate von 32,7 g L⁻¹ d⁻¹ auf 10,2 g L⁻¹ d⁻¹ (Abfall von 69 %) gegen Ende der Fermentation nur zu einem geringen Teil durch die Abnahme der Gaslöslichkeit (Abfall von 20 %) und damit des Gas-Flüssig-Stofftransport erklären lässt.

Denkbar wäre beispielsweise auch ein inhibitorischer Effekt der zudosierten Natrium-Ionen. So zeigten Wang und Wang (1984), dass der Anstieg der Na^+ -Ionen auch zu einem geringen wachstumsinhibierenden Effekt auf das H^+ -abhängige Acetogen *Moorella thermoacetica* geführt hat. Dies könnte auch für das Na^+ -abhängigen Acetogen *A. woodii* zutreffen, dessen bioenergetischer Stoffwechsel auf der Generation eines Na^+ -Gradienten über die Zellmembran basiert (Biegel *et al.*, 2011b). So wird sowohl die Synthese von ATP, als auch die Rotation des Flagellums durch diesen Gradienten angetrieben (Heise *et al.*, 1992; Müller und Bowien, 1995). Der Anstieg der Na^+ -Konzentration im Medium durch Kontrolle des pH mit konzentrierter NaOH konnte dazu führen, dass der Na^+ -Gradient über die Zellmembran nicht mehr aufrechterhalten werden kann, was sich hinderlich auf die essentielle Bildung von ATP auswirken könnte. Dies könnte durch Wechsel des Titrationsmittels auf beispielsweise KOH untersucht werden. K^+ -Ionen können Na^+ nicht in der Ausbildung des Na^+ -Gradienten über die Zellmembran ersetzen und sollten diesen daher auch nicht direkt beeinflussen (Müller und Bowien, 1995).

5.4 Erhöhung der Biomassekonzentration

Unter ausreichend hohem Gaseintragsraten wurde weiterhin ermittelt, ob die volumetrische Acetatbildungsrate durch Erhöhung der Biomassekonzentration im Laborrührkesselreaktor gesteigert werden kann. Standardmäßig wurde bisher in autotrophen Kultivierungen eine Startbiomassekonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ eingesetzt, die als Referenz dient. Außerdem wurde durch Halbierung der eingesetzten Biomassekonzentration ermittelt, ob sich dabei ähnlich hohe Acetatbildungsraten erreichen lassen.

Abbildung 5.12a zeigt, dass in den Ansätzen mit einer Startbiomassekonzentration von $1,3$ und $0,7 \text{ g L}^{-1}$ ein ähnliches Wachstum stattfand, wohingegen im Ansatz mit einer Startbiomassekonzentration von $2,8 \text{ g L}^{-1}$ nur eine Abnahme der Biomasse im Reaktor gemessen werden konnte.

In Abbildung 5.12b zeigt sich, dass sich die Zunahme der Acetatkonzentration in den Ansätzen mit einer Startbiomassekonzentration von $0,7$ und $1,3 \text{ g L}^{-1}$ mit einer maximalen volumetrischen Produktbildungsrate von $32,3 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sehr ähnlich verhielt. Die geringere volumetrische Rate im Ansatz mit einer Startbiomassekonzentration von $0,7 \text{ g L}^{-1}$ ist darauf zurückzuführen, dass die Bakterienzellen eine maximale zellspezifische Produktbildungsrate von $21,0 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht wurde. Mit steigender Biomasse im Reaktor nahm die zellspezifische Rate ab.

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Wachstumsraten und der volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten der vergleichenden Kultivierung von *A. woodii* mit ansteigender Startbiomasse.

c_{x0} , g L ⁻¹	Wachstumsrate μ_{\max} , h ⁻¹	vol. Produktionsrate Q_P , g L ⁻¹ d ⁻¹	zellspez. Produktionsrate q_P , g g ⁻¹ d ⁻¹
0,7	0,035	25,30	20,99
1,3	0,048	32,68	16,38
2,8	-	31,93	12,58

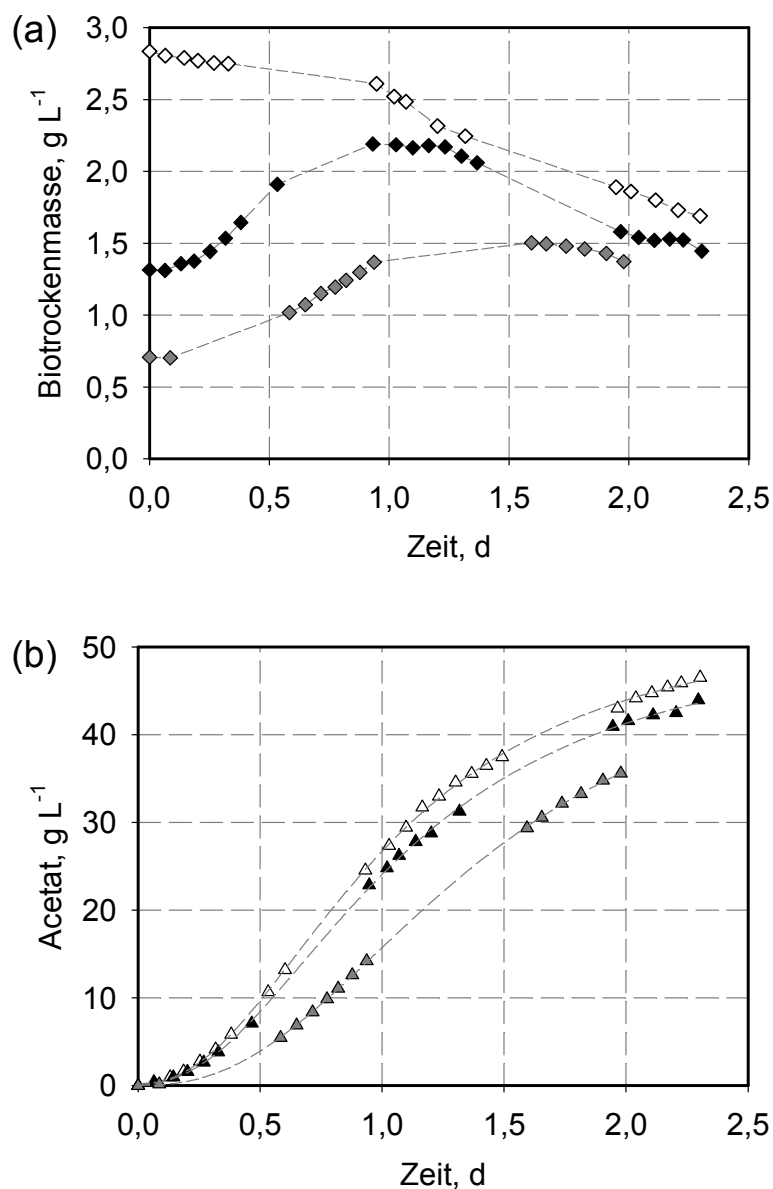


Abbildung 5.12: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei vergleichenden autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* mit einer Startbiomassekonzentration von (\diamond , \blacktriangle) 0,7 g L⁻¹, (\blacklozenge , \blacktriangle) 1,3 g L⁻¹ und (\diamond , \blacktriangle) 2,8 g L⁻¹ unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L⁻¹), $n = 1200$ min⁻¹, $\dot{V}_g = 30$ L h⁻¹ (0,5 vvm), $p_{H_2}^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $p_{CO_2}^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar).

Auch eine weitere Erhöhung der eingesetzten Startbiomasse resultierte in einer vergleichbar hohen volumetrischen Acetatbildungsrate, jedoch nahm die Biomassekonzentration hierbei während der Kultivierung noch stärker ab, als in der hier gezeigten Kultivierung (Daten nicht gezeigt).

Um sicher zu gehen, dass die erreichbare Acetatbildungsgeschwindigkeit nicht durch eine Limitierung des Gas-Flüssig-Stofftransports begrenzt wird, wurde der volumenbezogene Leistungseintrag und die Begasungsrate auf $10,4 \text{ W L}^{-1}$ ($n = 1500 \text{ min}^{-1}$) und $\dot{V}_g = 120 \text{ L h}^{-1}$ ($2,0 \text{ vvm}$) weiter erhöht. In der folgenden Kultivierung wurde untersucht, ob durch weitere Erhöhung des Stofftransports die volumetrische Produktbildungsrate erhöht werden kann. Die Biomassekonzentration lag zu Beginn der Kultivierungen bei $1,3 \text{ g L}^{-1}$.

Abbildung 5.13 zeigt, dass Acetat sowohl im Ansatz mit einer Rührerdrehzahl von 1200 min^{-1} und einer Begasungsrate von 30 L h^{-1} , als auch bei einer Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} und einer vierfach höheren Begasungsrate von 120 L h^{-1} ähnlich schnell gebildet wurde. Dabei wurden vergleichbare volumetrische Produktbildungsraten von $33,7 \pm 1,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Auch der hier nicht gezeigte Verlauf der Biomassekonzentration verhält sich in beiden Ansätzen sehr ähnlich.

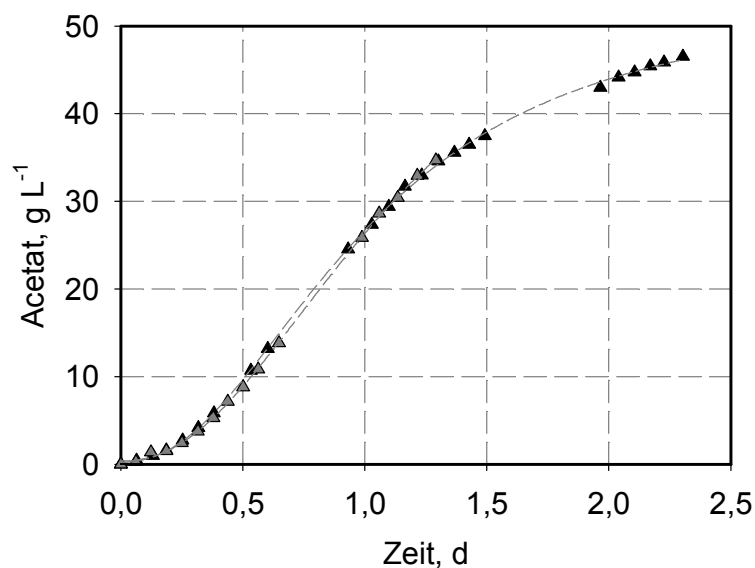


Abbildung 5.13: Verlauf der Acetatkonzentrationen bei der vergleichenden autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* bei unter Bedingungen mit (▲) $n = 1200 \text{ min}^{-1}$ und $V = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$) und (▲) $n = 1500 \text{ min}^{-1}$ und $V = 120 \text{ L h}^{-1}$ ($2,0 \text{ vvm}$) unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Die Geschwindigkeit der Acetatbildung konnte auch bei weiterer Erhöhung des $\text{pH}_2^{\text{Eingang}}$ auf 1500 mbar, des $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}}$ auf 300 mbar und der Startbiomassekonzentration auf $2,8 \text{ g L}^{-1}$ nicht weiter erhöht werden. Dabei wurde wieder eine ähnliche volumetrische Acetatbildungsrate von $32,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht, die zellspezifische Produktbildungsrate lag bei $12,2 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Unter Bedingungen, die als nichtlimitiert bezüglich des Stofftransports angenommen werden, sollte eine Erhöhung der Zelldichte im Rührkesselreaktor zu einer Erhöhung der volumetrischen Produktbildungsrate führen. Dies konnte sowohl von Schmidt und Cooney (1986) mit *Moorella thermoacetica* ATCC 29797, als auch von Morinaga und Kawada (1990) für *Acetobacterium* sp. BR-446 gezeigt werden. Letztere erreichten durch Erhöhung der Zelldichte im Reaktor mit Zellrückhaltung und Erhöhung des Drucks im System auf 2,7 bar sogar eine volumetrische Acetatbildungsrate von $149 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, was mit Acetatbildungsraten in der kommerziellen Herstellung von Speiseessig mit aeroben Essigsäurebakterien vergleichbar ist.

Im Rahmen dieser Arbeiten führte eine Erhöhung der Biomassekonzentration nur bedingt zu einer Erhöhung der volumetrischen Produktivität. So konnte bei einer Biomassekonzentration $< 1 \text{ g L}^{-1}$ zu Beginn der Kultivierung eine maximale zellspezifische Produktbildungsrate von $21 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht werden. Eine Erhöhung der Biomassekonzentration zu Beginn der Kultivierung über 1 g L^{-1} führte zu einer Reduktion der zellspezifischen Rate auf unter $12 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dies zeigt deutlich, dass hier eine Limitierung der Bakterienzellen vorliegt. Eine Limitierung der Versorgung der Zellen mit den gasförmigen Substraten in der Flüssigphase konnte durch Maximierung des in diesem Rührkesselreaktor möglichen Gas-Flüssig-Stofftransports ausgeschlossen werden. Des Weiteren existiert die Möglichkeit der Limitierung von Medienbestandteilen, was im folgenden Kapitel untersucht werden soll.

5.5 Variation des pH

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Acetatbildung durch Variation des pH-Sollwerts gesteigert und eine höhere Acetatendkonzentration erreicht werden kann.

In Abbildung 5.14 sind die Verläufe der Acetatbildung bei pH 7,0 und pH 7,4 während der Prozesse vergleichend dargestellt. Im Referenzansatz bei pH 7,0 wird dabei eine volumetrische Produktbildungsrate von $31,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Die Acetatbildung bei der Kultivierung bei pH 7,4 ähnelte dem Verlauf im Referenzansatz bei pH 7,0, stagnierte aber früher. So waren nach einer Versuchszeit von 1,9 Tagen nur $32,6 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vorhanden im Vergleich zu

40,9 g L⁻¹ im Referenzansatz bei pH 7,0. Der Verlauf der Biomassekonzentration verhielt sich in beiden Ansätzen dabei sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt).

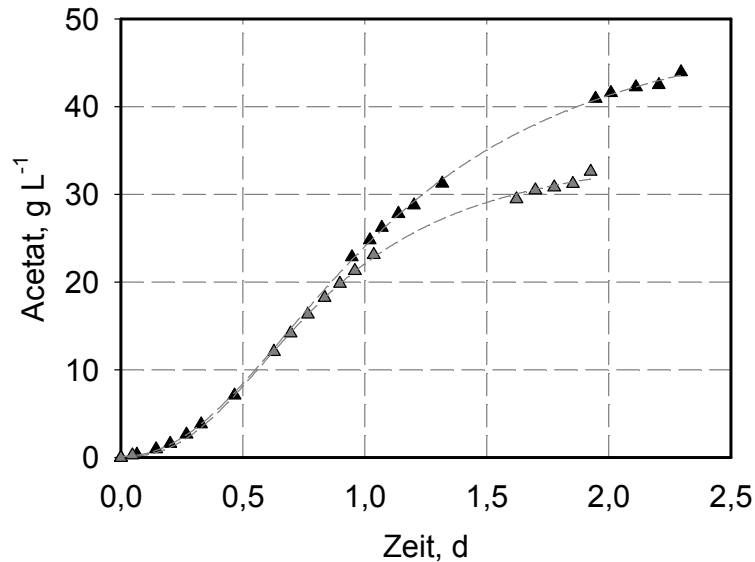


Abbildung 5.14: Verlauf der Acetatkonzentrationen bei der vergleichenden autotrophen Kultivierung von *A. woodii* bei einem pH von (▲) 7,0 und (△) 7,4 unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L⁻¹), $n = 1200$ min⁻¹, $\dot{V}_g = 30$ L h⁻¹ (0,5 vvm), $p_{H_2}^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $p_{CO_2}^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar).

Bei der Kultivierung von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen bei einem pH von 6,8 im Vergleich zu pH 7,0 zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier stagnierte die Acetatbildung deutlich früher als im Ansatz mit pH 7,0 und es wurde bei Versuchsende eine geringere Produktkonzentration im Medium gemessen (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Bei der Produktion von organischen Säuren muss die Inhibierung der Bakterienzellen durch das gebildete Produkt berücksichtigt werden. Das von den Bakterienzellen gebildete Acetat liegt je nach pH des Mediums als Acetat oder als freie Säure vor. Beide Spezies üben dabei einen inhibierenden Effekt auf die Bakterienzellen aus, wobei der Effekt der Essigsäure wesentlich stärker ausgeprägt ist, als der des Acetat-Ions (Wang und Wang, 1984). Standardmäßig wurde *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen bei einem pH von 7,0 kultiviert. Bei diesem pH liegen laut Abbildung 3.1 0,57 % der Essigsäure im Medium in undissoziierter Form vor. Durch Erniedrigung des pH auf pH 6,8 steigt der Anteil der undissoziierten Form der Essigsäure auf 0,9 %. So ist die früher einsetzende Stagnation der Acetatbildung bei pH 6,8 eventuell auf den inhibierenden Effekt der erhöhten Konzentration der undissoziierten Essigsäure zurückzuführen. Durch Erhöhung des pH auf pH 7,4 verringert sich der Anteil der undissoziierten

Essigsäure auf 0,23 %. Daher fällt der inhibierende Effekt der undissoziierten Essigsäure bei diesem pH geringer aus.

Es ist dabei jedoch unklar, wieso die Acetatbildung bei pH 7,4 früher stagniert als bei pH 7,0. Durch Erhöhung des pH von pH 7,0 auf pH 7,4 steigt die Konzentration an Hydrogencarbonat HCO_3^- im Medium bei einem $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}}$ von 100 mbar von $0,58 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,45 \text{ g L}^{-1}$ an. Dies wirkt sich zu Beginn der Kultivierung nicht auf den Verlauf der Acetatkonzentration aus. Im Verlauf des Prozesses könnte sich jedoch die Sekretion von Acetat ins Medium und die gleichzeitige Zudosierung von NaOH in Kombination mit der erhöhten Konzentration an HCO_3^- aus unbekanntem Gründen inhibierend auf die Acetatbildung von *A. woodii* auswirken.

6 Reaktionstechnische Untersuchung einzelner Medienbestandteile

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Medienbestandteile standen parallele Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab zur Verfügung. Da hier nur pH-unkontrollierte Prozesse durchgeführt werden konnten, wurden ausgewählte Reaktionsbedingungen im Litermaßstab im Laborrührkesselreaktor genauer untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss einiger Medienbestandteile unter heterotrophen Bedingungen in Septumflaschen untersucht.

6.1 Vitamine und Spurenelemente

Im folgendem Experiment wurde im Parallelansatz untersucht werden, ob durch Erhöhung der Konzentration des Vitamins Pantothenat im Medium eine verbesserte Acetatproduktion erreicht werden kann. Die im verwendeten Medium standardmäßig enthaltenen $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ D-Ca-Pantothenat wurde schrittweise bis auf maximal $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht.

Abbildung 6.1 zeigt, dass eine ansteigende Konzentration an Pantothenat keinen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. woodii* im Rahmen der Messgenauigkeit hatte. So wurde in allen Ansätzen nach der Kultivierung von 48 Stunden eine Biomassekonzentration von $0,21 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ und eine Acetat-konzentration von $4,9 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ gebildet.

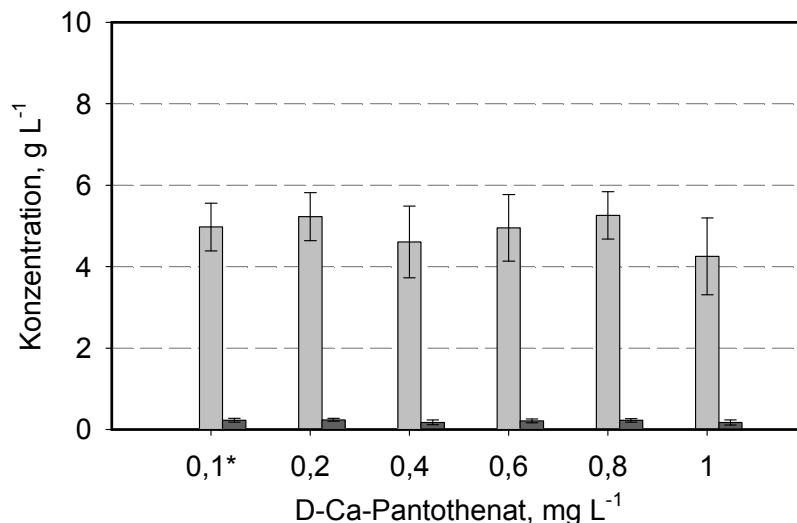


Abbildung 6.1: Gebildete Konzentrationen an Biomasse (■) und Acetat (□) nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* unter pH-unregulierten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren mit ansteigender Konzentration an D-Ca-Pantothenat ($c_{x0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

*: Konzentration an D-Ca-Pantothenat in Medium DSMZ 135.

Im Folgenden wurde im Satzverfahren zum einen untersucht, ob die Spurenelemente Eisen, Selen, Molybdän, Nickel und Magnesium in ausreichenden Mengen im Medium vorhanden sind und zum anderen, ob die Erhöhung der Konzentration der einzelnen Komponenten einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung unter autotrophen Bedingungen ausübt. Die Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente im Standardmedium DSMZ 135 und im erhöhten Ansatz sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Die Konzentrationserhöhung an Fe^{2+} , SeO_3^{2-} und MoO_4^{2-} erfolgten laut den Angaben von Schoberth (1977).

Tabelle 6.1: Konzentration der Spurenelemente Ni^{2+} , SeO_3^{2-} , MoO_4^{2-} , Fe^{2+} , Mg^{2+} im Standardmedium DSMZ 135 und in erhöhter Konzentration.

Spurenelement	DSMZ 135, mg L ⁻¹	erhöht, mg L ⁻¹
Ni^{2+}	$12,3 \cdot 10^{-2}$	$18,7 \cdot 10^{-2}$
SeO_3^{2-}	$3 \cdot 10^{-3}$	$12,4 \cdot 10^{-2}$
MoO_4^{2-}	$13,2 \cdot 10^{-2}$	16,6
Fe^{2+}	0,4	5,4
Mg^{2+}	15,8	78,9

Wie Abbildung 6.2 zeigt, wurden im Referenzansatz nach 48 Stunden $4,1 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und $0,19 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse gebildet. Die Erhöhung der Konzentration an Ni^{2+} hatte unter diesen Bedingungen keinen Effekt auf die Produktbildung. Die Erhöhung der Konzentration an Selenit (SeO_3^{2-}) hatte keinen Einfluss auf die gebildete Konzentration an Biomasse, es wurde jedoch mit $3,5 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ etwas weniger Acetat gebildet als im Referenzansatz. Hierbei kann jedoch auf Grund des großen Fehlers keine eindeutige Aussage getroffen werden. Eindeutig ist jedoch, dass in Anwesenheit einer erhöhten Konzentration an Molybdat (MoO_4^{2-}) mit $0,7 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ erheblich weniger Acetat gebildet wurde als im Referenzansatz. Es konnte keine Zunahme der Biomassekonzentration gemessen werden. Diese lag am Ende des Versuchs sogar unter der eingesetzten Konzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Eine erhöhte Acetatbildung von $5,1 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ konnte hingegen im Ansatz mit erhöhter Konzentration an Fe^{2+} ermittelt werden. Eine leicht erhöhte Acetatkonzentration von $4,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ war auch im Ansatz mit Mg^{2+} vorhanden. In beiden Ansätzen wurden ähnliche Konzentrationen an Biomasse gebildet wie im Referenzansatz.

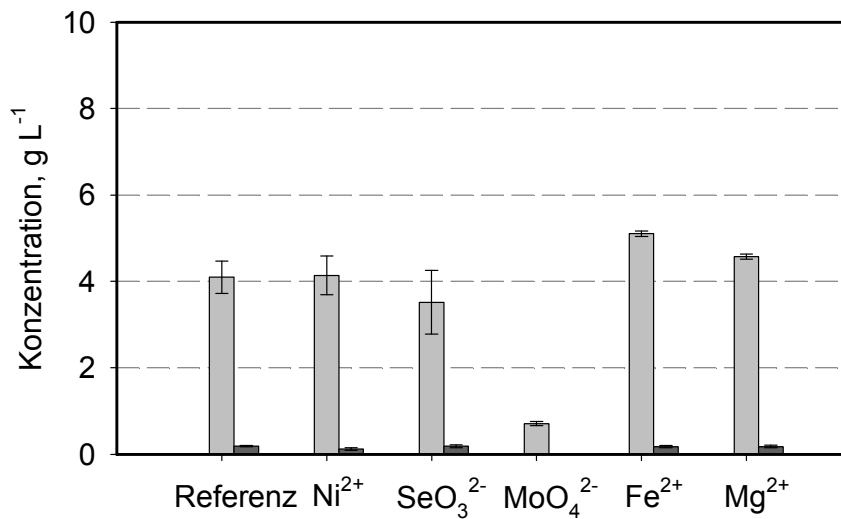


Abbildung 6.2: Konzentrationen an Biomasse (■) und Acetat (□) nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren unter Zusatz der Spurenelemente Ni²⁺, SeO₃²⁻, MoO₄²⁻, Fe²⁺ und Mg²⁺ (Konzentrationen siehe Tabelle 6.1) ($c_{x0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Der pH des Mediums wurde vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO₂ zu gewährleisten. Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Die Beobachtung, dass sich die Erhöhung der Konzentration an Fe²⁺ positiv auf die Acetatbildung unter autotrophen Bedingungen ausgewirkt hat, wurde pH-kontrolliert im Litermaßstab verifiziert. Dazu wurde unter gleichen Versuchsbedingungen die Konzentration an Fe²⁺ wie in der vorherigen Kultivierung im Parallelansatz von 0,4 mg L⁻¹ im Referenzansatz auf 5,4 mg L⁻¹ erhöht.

Die Konzentration an Biotrockenmasse in Abbildung 6.3a im Referenzansatz ohne erhöhte Konzentration an Fe²⁺ nahm innerhalb des ersten Tages von 1,53 auf 1,74 g L⁻¹ zu, blieb bis zu einer Versuchszeit von etwa vier Tagen konstant und nahm anschließend wieder leicht ab. Die Biomassekonzentrationen im Ansatz mit erhöhter Fe²⁺-Konzentration verhielten sich ähnlich.

Am Verlauf der Acetatkonzentrationen in Abbildung 6.3b ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Konzentration an Eisensulfat einen positiven Einfluss auf die Acetatbildung unter autotrophen Bedingungen hatte. So konnte die volumetrische und zellspezifische Produktbildungsrate durch die gesteigerte Konzentration an Eisen(II)-Ionen von 7,3 g L⁻¹ d⁻¹ auf 8,5 g L⁻¹ d⁻¹, beziehungsweise von 4,2 g g⁻¹ d⁻¹ auf 6,1 g g⁻¹ d⁻¹ erhöht werden. Die Erhöhung der zellspezifischen Rate konnte durch die Kultivierung auf Fructose in Anwesenheit einer erhöhten Konzentration an Eisensulfat bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren Kultivierung im Laborrührkesselreaktor wurde die Konzentration an Fe^{2+} weiter auf $25,4 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht. Hierbei wurden identische Wachstums- und Produktbildungsraten erreicht wie mit einer Fe^{2+} -Konzentration von $5,4 \text{ mg L}^{-1}$.

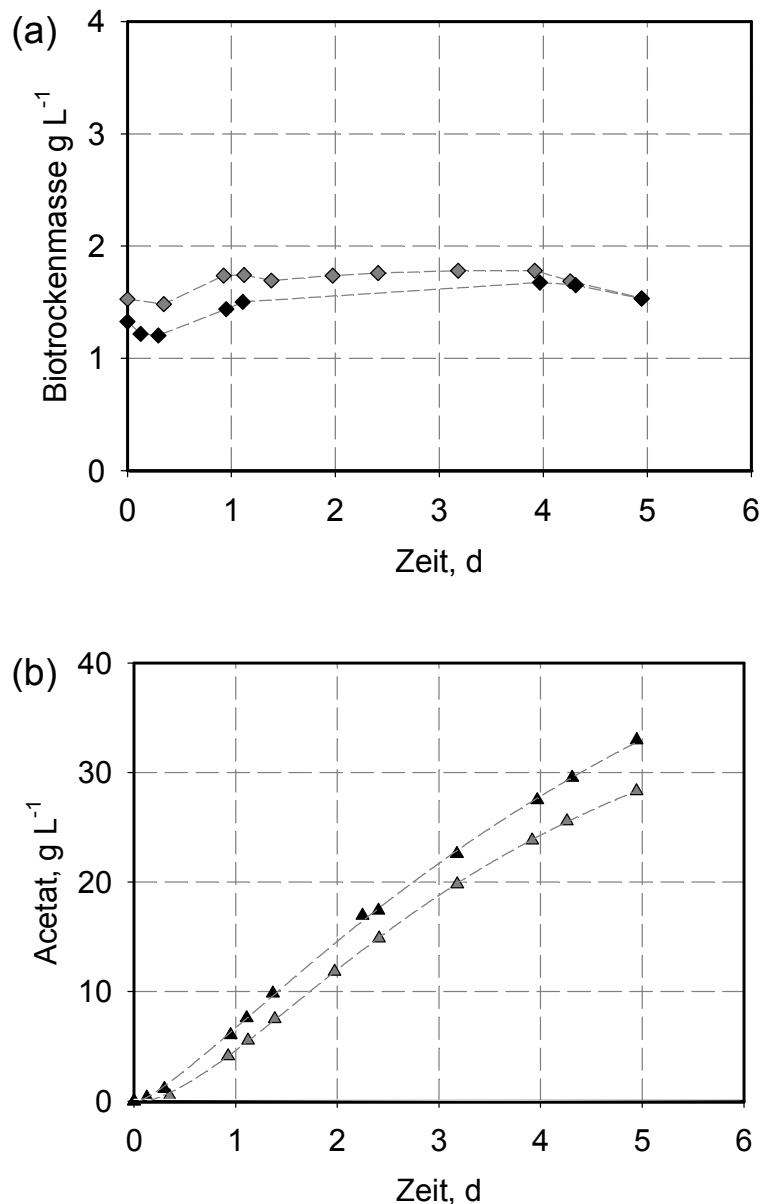


Abbildung 6.3: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* mit einer Fe^{2+} -Konzentration von (\diamond , \triangle) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ und (\blacklozenge , \blacktriangle) $5,4 \text{ mg L}^{-1}$ unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135H, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (6 mol L^{-1}), $n = 400 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 15 \text{ L h}^{-1}$ ($0,25 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,8 \text{ bar}$).

Wie von Schoberth (1977) beschrieben wurden in einer weiteren Kultivierung im Laborrührkesselreaktor die Konzentrationen an Eisen(II)-Ionen, Selenit und Molybdat in Kombination erhöht. Dies führte jedoch zu einer leichten Verminderung der

Acetatbildungsgeschwindigkeit im Vergleich zur alleinigen Konzentrationserhöhung von Fe^{2+} (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurde in einer weiteren Kultivierung der leicht positive Effekt der erhöhten Magnesiumkonzentration aus der Kultivierung im Parallelansatz pH-kontrolliert im Litermaßstab überprüft. Dazu wurde die Konzentration an Mg^{2+} zusätzlich zu Fe^{2+} im Medium erhöht. Dies resultierte jedoch nicht in einer weiteren Erhöhung der Acetatbildungsgeschwindigkeit (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Für *A. woodii* wird beschrieben, dass Pantothenat ein essentieller Bestandteil des Mediums für diesen Organismus darstellt. Eine Kultivierung in Medium, das Pantothenat ($c = 0,05 \text{ mg L}^{-1}$) als einziges Vitamin enthält, war mit starken Wachstumseinbußen möglich (Balch *et al.*, 1977). Eine Erhöhung der Konzentration dieses essentiellen Medienbestandteils im Rahmen dieser Arbeit zeigte im Parallelansatz, dass die im Medium vorhandene Konzentration von $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ unter den gewählten Bedingungen ausreichend war. Pantothenat wird von Acetogenen benötigt, um das Coenzym A zu synthetisieren, das eine wichtige Rolle im Acetyl-CoA-Weg bei der Synthese von Acetat einnimmt (Kundiya *et al.*, 2011). Dabei kann anhand der Daten aus dem Parallelsystem nicht ausgeschlossen werden, dass bei höheren Zelldichten im Laborrührkesselreaktor durch Verbrauch dieses Vitamins eine Limitierung im Verlauf der autotrophen Kultivierung auftritt.

Diekert und Ritter (1982) berichteten, dass das Wachstum von *A. woodii* abhängig von der Konzentration an Nickel im Medium ist. Eine Erhöhung der Konzentration dieses Spurenelements hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Biomasse und Acetat. Daher wird angenommen, dass die im Medium vorhandene Konzentration an Ni^{2+} unter den gewählten Bedingungen ausreichend war. Mg^{2+} ist ein Kofaktor vieler Enzyme des Stoffwechsels und Bestandteil der Zellwand von Bakterien (Gottschalk, 1986). Des Weiteren spielt Mg^{2+} eine Rolle in der Magnesium-abhängigen Phosphorylierung von Acetat durch das Enzym Acetatkinase (Ren *et al.*, 2007). Eine Erhöhung der Konzentration dieses Elements hatte unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung.

Eine Limitierung an Eisenionen im Medium von Acetogenen ist nicht unwahrscheinlich, da am autotrophen Stoffwechsel (Acetyl-CoA-Weg) dieser Mikroorganismen eine Vielzahl an Enzymen beteiligt sind, die Eisen-Schwefel-Cluster in den aktiven Zentren enthalten (Ragsdale und Pierce, 2008). So wurde eine Eisenlimitierung im Medium auch schon für die Acetogene *Clostridium ljungdahlli* und *C. ragsdalei* beschrieben (Phillips *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2011). Schoberth (1977) berichtete, dass die Zugabe einer erhöhten Konzentration an Eisen(II)-Ionen, Selenit und Molybdat einen förderlichen Effekt auf das autotrophe Wachstum und die

Wasserstoffaufnahme von *A. woodii* hat. Die kombinierte Zugabe dieser Spurenelemente wurde dabei in Anlehnung an Arbeiten mit *Moorella thermoacetica* durchgeführt (Andreesen *et al.*, 1973), jedoch ohne die Effekte der einzelnen Komponenten auf den Stoffwechsel genauer zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch selektive Konzentrationserhöhung der einzelnen Komponenten in Anlehnung an die Arbeiten von Schoberth (1977) gezeigt werden, dass der förderliche Effekt auf den Stoffwechsel von *A. woodii* allein auf die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zum Nährmedium zurückzuführen ist. Dieser Effekt fiel bei der autotrophen Kultivierung im Parallelansatz gering aus. Beim Wachstum auf Fructose in diesem System konnte sowohl der Verbrauch an Fructose als auch die Bildung von Biomasse und Acetat durch Zugabe an Eisen(II)-Ionen nahezu verdoppelt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der autotrophen Kultivierung im Laborrührkesselreaktor konnte gezeigt werden, dass die zugegebene Menge von $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ ausreichend war und eine weitere Erhöhung der Konzentration keine Auswirkung hatte.

Der leichte bzw. starke inhibitorische Effekt auf das autotrophe Wachstum in den Ansätzen mit Selenit bzw. Molybdat kann durch die 40-fache (Selenit) beziehungsweise 120-fache Erhöhung (Molybdat) der Konzentration dieser Spurenelemente erklärt werden. Spurenelemente können sich in erhöhter Konzentration im Medium toxisch auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen auswirken (Munoz *et al.*, 1996). Dieser inhibierende Effekt der beiden Spurenelemente konnte durch kombinierte Erhöhung aller drei Substanzen wie von Schoberth (1977) beschrieben fast komplett aufgehoben werden. Da sich gezeigt hat, dass die Konzentration an Eisen(II)-Ionen im Medium nicht ausreichend für den Stoffwechsel von *A. woodii* war, wurde diese folglich für alle folgenden Kultivierungen und für die Vorkulturherstellung im Medium angehoben.

Dass die Optimierung der Konzentration an Spurenelementen im Medium für die autotrophe Kultivierung von Acetogenen von entscheidender Wichtigkeit ist, haben Saxena und Tanner (2011) kürzlich gezeigt. Über die Messung der Aktivitäten einiger wichtiger Enzyme des Stoffwechsels von *C. ragsdalei* konnten die Konzentration einiger limitierender Spurenelemente im Medium für die autotrophe Produktion von Ethanol optimiert werden. Zudem konnte Cu^{2+} als inhibierendes Element identifiziert und aus dem Medium eliminiert werden. Folglich sollte auch durch Messung der Aktivitäten einiger wichtiger Enzyme des Stoffwechsel des in dieser Arbeit verwendeten Organismus *A. woodii* zu einer genaueren Kenntnis des Nährstoffbedarf an Spurenelementen für die autotrophe Acetatbildung führen.

6.2 Hefeextrakt

In einer parallelen Satzkultivierung wurde der Einfluss einer steigenden Konzentration von Hefeextrakt unter autotrophen Bedingungen untersucht. Das standardmäßig eingesetzte Medium DSMZ 135 enthält 2 g L^{-1} Hefeextrakt.

Abbildung 6.4 zeigt die Abhängigkeit des Wachstums und der Acetatbildung von der Hefeextraktkonzentration unter autotrophen Bedingungen. Wurden im Referenzansatz mit 2 g L^{-1} innerhalb von 48 Stunden eine Biomassekonzentration von $0,10 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ gebildet, so konnte dies durch Anwesenheit höherer Konzentrationen an Hefeextrakt auf $0,21 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ($c_{\text{Hefe}} = 4 \text{ g L}^{-1}$) und $0,30 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ für Hefeextraktkonzentrationen $\geq 5 \text{ g L}^{-1}$ erhöht werden. Im Ansatz ohne Hefeextrakt konnte keine Zunahme der Biomassekonzentration festgestellt werden, im Ansatz mit 1 g L^{-1} nur $0,03 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$.

Auch Acetat wurde innerhalb der Versuchszeit von 48 Stunden in Anwesenheit höherer Hefeextraktkonzentrationen deutlich stärker gebildet. Im Referenzansatz lagen bei Versuchsende $2,8 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vor, bei erhöhter Konzentration an Hefeextrakt $4,4 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ ($c_{\text{Hefe}} = 4 \text{ g L}^{-1}$). Und $4,9 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ bei $c_{\text{Hefe}} = 7 \text{ g L}^{-1}$. Im Ansatz mit 1 g L^{-1} Hefeextrakt wurden trotz sehr geringer Biomassebildung in der gleichen Zeit $1,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet, im Ansatz ohne Hefeextrakt konnte kein Acetat im Medium nachgewiesen werden.

Wurde derselbe Versuch mit ansteigender Hefeextraktkonzentration unter heterotrophen Bedingungen mit 10 g L^{-1} Fructose durchgeführt, so konnte auch im Ansatz ohne Hefeextrakt Wachstum und Produktbildung festgestellt werden. Auch hier war ein förderlicher Effekt der ansteigenden Konzentration an Hefeextrakt im Medium zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

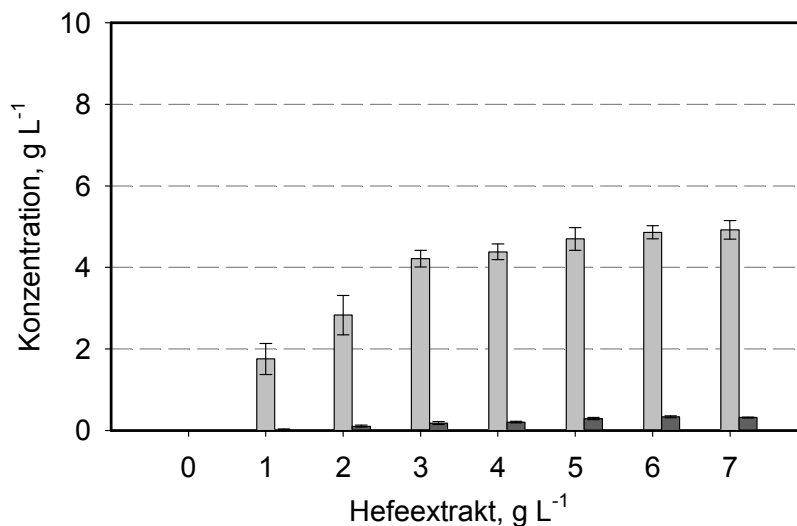


Abbildung 6.4: Konzentrationen an (■) Biomasse und (□) Acetat nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* unter pH-ungeordneten Bedingungen im System aus parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren mit ansteigender Konzentration an Hefeextrakt ($c_{\text{X}0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Der pH des Mediums wurde vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO_2 zu gewährleisten. Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Des Weiteren wurde der positive Einfluss von Hefeextrakt auf das autotrophe Wachstum unter pH-kontrollierten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor verifiziert. Dazu wurde die standardmäßig im Medium DSMZ 135H vorhandene Hefeextraktkonzentration von 4 g L^{-1} auf 10 g L^{-1} erhöht.

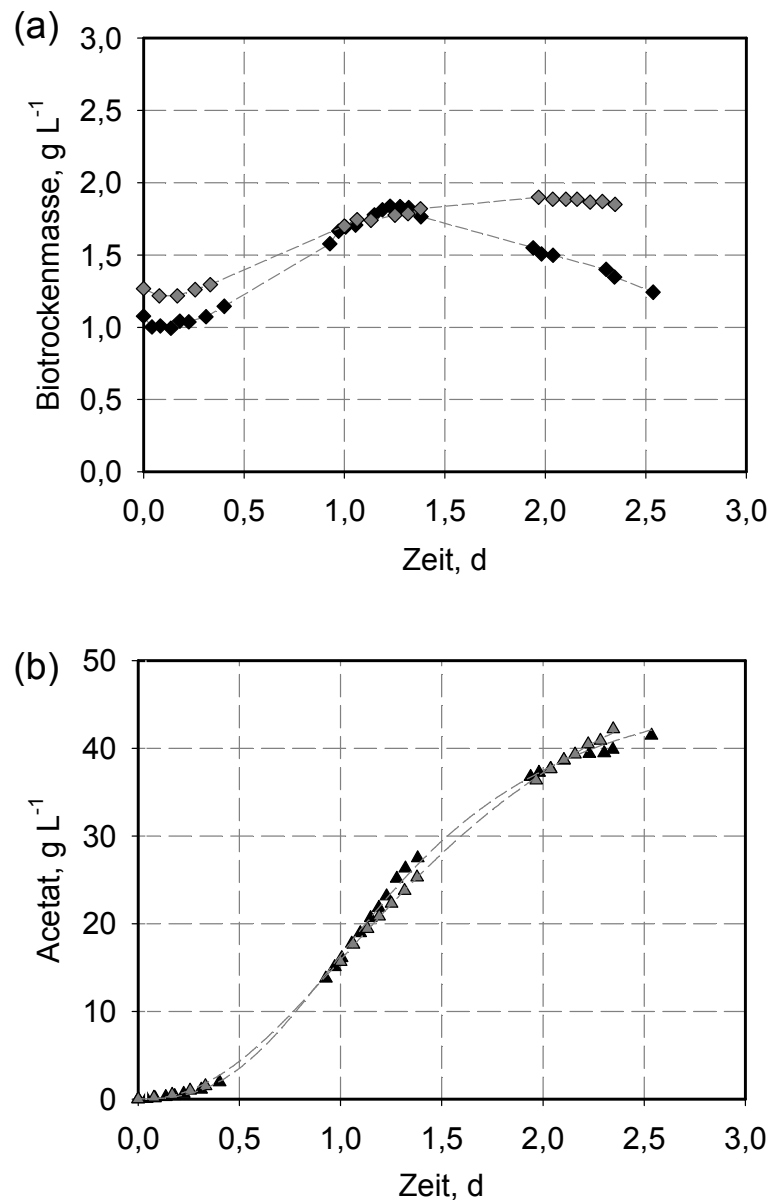


Abbildung 6.5: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* mit einer Hefeextraktkonzentration von (\blacklozenge , \blacktriangle) 4 g L^{-1} und (\blacklozenge , \blacktriangle) 10 g L^{-1} unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,8 \text{ bar}$).

Wie in Abbildung 6.5a zu sehen ist, nimmt die Konzentration der Biomasse im Referenzansatz mit 4 g L^{-1} Hefeextrakt mit einer Wachstumsrate von $0,024 \text{ h}^{-1}$ etwas schneller zu als im Ansatz

mit 10 g L^{-1} Hefeextrakt ($\mu_{\max} = 0,017 \text{ h}^{-1}$). Der anschließende Abfall der Biomassekonzentration ist jedoch bei erhöhter Konzentration an Hefeextrakt nicht zu sehen. Hier nimmt die Konzentration der Biomasse erst nach etwa zwei Tagen wieder leicht ab.

Die Acetatkonzentration in beiden Ansätzen in Abbildung 6.5b verhält sich während des gesamten Kultivierungszeitraums mit Produktbildungsraten von $28,1 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (volumetrisch) und $16,2 \pm 0,9 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (zellspezifisch) ähnlich.

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass Hefeextrakt für das autotrophe Wachstum von *A. woodii* unbedingt notwendig ist. In Anwesenheit des energiereichen Substrats Fructose ist reduziertes Wachstum und Acetatbildung auch ohne Hefeextrakt möglich. In beiden Fällen ist die Anwesenheit einer erhöhten Konzentration dieses komplexen Medienbestandteils auf den Stoffwechsel von *A. woodii* förderlich. Die im Rahmen dieser Arbeit für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor standardmäßig enthaltene Konzentration an Hefeextrakt im Medium zeigte sich als ausreichend. Durch Erhöhung der Hefeextraktkonzentration konnte keine Erhöhung der Acetatbildungsrate erreicht werden, jedoch blieben die Bakterienzellen länger in der stationären Phase, was auf eine Limitierung eines Bestandteils des Hefeextrakts während der autotrophen Kultivierung hindeuten könnte. Da viele Acetogene einen noch unbekanntem Nährstoffbedarf haben (Drake *et al.*, 2006), könnte die richtige Dosierung von Hefeextrakt für eine Prozessoptimierung eine wichtige Rolle spielen.

6.3 Schwefelquellen

Zunächst wurde im Litermaßstab im Laborrührkesselreaktor untersucht, ob sich eine Erhöhung der Schwefelquelle L-Cystein im Medium förderlich auf Wachstum und Produktbildung auswirkt. Dazu wurde die im Medium standardmäßig vorhandene Konzentration an L-Cystein Hydrochlorid (L-Cys HCl) von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $2,5 \text{ g L}^{-1}$ erhöht und Wachstum und Produktbildung verfolgt. Gestartet wurden die Kultivierungen mit einer Biomassekonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$.

Am Verlauf der Konzentrationen der Biomasse in Abbildung 6.6a zeigt sich, dass das Wachstum im Referenzansatz mit $0,5 \text{ g L}^{-1}$ L-Cys HCl etwas früher als bei erhöhter Konzentration dieser Substanz eingesetzt hat. So wird in beiden Ansätzen eine ähnliche maximale Biomassekonzentration von $2,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, im Referenzansatz jedoch eine etwas höhere Wachstumsrate von $0,039 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,026 \text{ h}^{-1}$ bei erhöhter Konzentration an L-Cys HCl.

Auch die Acetatbildung setzte im Referenzansatz etwas früher ein als im Ansatz mit erhöhter L-Cys-Konzentration (Abbildung 6.6b). In der Phase maximaler Produktion wurden in beiden Ansätzen ähnliche Raten von $28,1 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (volumetrisch) und $15,4 \pm 0,4 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Bei Versuchsende nach etwa 2,5 Tagen war in beiden Ansätzen eine Acetatkonzentration von $46,5 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ vorhanden.

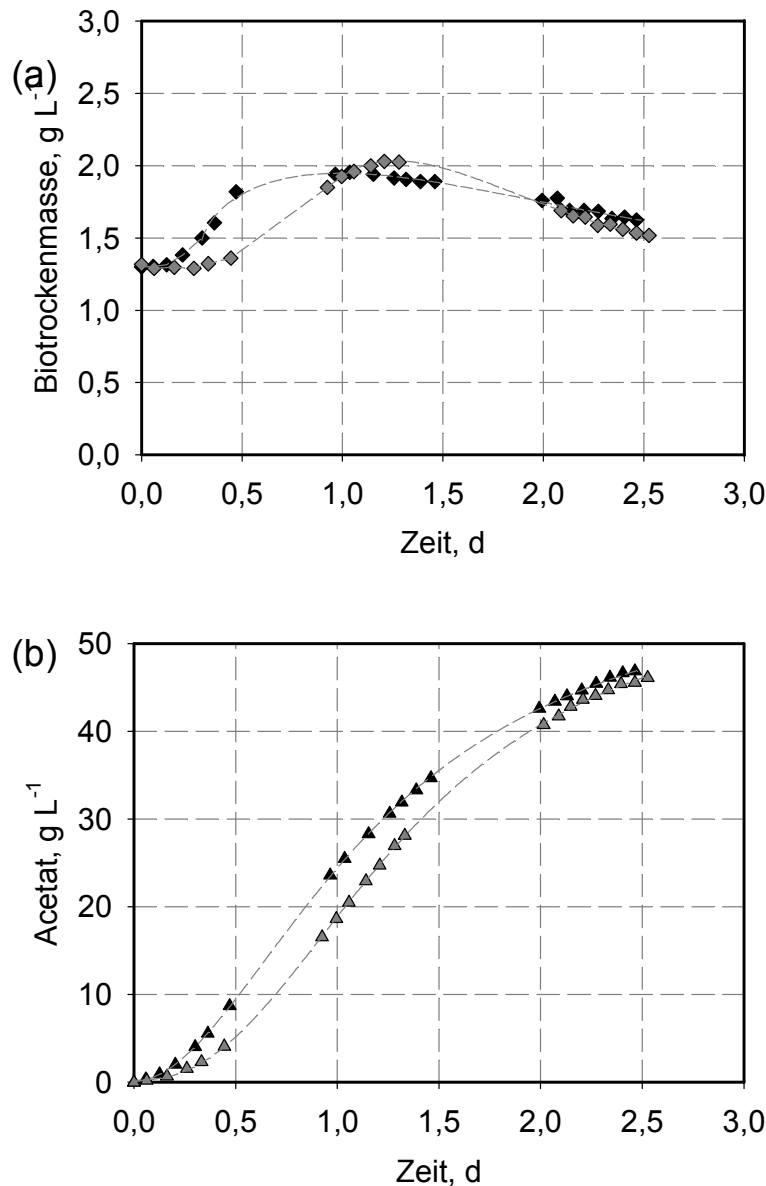


Abbildung 6.6: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei autotrophen Kultivierung von *A. woodii* mit (\blacklozenge , \blacktriangle) $0,5 \text{ g L}^{-1}$ und (\blacklozenge , \blacktriangle) $2,5 \text{ g L}^{-1}$ L-Cys HCl unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,8 \text{ bar}$).

Des Weiteren wurde im Parallelansatz untersucht, ob zusätzlich zu L-Cystein weitere lösliche Schwefelquellen für die autotrophe Acetatbildung mit *A. woodii* in Frage kommen. L-Cystein

wird in anaeroben Prozessen oft in Kombination mit Natriumsulfid als Schwefelquelle und Reduktionsmittel eingesetzt. So wurde untersucht, ob die löslichen Schwefelquellen Sulfit und Thiosulfat für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* in Frage kommen. Diese Schwefelquellen wurden in einer Konzentration eingesetzt, so dass der molare Anteil an Schwefel äquivalent war zum ursprünglich im Medium vorhandenen Natriumsulfid in der Konzentration $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

Abbildung 6.7 zeigt, dass eine Biomassekonzentration von $0,16 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ sowohl im Referenzansatz als auch im Ansatz mit Thiosulfat nach 48 Stunden gebildet wurde. Im Ansatz mit Sulfit konnte innerhalb der Versuchszeit weder eine Zunahme der Konzentration an Biomasse noch an Acetat gemessen werden. Die Acetatkonzentration lag im Referenzansatz nach 48 h bei $4,3 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ und im Ansatz mit Thiosulfat bei $3,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$. Wurde kein Natriumsulfid und nur L-Cystein im Medium eingesetzt, so war unter autotrophen Bedingungen kein Unterschied der Bildung an Biomasse und Acetat festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Parallel zur autotrophen Kultivierung im Parallelrührkesselreaktorsystem wurde der Einfluss der alternativen Schwefelquellen unter heterotrophen Bedingungen in Septumflaschen untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Ersatz von Sulfid sowohl durch Sulfit als auch durch Thiosulfat einen förderlichen Effekt auf das Wachstum und die Produktbildung mit Fructose als Kohlenstoffquelle hatte (Daten nicht gezeigt).

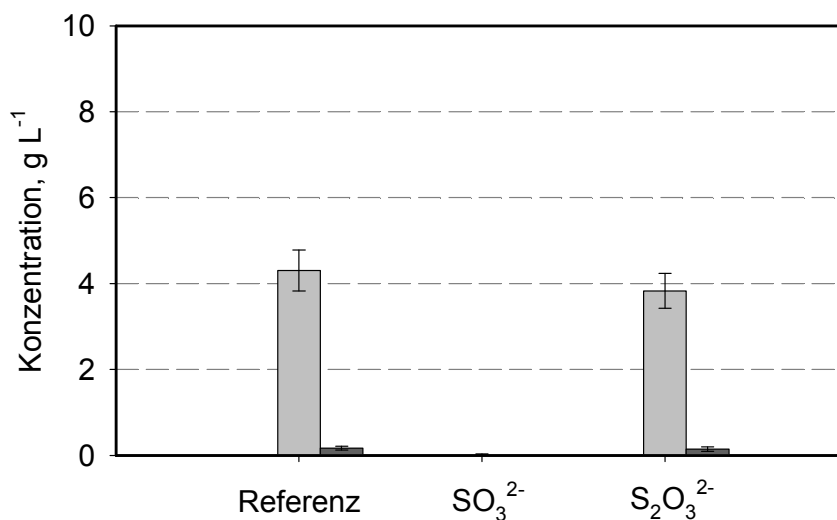


Abbildung 6.7: Konzentrationen an Biomasse (■) und Acetat (□) nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* mit den zusätzlichen Schwefelquellen Sulfit ($c(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 0,51 \text{ g L}^{-1}$) und Thiosulfat ($c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,81 \text{ g L}^{-1}$) unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren ($c_{\text{X}0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Der pH des Mediums wurde vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO_2 zu gewährleisten.

Diskussion

Es wurde vermutet, dass im Verlauf der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* möglicherweise eine Limitierung einer Schwefelquelle auftreten könnte, da im Medium vorhandenen Schwefelquellen Natriumsulfid und L-Cystein den Mikroorganismen im Verlauf des autotrophen Prozesses nicht mehr zur Verfügung stehen. So zeigten Hu *et al.* (2010), dass im Medium gelöstes Sulfid in begasteten Reaktoren in Abhängigkeit des pH innerhalb kürzester Zeit durch Ausgasen von Wasserstoffsulfid verloren geht. Koesnandar *et al.* (1990) haben zudem beim Wachstum des Acetogens *Moorella thermoacetica* eine Abnahme von L-Cystein im Medium festgestellt. Eine Erhöhung der im Medium vorhandenen Schwefelquelle L-Cystein in dieser Arbeit führte in beiden Ansätzen zu ähnlichen Wachstums- und Produktbildungsrate. Im Ansatz mit erhöhter Konzentration an L-Cystein wurde jedoch eine Verzögerung des Wachstums und der Acetatbildung beobachtet, was auf das veränderte Redoxpotential des Mediums zurückzuführen sein kann. Neben der Funktion als Schwefelquelle dient L-Cystein in anaeroben Medien als Reduktionsmittel, um Reste an Sauerstoff zu entfernen und das Redoxpotential des Mediums für optimales Wachstum von anaeroben Mikroorganismen zu senken (Hu *et al.*, 2010). Eine Veränderung des Redoxpotentials des Mediums kann sich auf die Aktivität einiger Enzyme auswirken, die gegenüber dem Redoxpotential sensitiv sind (van Dijk und Veeger, 1981). So zeigte sich beispielsweise, dass die CO-Dehydrogenase des anaeroben Bakteriums *Rhodospirillum rubrum* gegenüber Änderungen des Redoxpotentials sensitiv ist (Heo *et al.*, 2001). Unterhalb eines Reduktionspotentials von -480 mV wurde die maximale Aktivität dieses Enzyms gemessen, wohingegen es bei einem Reduktionspotential größer -300 mV keine Aktivität mehr aufwies.

Am Stoffwechsel der acetogenen Mikroorganismen sind die redoxsensitiven Enzyme Hydrogenase und CO-Dehydrogenase beteiligt, daher sollte das Redoxpotential des Mediums während der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* überwacht und gegebenenfalls durch Zugabe von Reduktionsmitteln konstant gehalten werden. Durch Verbrauch von L-Cystein im Medium könnte ein optimales Redoxpotential des Mediums für die autotrophe Produktion von Acetat mit *A. woodii* nicht mehr gegeben sein, so dass durch Reduktion von Enzymaktivitäten der Stoffwechsel zum Erliegen kommt.

Bei der Suche nach zusätzlichen Schwefelquellen wurde festgestellt, dass sich Thiosulfat für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* eignet, Sulfit jedoch nicht. Beide Schwefelquellen können von diesem Bakterium beim Wachstum auf organischen Schwefelquellen verwendet werden, was von Heijthuijsen und Hansen (1989) beschrieben und durch Wachstumsversuche in Septumflaschen in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Warum der Stoffwechsel von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen durch die Anwesenheit von Sulfit komplett inhibiert wird, kann an dieser Stelle nicht erklärt werden. Möglich wäre, dass das Redoxpotential des Mediums durch die Reaktion von Sulfit mit Wassermolekülen zu Sulfat ($E'_0 = -280$ mV;

Gottschalk, 1986) angehoben wird, so dass der Stoffwechsel von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen nicht mehr ablaufen kann. Es wird vermutet, dass dieser Effekt in Anwesenheit energiereicher Hexosen geringer ausfallen könnte und der Stoffwechsel daher normal abläuft.

6.4 Wachstum und Produktbildung in konzentrierten Medien

Auf der Basis der gezeigten Ergebnisse wurde das Medium DSMZ 135 für die autotrophe Kultivierung im Laborrührkesselreaktor modifiziert. Es wurden dabei die Konzentrationen an Hefeextrakt, Vitaminen und Spurenelementen im Vergleich zum Standardmedium verdoppelt und die Konzentration an Eisen(II)-Ionen von 0,4 auf 5,4 mg L⁻¹ erhöht. Es wurden anhand einer vergleichenden Kultivierung unter pH-kontrollierten Bedingungen im ursprünglichen und im veränderten Medium die Auswirkungen auf das Wachstum und die Produktbildung von *A. woodii* dargestellt.

Außerdem wurde untersucht, ob eine Verdopplung der genannten Medienbestandteile im Medium DSMZ 135HF(2x) eine weitere Erhöhung des Wachstums und der Acetatbildung zur Folge hat. Die Konzentrationen der genannten Medienbestandteile sind für das ursprüngliche Medium DSMZ 135 und die modifizierten Medien in Tabelle 6.2 beschrieben.

Tabelle 6.2: Variation der genannten Medienbestandteile in den eingesetzten Medien; die Zusammensetzung Medium 1 entspricht den den Vorgaben der DSMZ für das Medium DSMZ 135. In den Medien 2 und 3 wurden nur die genannten Bestandteile wie angegeben verändert, die Konzentrationen der übrigen Bestandteile entsprechen dem Medium 1.

	Einheit	DSMZ 135	DSMZ 135HF*	DSMZ 135HF(2x)
Hefeextrakt	g L ⁻¹	2	4	8
Fe ²⁺	mg L ⁻¹	0,4	5,4	10,8
Spurenelementlösung	mL L ⁻¹	20	40	80
Vitaminlösung	mL L ⁻¹	20	40	80

*: Das Medium DSMZ 135HF ist das modifizierte Medium für autotrophe Kultivierungen in dieser Arbeit.

Das Wachstum startete im modifizierten Medium DSMZ 135HF deutlich früher als im ursprünglichen Medium DSMZ 135 und es wurde mit 0,87 g L⁻¹ eine höhere Zunahme der Biomassekonzentration gemessen als im Medium DSMZ 135 mit 0,31 g L⁻¹ (vgl. Abbildung 6.8a). Ein ähnliches Bild zeigte sich am Verlauf der Acetatkonzentrationen in beiden Kultivierungen. Im Ansatz mit verändertem Medium DSMZ 135HF wurde dabei eine etwa dreimal höhere volumetrische Produktbildungsrate als im ursprünglichen Medium DSMZ 135 erreicht (vgl. Tabelle 6.3). Auch die zellspezifische Produktbildungsrate war im modifizierten Medium doppelt so hoch wie im ursprünglichen Medium. In der Kultivierung mit verändertem

Medium 2 lag nach einer Prozesszeit von 2,3 Tagen mit einer Konzentration von $46,5 \text{ g L}^{-1}$ mehr als die doppelte Menge an Acetat vor wie im Ansatz mit Medium DSMZ 135.

Tabelle 6.3: Zusammenfassung der Wachstumsraten und der volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsrate der vergleichenden Kultivierung von *A. woodii* in den Medien DSMZ 135, DSMZ 135HF, DSMZ 135HF(2x).

Medium	Wachstumsrate μ_{\max} , h^{-1}	vol. Produktionsrate Q_P , $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	zellspez. Produktionsrate q_P , $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
DSMZ 135	0,016	10,97	8,00
DSMZ 135HF	0,042	32,68	16,38
DSMZ 135HF(2x)	-	29,92	16,59

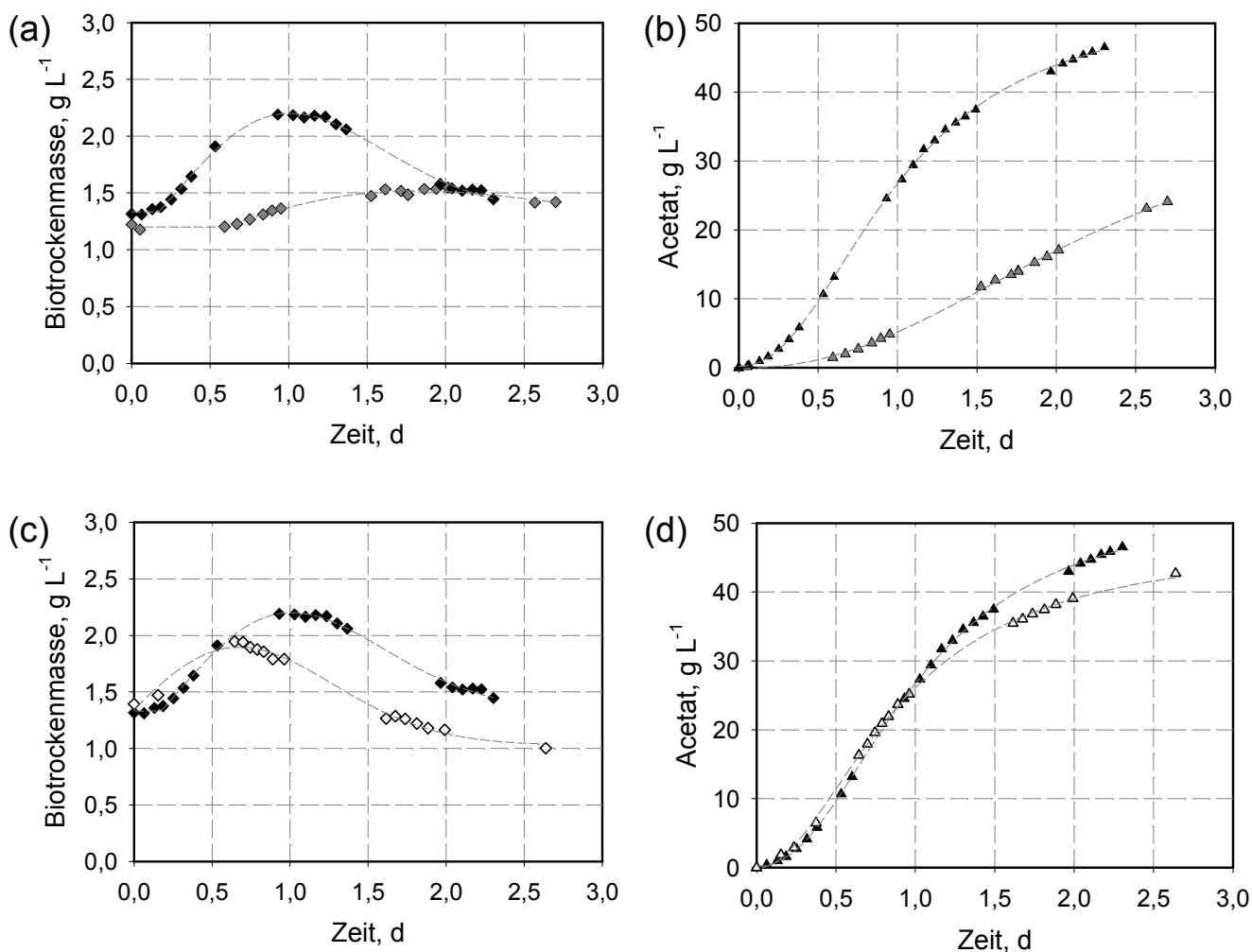


Abbildung 6.8: Verlauf der Konzentrationen an (a), (c) Biotrockenmasse und (b), (d) Acetat bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* in Medium DSMZ 135 (◇, ▲) und Medium DSMZ 135HF (◆, ▲) und Medium DSMZ 135HF(2x) (◇, ▲) unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ (0,5 vvm), $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $p_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Durch Verdopplung aller genannten Medienbestandteile im Medium DSMZ 135HF(2x) (siehe Tabelle 6.2) wurde untersucht, ob die Produktbildungsraten unter den gleichen Prozessbedingungen weiter erhöht werden können. Abbildung 6.8c zeigt jedoch, dass sich die Biomassebildung in der Anfangsphase in beiden Medien zwar ähnlich verhielt, im Ansatz mit Medium DSMZ 135HF(2x) früher in die stationäre Phase übergang als im Medium DSMZ 135HF. Wie in Abbildung 6.8d zu erkennen ist, verhielt sich auch die Acetatbildung in der Anfangsphase sehr ähnlich, bis sich diese nach etwa einem Tag im Ansatz mit Medium DSMZ 135HF(2x) deutlich verlangsamte.

Da vermutet wurde, dass andere Medienbestandteile neben den oben genannten limitierend sein könnten, wurde alle Bestandteile des standardmäßig für autotrophe Kultivierungen im Laborreaktor eingesetzte Medium 2 komplett verdoppelt eingesetzt. Bei der Kultivierung in diesem konzentrierten Medium unter maximalen autotrophen Bedingungen zeigten sich dabei im Vergleich zum standardmäßig eingesetzten Medium jedoch nahezu identische Verläufe der Konzentrationen an Biotrockenmasse und Acetat. Eine frühere Stagnation der Acetatbildung wie in Abbildung 6.8d zu sehen, konnte hier jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige im ursprünglich eingesetzten Medium DSMZ 135 enthaltenen Bestandteile identifiziert werden, die für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor unter maximalen Gaseintragsraten nicht ausreichend vorhanden waren. Durch selektive Erhöhung der Konzentrationen an Hefeextrakt, Vitaminen, Spurenelementen und Eisen(II)-Ionen konnte eine deutliche Steigerung der Biomasse- und Acetatbildung bei einem volumenbezogenen Leistungseintrag von $5,5 \text{ W L}^{-1}$ erreicht werden. Durch weitere Erhöhung der als limitierend ermittelten Bestandteile konnte in der Anfangsphase ein identischer Verlauf der Acetatbildung beobachtet werden, jedoch trat hier eine verfrühte Stagnation der Acetatbildung ein. Dies kann auf toxische Effekte erhöhter Konzentrationen einiger Spurenelemente auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen zurückzuführen sein (Munoz *et al.*, 1996).

Auch die Aufkonzentrierung des kompletten Mediums für autotrophe Kultivierungen brachte keine Steigerung der Geschwindigkeit des Wachstums und der Produktbildung mit sich. Bei der unselektiven Aufkonzentrierung eines Mediums können positiven Effekte einiger Medienbestandteile durch inhibierende Effekte anderer Bestandteile aufgehoben werden. So resultierte die einfache Aufkonzentrierung des Mediums für das autotrophe Wachstum von *Clostridium ljungdahlii* sogar in einer starken Wachstumsinhibierung (Phillips *et al.*, 1993). Daher ist es wichtig, den Einfluss einzelner Medienbestandteile separat zu untersuchen und einzelne einflussnehmende Bestandteile selektiv zu erhöhen.

6.5 Fructose

Das Bakterium *Acetobacterium woodii* kann zusätzlich zur Verwertung von gasförmigen Substraten simultan organische Kohlenstoffquellen wie Glucose, Fructose, Formiat oder Lactat verwerten (Braun und Gottschalk, 1981). Diese Fähigkeit zur Mixotrophie könnte genutzt werden, um die Wachstums- und Produktbildungsraten für einen Produktionsprozess auf gasförmigen Substraten durch die Anwesenheit organischer Kohlenstoffquellen zu erhöhen. Daher wurde im folgenden Kapitel untersucht werden, ob sich die Anwesenheit von organischen und gasförmigen Substraten im Medium förderlich auf den Produktionsprozess auswirkt. Dazu wurden begleitend zu den verschiedenen Stadien der Prozess- und Medienentwicklung, die in Kapitel 5.3 beschrieben wurde, Untersuchungen zum mixotrophen Wachstum von *A. woodii* durchgeführt.

6.5.1 Vergleich der hetero-, auto- und mixotrophen Herstellung von Acetat

A. woodii kann neben Fructose auch Glucose als organische Kohlenstoffquelle verstoffwechseln (Braun und Gottschalk, 1981). Dies konnte in Kultivierungsexperimenten in Septumflaschen auf diesen beiden Kohlenstoffquellen bestätigt werden, in denen ähnliche Ausbeuten an Biomasse und Acetat auf beiden C-Quellen gebildet wurden. Da jedoch Fructose die standardmäßig für die Kultivierung von *A. woodii* eingesetzte Kohlenstoffquelle ist, wurden die mixotrophen Kultivierungen ausschließlich auf Fructose durchgeführt.

Im Folgenden wird die mixotrophe Acetatbildung im Vergleich zur hetero- und autotrophen Produktion betrachtet. Die Kultivierungen wurden dabei noch unter Bedingungen bei einem Leistungseintrag von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ durchgeführt.

Fructose wurde dabei in der Konzentration 20 g L^{-1} in An- und Abwesenheit des zu diesem Zeitpunkt als maximal ermittelten Partialdrucks an Wasserstoff ($p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$) eingesetzt. Kohlenstoffdioxid war in allen Kultivierungen mit einem Partialdruck von 100 mbar im Gasstrom vorhanden, zum einen als Kohlenstoffquelle in Anwesenheit von Wasserstoff und zum anderen, um den Carbonatpuffer des Mediums in allen Kultivierungen aufrechtzuerhalten. CO_2 als Kohlenstoffquelle kann von *A. woodii* dabei nur in Anwesenheit von H_2 verwendet werden (Eden und Fuchs, 1983). Die Rührerdrehzahl in diesen Kultivierungen betrug 400 min^{-1} , die Begasungsrate 15 L h^{-1} . Für eine sofort einsetzende Acetatbildung ohne Verzögerungsphase wurde die Kultivierungen mit einer Biomassekonzentration von $1,55 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ gestartet.

Vergleicht man den Verlauf der Konzentration an Biomasse in allen drei Ansätzen in Abbildung 6.9a, so zeigt sich, dass sich die Anwesenheit von Wasserstoff förderlich auf das Wachstum der Bakterien mit Fructose als Kohlenstoffquelle ausgewirkt hat. Unter mixotrophen Bedingungen stieg die Biomassekonzentration innerhalb von etwa einem Tag auf maximal $3,4 \text{ g L}^{-1}$ an, mit Fructose allein wurden in der gleichen Zeit hingegen maximal $3,0 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die

Biomassekonzentration unter autotrophen Bedingungen nahm im Zeitraum von drei Tagen nur leicht auf $1,8 \text{ g L}^{-1}$ zu und fiel im folgenden Verlauf wieder leicht ab.

In der exponentiellen Phase des Wachstums wird Fructose in Anwesenheit von H_2 etwas schneller verbraucht (vgl. Tabelle 6.4). Nach 2,1 Tagen war Fructose unter heterotrophen Bedingungen zu 67 % verbraucht, wohingegen diese in Anwesenheit von H_2 in der gleichen Zeit fast komplett verbraucht wurde.

Vergleicht man die Acetatbildung in Abbildung 6.9c, so zeigt sich, dass Acetat unter mixotrophen Bedingungen deutlich schneller gebildet wurde als unter heterotrophen Bedingungen (vgl. Tabelle 6.4). Auch die Ausbeute lag in der exponentiellen Phase unter mixotrophen Bedingungen deutlich höher als unter heterotrophen Bedingungen. Unter autotrophen Bedingungen wurde Acetat nach einer Verzögerungsphase mit einer volumetrischen Rate von $7,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ kontinuierlich gebildet. Auf Fructose allein sind nach etwa einem Tag $7,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vorhanden, in Anwesenheit von H_2 sogar $10,5 \text{ g L}^{-1}$. Unter heterotrophen Bedingungen stagnierte die Acetatbildung nach einem Tag, so dass bei Versuchsende $8,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet wurden, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch $6,6 \text{ g L}^{-1}$ Fructose im Medium vorhanden waren. Im Gegensatz dazu stagnierte die Acetatbildung unter mixotrophen Bedingungen nicht, Acetat wird gegen Ende des Versuchs hingegen langsamer gebildet, so dass bei Versuchsende $13,8 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vorhanden waren. Unter autotrophen Bedingungen wird Acetat über den gezeigten Verlauf kontinuierlich weiter gebildet, so dass nach 10,9 Tagen $43,7 \text{ g L}^{-1}$ im Medium vorhanden waren (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6.4: Zusammenfassung der Wachstums-, Substratverbrauchs- und volumetrischen Produktbildungsraten, sowie der Produktausbeute bei der vergleichenden Kultivierung von *A. woodii* unter hetero-, mixo- und autotrophen Bedingungen im Laborrührkesselreaktor.

Bedingung	Wachstumsrate, h^{-1}	Substratverbrauch, $\text{g}_{\text{Fructose}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	vol. Produktionsrate $\text{Q}_p, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	Ausbeute $Y_{\text{PS}},$ $\text{g}_{\text{Acetat}} \text{ g}_{\text{Fructose}}^{-1}$
heterotroph	0,06	13,92	11,04	0,78
mixotroph	0,08	15,84	15,80	0,96
autotroph	0,002	-	7,33	-

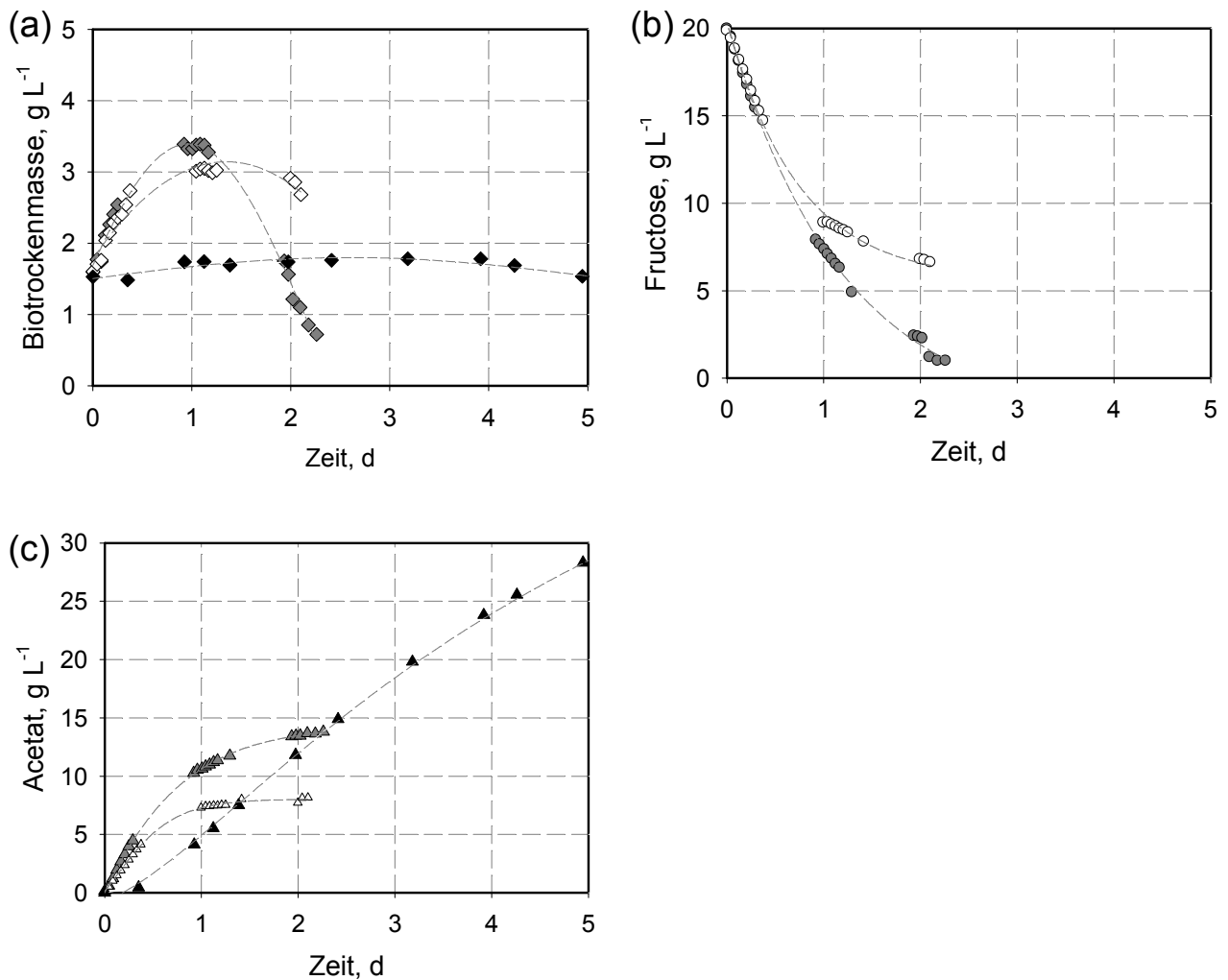


Abbildung 6.9: Vergleich der Konzentrationsverläufe an (a) Biomasse, (b) Fructose und (c) Acetat bei der Kultiveringung von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor in Anwesenheit von (◇, ○, △) Fructose, (◆, ●, ▲) Fructose und H₂/CO₂ und (◆, ▲) H₂/CO₂. ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135H, $c_{0,Fructose} = 20$ g L⁻¹, T = 30 °C, Titrationsmittel NaOH (6 mol L⁻¹), $n = 400$ min⁻¹, $\dot{V}_g = 15$ L h⁻¹ (0,25 vvm), $p_{H_2}^{Eingang} = 1700$ mbar, $p_{CO_2}^{Eingang} = 100$ mbar, $p_{tot} = 1,8$ bar). In Anwesenheit von Fructose im Medium war CO₂ ($p_{CO_2}^{Eingang} = 100$ mbar) im Gasstrom vorhanden zur Aufrechterhaltung des Carbonatpuffer des Mediums.

Diskussion

Durch den Vergleich des auto-, hetero- und mixotrophen Wachstums von *A. woodii* konnte gezeigt werden, dass sich die Anwesenheit von Wasserstoff auf die Verstoffwechslung von Fructose förderlich auswirkt. So wurden in Anwesenheit von H₂ sowohl höhere Wachstums- und Produktbildungsraten, als auch eine höhere Produktausbeute mit Fructose erreicht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass H₂ möglicherweise als zusätzliche Energiequelle dient und den Bakterienzellen somit mehr Energie für zelluläre Stoffwechselprozesse zur Verfügung steht (Liu und Sufliya, 1995).

Außerdem wirkte sich die Anwesenheit von H_2 förderlich auf den Verbrauch von Fructose aus. Obwohl bei der heterotrophen Kultivierung ausreichend Fructose vorhanden war, wurde diese im späteren Fermentationsverlauf nur noch sehr langsam verbraucht und war bei Versuchsende noch zu etwa 33 % der ursprünglichen Konzentration vorhanden. In Anwesenheit von Wasserstoff hingegen wurde die eingesetzte Fructose in der gleichen Zeit fast komplett verbraucht. Dies kann möglicherweise durch die Anwesenheit von H_2 erklärt werden, da über den Acetyl-CoA-Weg anfallende Reduktionsäquivalente durch die Bildung von Acetat "entsorgt" werden können und die elektronen-transportierenden Proteine dem Stoffwechsel somit schneller wieder zur Verfügung stehen.

In den Ansätzen mit Fructose wurde im Vergleich zum Ansatz ohne Fructose eine starke Zunahme der Biomasse ermittelt, die nach einer kurzen stationären Phase jedoch wieder stark abnahm. Gleichzeitig mit dem Absterben der Bakterienzellen war eine Stagnation der Acetatbildung zu beobachten. Die Abnahme der Biomassekonzentration im Reaktor könnte auf eine Erschöpfung des Mediums hindeuten, die unter autotrophen Bedingungen durch das geringe Biomassewachstum geringer ausfiel.

So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von H_2 notwendig ist, um hohe Konzentrationen an organischen Kohlenstoffquellen zu verstoffwechseln. Es zeigte sich aber auch, dass die Acetatproduktion unter autotrophen Bedingungen wesentlich effizienter mit geringerem Verlust der eingesetzten Kohlenstoffquelle und Erschöpfung des Mediums durch die Bildung von Biomasse abläuft.

6.5.2 Mixotrophe Herstellung von Acetat

Untersuchungen zur Substrattoleranz im parallelen Rührkesselreaktorsystem haben gezeigt, dass Fructose bis zu einer Konzentration von mindestens 50 g L^{-1} von *A. woodii* toleriert wird (Daten nicht gezeigt). So wurde in der folgenden Kultivierung eine Fructosekonzentration von etwa 50 g L^{-1} im Medium bei einem Leistungseintrag von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ und einem pH_2^{Eingang} von 1700 mbar vorgelegt. Außerdem wurde die Konzentration an Eisen(II)-Ionen im Medium auf $5,4 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht, da in Kapitel 6.1 der förderliche Effekt dieses Spurenelements gezeigt wurde. Gestartet wurde der Versuch durch Zugabe einer Biomassekonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

Wie der Verlauf der Biomassekonzentration in Abbildung 6.10 erkennen lässt, nahm diese nach einer kurzen Verzögerungsphase mit einer Wachstumsrate von $0,19 \text{ h}^{-1}$ zu, bis nach 1,2 Tagen eine maximale Konzentration von 3 g L^{-1} erreicht war. Nach einer stationären Phase von etwa einem Tag nahm die Biomasse wieder mit einer Rate von $\mu_{\text{max}} = -0,01 \text{ h}^{-1}$ ab, bis auf eine Konzentration von $1,1 \text{ g L}^{-1}$. Fructose wurde dabei mit einer maximalen Rate von $0,74 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ verbraucht, am Ende der Kultivierung waren noch $3,9 \text{ g L}^{-1}$ im Medium vorhanden. Die Acetatbildung setzte mit einer durch das Wachstum der Bakterienzellen bedingten

Verzögerungsphase ein und erreichte eine maximale volumetrische Rate von $13,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Als die Konzentration an Biomasse nach etwa zwei Tagen wieder abnahm, verlangsamte sich damit einhergehend die Acetatbildung. Bei Versuchsende nach sieben Tagen waren $44,8 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium vorhanden.

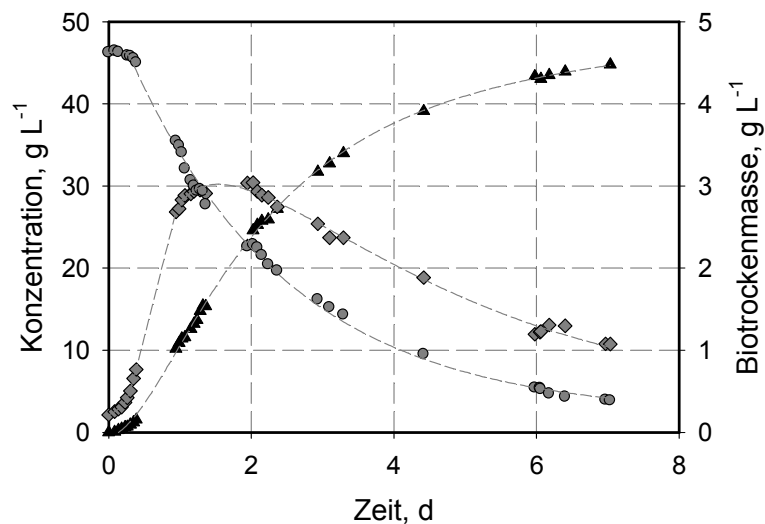


Abbildung 6.10: Verlauf der Konzentrationen an (●) Fructose, (▲) Acetat und (◆) Biomasse bei der mixotrophen Kultivierung von *A. woodii* auf Fructose und H_2/CO_2 unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (6 mol L^{-1}), $n = 400 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 15 \text{ L h}^{-1}$ ($0,25 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,8 \text{ bar}$).

In einer weiteren mixotrophen Kultivierung wurde die Acetatbildung bei einem Leistungseintrag von $5,5 \text{ W L}^{-1}$ mit einer hohen Konzentration an Fructose untersucht.

Für eine sofort einsetzende Acetatbildung wurde die Kultivierung durch Zugabe einer Biomassekonzentration von $2,9 \text{ g L}^{-1}$ gestartet, die ohne Verzögerung innerhalb von vier Stunden auf maximal $4,0 \text{ g L}^{-1}$ zunahm (vgl. Abbildung 6.11). Die Biomassekonzentration blieb für sieben Stunden konstant bei $3,9 \text{ g L}^{-1}$ und nahm im folgenden Verlauf wieder ab bis auf $2,7 \text{ g L}^{-1}$ bei Versuchsende. Fructose wurde in den ersten Stunden sehr schnell verbraucht und erreicht nach Stagnation der Biomassebildung eine konstante Verbrauchsrate von $17,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Acetat wurde dabei mit einer volumetrischen Rate von $17,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gebildet. Durch Messung des Abgasvolumenstroms lies sich ermitteln, dass die Substrate H_2 und CO_2 nur in der Anfangsphase des Prozesses bis zu dem Zeitpunkt verbraucht wurden, als die Biomassezunahme gestoppt hat. Im folgenden Verlauf der Kultivierung konnte kein Verbrauch an H_2 und CO_2 gemessen werden.

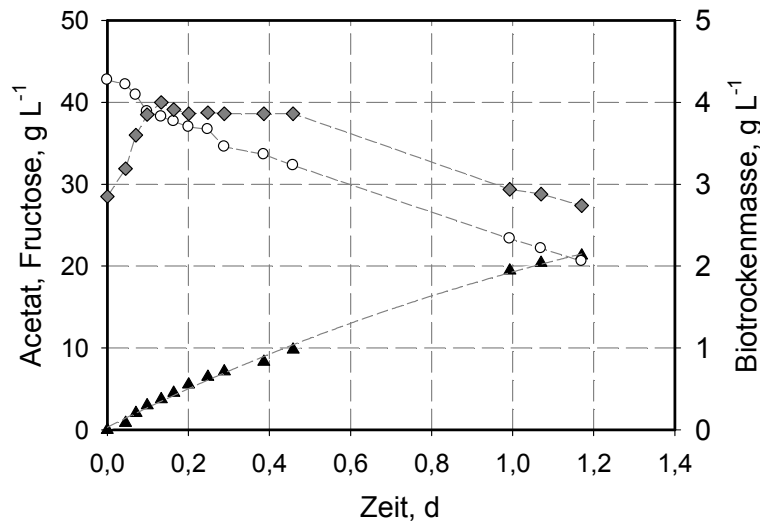


Abbildung 6.11: Verlauf der Konzentrationen an (a) (O) Fructose, (▲) Acetat und (◆) Biotrockenmasse bei der mixotrophen Kultivierung von *A. woodii* auf 50 g L^{-1} Fructose + H_2/CO_2 unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Diskussion

Mit den mixotrophen Kultivierung konnte gezeigt werden, dass *A. woodii* fähig ist, Acetatkonzentrationen von bis zu 45 g L^{-1} aus 50 g L^{-1} Fructose in Anwesenheit von H_2/CO_2 zu bilden.. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass die gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 nur in der Anfangsphase des Prozesses verbraucht wurden. Anschließend waren die Fructoseverbrauchsrate und die Acetatbildungsrate nahezu identisch. Da zu diesem Zeitpunkt keine Biomasse mehr gebildet wurde, lässt sich schließen, dass das gebildete Acetat nur aus der verbrauchten Fructose gebildet wurde und nicht zusätzlich aus H_2/CO_2 .

Die maximal erreichbare Acetatkonzentration von etwa 50 g L^{-1} konnte durch die Anwesenheit von Fructose nicht überschritten werden. Auch konnte die unter autotrophen Bedingungen maximale volumetrische Produktbildungsrate nicht erreicht werden. Daher wurde der Ansatz der mixotrophen Acetatproduktion nicht weiter verfolgt.

6.6 Aminosäuren

Im vorherigen Kapitel konnte durch einfache Aufkonzentrierung des eingesetzten Mediums keine Erhöhung des Wachstums und der Acetatbildung unter autotrophen Bedingungen erreicht werden. Daher wurde genauer analysiert, welche der im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren von *A. woodii* während des Wachstums unter autotrophen Bedingungen verbraucht werden und

ob sich eine selektive Erhöhung von verbrauchten Aminosäuren positiv auf das Wachstum und die Acetatbildung unter autotrophen Bedingungen auswirkt.

Dazu wurden zunächst die Konzentrationen einiger Aminosäuren vor und nach zwei repräsentativen Kultivierungen von *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen gemessen, was in Abbildung 6.12 graphisch dargestellt ist. Es stellte sich dabei heraus, dass fast alle gemessenen Aminosäuren durch *A. woodii* verbraucht wurden, jedoch gegen Ende der Kultivierung im Medium noch vorhanden waren. Bei den Aminosäuren L-Asparagin und L-Tryptophan fiel auf, dass diese im Medium mit Konzentrationen von etwa 40 und 30 mg L⁻¹ im Vergleich zu den anderen Aminosäuren nur sehr gering konzentriert vorhanden waren. Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass die Konzentrationen an L-Asparagin und L-Tryptophan innerhalb eines Tages auf Konzentrationen < 10 mg L⁻¹ fielen, die auch am Ende der Fermentationen noch vorlagen (Daten nicht gezeigt), was auf eine Limitierung dieser Aminosäuren hindeuten könnte.

Neben dem Verbrauch einiger Aminosäuren konnte auch eine Zunahme der Konzentrationen der Aminosäuren D-Alanin und L-Valin gemessen werden. Die Zunahme von L-Valin war in den untersuchten Kultivierungen mit 68 ± 8 mg L⁻¹ ähnlich, wohingegen die Bildung von D-Alanin in Abhängigkeit der im Medium vorhandenen Konzentration an Ammonium stark variierte.

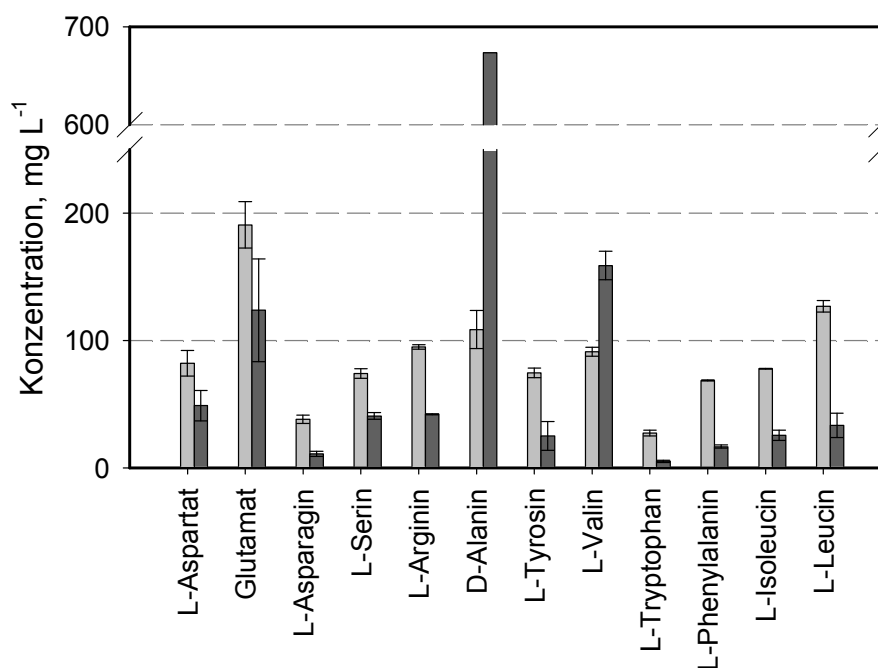


Abbildung 6.12: Konzentrationen der gezeigten Aminosäuren vor (■) und nach (■) autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor. Angegebene Konzentrationen sind gemittelt über zwei repräsentative Kultivierungen.

Die als verbraucht ermittelten Aminosäuren wurden im Kulturmedium, wie in Tabelle 6.5 beschrieben, mindestens um den Faktor 5 erhöht, so dass eine Konzentration der genannten Aminosäuren von mindestens 200 mg L⁻¹ im Medium vorlag.

Des Weiteren wurde ermittelt, ob der unter autotrophen Bedingungen essentielle Hefeextrakt (siehe Kapitel 6.2) im Medium durch Zusatz der verbrauchten Aminosäuren ersetzt werden kann. Wie in Tabelle 6.5 beschrieben, wurden zusätzlich die im Medium verbrauchten Aminosäuren L-Glutamat, L-Serin und L-Aspartat in den im Referenzmedium vorhandenen Konzentrationen zugegeben.

Tabelle 6.5: Konzentrationen der aufgelisteten Medienbestandteile für die eingesetzten Medien. Die für das Referenzmedium gemessenen Konzentrationen der Aminosäuren wurden gemittelt über zwei representative autotrophe Kultivierungen. Die Konzentrationen für die anderen beiden Medien sind Endkonzentrationen der Aminosäuren im Medium; fett markierte Aminosäuren wurden als limitierend angenommen.

	Einheit	DSMZ 135HF	DSMZ 135HF mit zugesetzten Aminosäuren	DSMZ 35HF ohne Hefeextrakt mit zugesetzten Aminosäuren
Hefeextrakt	g L ⁻¹	4	4	-
L-Asparagin	mg L ⁻¹	38 ± 3	200	200
L-Arginin	mg L ⁻¹	95 ± 2	250	250
L-Tyrosin	mg L ⁻¹	75 ± 4	350	350
L-Tryptophan	mg L ⁻¹	27 ± 2	300	300
L-Phenylalanin	mg L ⁻¹	69 ± 0	350	350
L-Isoleucin	mg L ⁻¹	78 ± 0	400	400
L-Leucin	mg L ⁻¹	127 ± 4	600	600
L-Lysin	mg L ⁻¹	43 ± 1	200	200
L-Aspartat	mg L ⁻¹	82 ± 10	siehe Referenzmedium	80
L-Glutamat	mg L ⁻¹	191 ± 18	siehe Referenzmedium	200
L-Serin	mg L ⁻¹	74 ± 4	siehe Referenzmedium	70

A. woodii wurde Rührkesselreaktorsystem im Parallelansatz im standardmäßig eingesetzten Medium, im Medium mit zugesetzten Aminosäuren und im Medium ohne Hefeextrakt mit zugesetzten Aminosäuren vergleichend kultiviert.

Abbildung 6.13 zeigt, dass nach 48 Stunden in den Ansätzen mit und ohne zugesetzten Aminosäuren eine ähnliche Biomassekonzentration von $0,14 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ gebildet wurde. Im Ansatz mit zugesetzten Aminosäuren ohne Hefeextrakt konnte keine Zunahme der Biomassekonzentration gemessen werden. Im Ansatz mit und ohne Zusatz von Aminosäuren wurden in der gleichen Zeit Acetatkonzentrationen von $4,2 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ im Medium erreicht. Im Ansatz mit zugesetzten Aminosäuren ohne Hefeextrakt lag die Acetatkonzentration nach 48 Stunden bei $0,4 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$.

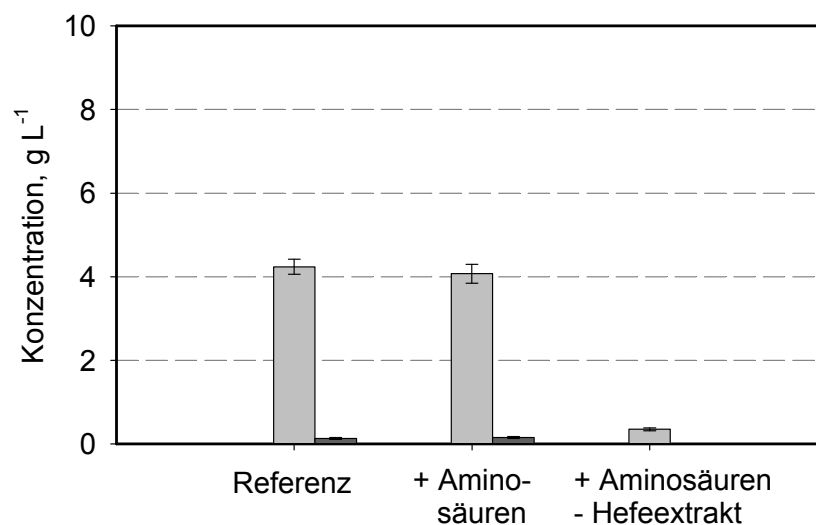


Abbildung 6.13: Konzentrationen an Biomasse (■) und Acetat (□) nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* in Medien mit und ohne zugesetzten Aminosäuren, sowohl mit und ohne Hefeextrakt unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren ($c_{X0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Die Konzentrationen der Aminosäuren in den Medien sind in Tabelle 6.5 angegeben. Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Der pH des Mediums wurde vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO_2 zu gewährleisten.

Anschließend wurde *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen im Laborrührkesselreaktor im Medium mit zugesetzten Aminosäuren im Vergleich zum standardmäßig verwendeten Medium kultiviert.

Am Verlauf der Biomassekonzentration in beiden Ansätzen (vgl. Abbildung 6.14a) zeigt sich, dass im Medium mit zugesetzten Aminosäuren sofort eine Biomassezunahme mit einer Wachstumsrate von $0,011 \text{ h}^{-1}$ eingesetzt hat, bis nach etwa 0,6 Tagen eine maximale Biomassekonzentration von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht war. Ohne stationäre Phase nahm die Biomassekonzentration ab diesem Zeitpunkt wieder ab. Im Ansatz ohne zugesetzte Aminosäuren war kein Wachstum feststellbar, die Biomasse nahm von Beginn der Kultivierung an kontinuierlich ab.

Abbildung 6.14b zeigt, dass die Acetatbildung im Ansatz mit zugesetzten Aminosäuren deutlich früher als bei der Kultivierung im Standardmedium eingesetzt hat. Dabei wurde eine deutlich höhere volumetrische Acetatbildungsrate von $38,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ verglichen zur Kultivierung im Referenzmedium ($Q_P = 31,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) erreicht. Die zellspezifischen Produktbildungsraten lagen in beiden Ansätzen bei $12,5 \pm 0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nach einer Versuchszeit von 1,8 Tagen lag die Acetatkonzentration in beiden Ansätzen jedoch bei etwa 40 g L^{-1} .

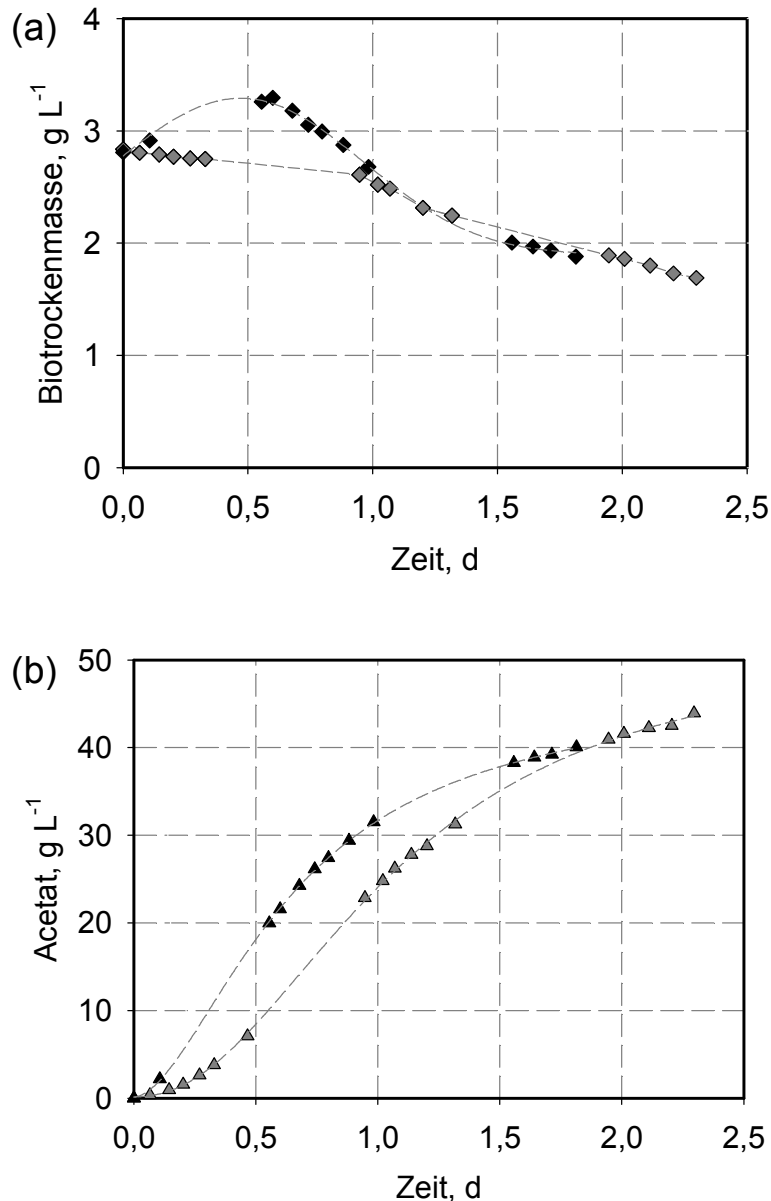


Abbildung 6.14: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei der vergleichenden autotrophen Kultivierung von *A. woodii* ohne (\diamond , \triangle) und mit zugesetzten Aminosäuren (\blacklozenge , \blacktriangle) unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $c_{X0} = 2,84 \text{ g L}^{-1}$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\rho_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$). Konzentrationen der zugesetzten Aminosäuren sind in Tabelle 6.5 aufgeführt.

Die Konzentrationen der als limitierend angenommenen Aminosäuren L-Asparagin und L-Tryptophan nahmen in der Wachstumsphase im Medium ab, so dass ein Verbrauch von etwa 82 mg L^{-1} für L-Tryptophan und 97 mg L^{-1} für L-Asparagin ermittelt werden konnte. Bis zum Ende der Kultivierungen waren diese Aminosäuren im Medium vorhanden, so dass diese als nichtlimitierend angenommen werden können.

Diskussion

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass *A. woodii* während des autotrophen Wachstums einige im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren verbraucht. Besonders auffällig in diesem Zusammenhang war der fast komplette Verbrauch der wenig im Medium vorhandenen Aminosäuren L-Asparagin und L-Tryptophan. Wurden die als verbraucht ermittelten Aminosäuren im Medium erhöht, so zeigten sich bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* im Parallelansatz innerhalb von 48 Stunden keine Unterschiede in der Bildung von Biomasse und Acetat. Bei der eingesetzten Biomassekonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ schienen die im Medium vorhandene Konzentration der Aminosäuren somit nicht limitierend zu sein. Daher zeigte sich bei Konzentrationserhöhung dieser Aminosäuren keine Veränderung des Wachstums und des Produktionsverhaltens.

Ein Ersatz des komplexen Medienbestandteils Hefeextrakt durch die als verbraucht ermittelten Aminosäuren war nur bedingt erfolgreich. So konnte zwar erreicht werden, dass eine geringe Menge Acetat in Medium ohne Hefeextrakt gebildet wurde, es konnte jedoch keine Zunahme der Zellmasse gemessen werden. Dies zeigt deutlich, dass durch Zusatz der genannten Aminosäuren zu Medium ohne Hefeextrakt zwar etwas Acetat gebildet, dieser komplexe Medienbestandteil jedoch nicht ersetzt werden kann. Neben den genannten Aminosäuren könnten im Medium noch weitere Aminosäuren limitierend sein. Mit der verwendeten Methode zur Bestimmung der Aminosäuren im Medium konnten die Konzentrationen einiger proteinogener Aminosäuren im Medium wie L-Cystein, L-Glutamin, L-Histidin, Glycin, L-Threonin, L-Methionin und L-Prolin nicht gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit kann somit nicht ausreichend geprüft werden, ob Hefeextrakt durch Zusatz von Aminosäuren zum Medium ersetzt werden kann. Dies könnte durch Zusatz von Caseinhydrolysat ermittelt werden, der hauptsächlich freie Aminosäuren und kleine Peptide enthält. Dabei müsste jedoch die als essentiell ermittelte Aminosäure L-Tryptophan in reiner Form zugesetzt werden, da diese bei der säurehydrolysierten Herstellung von Caseinhydrolysat fast komplett zerstört wird (Müller und Johnson, 1941). Außerdem könnte ein weiterer Bestandteil des Hefeextrakts für das autotrophe Wachstum von *A. woodii* ausschlaggebend sein. Smith *et al.* (1975) zeigten zum Beispiel, dass der wachstumsstimulierende Effekt des Hefeextrakts auf *Streptococcus lactis* neben dem Aminosäuregehalt auch auf Purine, Pyrimidine und anorganische Bestandteile zurückzuführen war.

Der genaue Nährstoffbedarf für einige acetogene Mikroorganismen konnte ermittelt werden, so dass definierte Medien für die autotrophe Kultivierung entwickelt werden konnten. Für die Kultivierung von *Moorella thermoacetica* konnte Hefeextrakt durch Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle, Nikotinsäure (Vitamin B₃) als einziges Vitamin, Mineralsalze und Cysteinsulfid als Reduktionsmittel ersetzt werden (Lundie und Drake, 1984; Daniel *et al.*, 1990). *Moorella thermoautotrophicum* erreichte in Minimalmedium auf H₂/CO₂ mit Nikotinsäure als einzigem Vitamin sogar höhere zellspezifische Acetatbildungsraten als in undefiniertem Medium (Savage und Drake, 1986). Für die autotrophe Kultivierung von *Eubacterium limosum* KIST612 konnte Hefeextrakt in phosphatgepuffertem Medium ersetzt werden durch Casaminosäuren und Ammoniumchlorid (Chang *et al.*, 1999). In allen Fällen bedurfte die Anpassung an definierten Medien jedoch mehrerer Passagen und es wurden insgesamt niedrigere Wachstums- und Produktbildungsraten unter autotrophen Bedingungen erreicht. Dies zeigt, dass der stimulierende Effekt des Hefeextrakts in den genannten Beispielen nicht komplett ersetzt werden konnte und Hefeextrakt für schnelles Wachstum und Produktbildung notwendig ist.

Bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* mit erhöhter Startbiomasse im Reaktor in Medium mit zugesetzten Aminosäuren konnte eine deutliche Erhöhung der Acetatbildungsgeschwindigkeit erreicht werden. Das fehlende Wachstum in früheren Kultivierungen bei erhöhter Zelldichte im Rührkesselreaktor konnte durch Zusatz der genannten Aminosäuren wiederhergestellt werden, was deutlich zeigt, dass eine oder mehrere Aminosäuren für den Nährstoffbedarf einer erhöhten Zelldichte im Laborreaktor nicht ausreichend vorhanden waren. Aus der gezeigten Kultivierung kann nicht eindeutig festgestellt werden, welche Aminosäure im Medium limitierend war, da die Konzentration aller verbrauchter Aminosäuren gleichzeitig erhöht wurden. Mögliche Kandidaten sind jedoch L-Asparagin und L-Tryptophan, die im ursprünglichen Medium nur in geringer Konzentration (< 50 mg L⁻¹) vorhanden waren, verglichen mit anderen Aminosäuren. Trotz ausreichender Konzentration dieser beiden Aminosäuren während der gesamten Kultivierung konnte das Wachstum und die hohe Acetatbildungsrate nicht aufrechterhalten werden, so dass nach einer Versuchszeit von 1,8 Tagen in etwa die gleiche Acetatkonzentration gebildet wurde, wie Ansatz ohne zugesetzte Aminosäuren. Bedingt durch die Biomassebildung könnten außer zugesetzten Aminosäuren noch weitere Bestandteile des Mediums aufgebraucht worden sein, so dass diese im späteren Fermentationsverlauf nicht mehr zur Verfügung standen. Daraufhin deutet die verstärkte Abnahme der Biomasse und die verfrühte Stagnation der Acetatbildung hin im Vergleich zum Referenzansatz. Dieser noch unbekannte Medienbestandteil kann zum Beispiel eine weitere mit der verwendeten Messmethode nicht erfassbare Aminosäure sein.

Für *A. woodii* wird berichtet, dass die nicht-proteinogene Aminosäure Ornithin (D- und L-Form) in der Zellwand dieses Bakteriums vorkommt (Kandler und Schoberth, 1979). Diese Aminosäure wird über den Harnstoffzyklus aus der Aminosäure L-Arginin durch Einbau von Wasser und Abspaltung von Harnstoff hergestellt. Aus dem Verbrauch von L-Arginin wird

angenommen, dass *A. woodii* das Enzym Arginase für die Herstellung dieser Aminosäure besitzt, was durch eine Analyse der Genomsequenz dieses Bakteriums festgestellt werden kann. Da im Medium nur eine geringe Menge an D-Ornithin ($< 5 \text{ mg L}^{-1}$) gemessen werden konnte, könnte der Zusatz der reinen Aminosäure zum Medium eventuell zu einer gesteigerten Biomassebildung führen.

Neben dem Verbrauch von Aminosäuren, die im Medium vorhanden waren, wurde die Bildung von D-Alanin und L-Valin während des autotrophen Wachstums von *A. woodii* beobachtet. Die Sekretion kleiner Mengen an Aminosäuren wie Alanin und Valin ist bei anaeroben Mikroorganismen üblich (Bloom und Kretschmer, 1983). L-Valin wird von *A. woodii* unabhängig von den Reaktionsbedingungen in beiden untersuchten Kultivierungen mit einer Konzentration von $68 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$ ähnlich gebildet und wird nicht weiter untersucht. Die Bildung von Alanin bis zu einer Konzentration von $0,98 \text{ g L}^{-1}$ beim Wachstum auf Glucose in Abhängigkeit des Ammoniumkonzentration im Medium wurde von Buschhorn *et al.* (1989) beschrieben, aber nicht genauer untersucht. Die Bildung von D-Alanin unter autotrophen Bedingungen in Abhängigkeit der Ammoniumkonzentration im Medium soll im folgenden Kapitel untersucht werden.

6.7 Ammonium

Von den meisten Mikroorganismen wird Ammonium als primäre Quelle für Stickstoff verwendet (McInerney und Gieg, 2004). Daher stellt eine Limitierung dieser Stickstoffquelle während mikrobiologischen Kultivierungen keine Seltenheit dar (Schure *et al.*, 1995). Im Folgenden wurde daher die Konzentration an Ammonium neben der Konzentration an Phosphat im Medium während einer autotrophen Kultivierung von *A. woodii* gemessen. Diese Messungen erfolgten extern in der Analytikabteilung des Consortiums für elektrochemische Industrie (Wacker Chemie AG, München), wobei die Ammoniumkonzentration über eine ionenselektiven Elektrode Titrand 808 (Metrohm AG) und Phosphatkonzentration über Ionenchromatographie gemessen wurde.

In Abbildung 6.15a sind die Verläufe der Konzentrationen an Biomasse und Acetat dargestellt. Unter den als maximal ermittelten Versuchsbedingungen wurde von Beginn an eine Abnahme der Biomassekonzentration verzeichnet, was auch schon in Kapitel 5.4 beobachtet werden konnte. Die Acetatbildung erreichte mit einer volumetrischen Produktbildungsrate von $31,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ trotz fehlender Biomassezunahme die bis dahin als maximal ermittelte Rate, so dass bei Versuchsende nach 2,3 Tagen eine Acetatkonzentration von $43,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde.

Die PO_4^{3-} -Konzentration blieb während der gesamten Kultivierung konstant bei $0,42 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 6.15b). Auffällig ist die Abnahme der Konzentration an NH_4^+ innerhalb eines Tages von $0,36 \text{ g L}^{-1}$ unter die Nachweisgrenze der Methode.

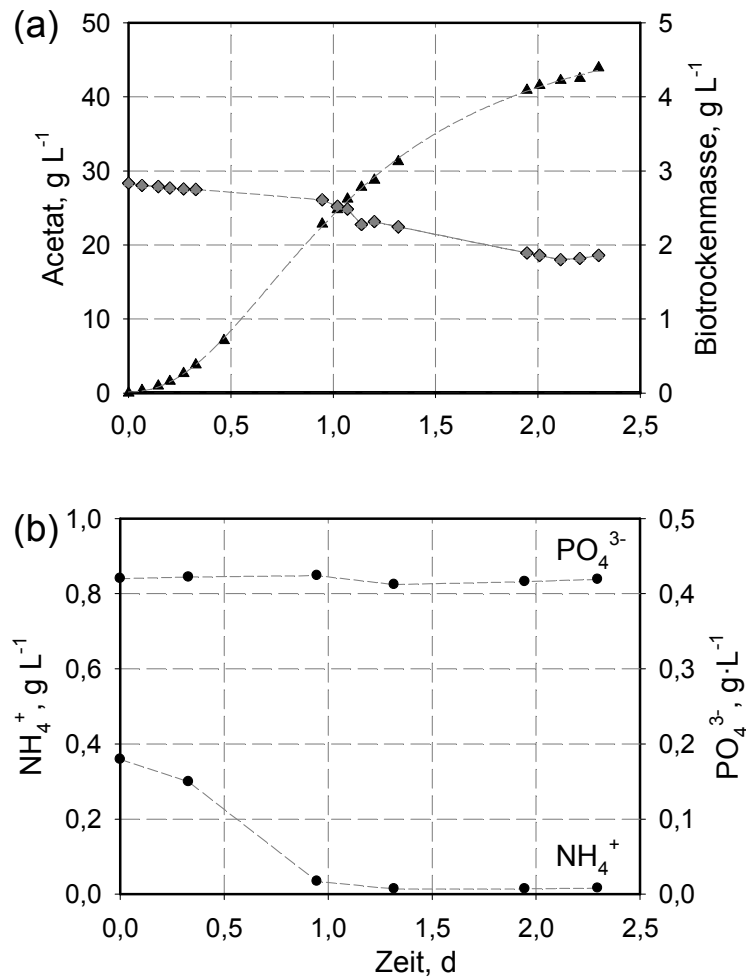


Abbildung 6.15: Verlauf der Konzentrationen an (a) Acetat (▲) und Biotrockenmasse (◆), (b) PO₄³⁻ und NH₄⁺ bei der autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* im Laborrührkesselreaktor unter pH-geregelten Bedingungen ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L⁻¹), $n = 1200$ min⁻¹, $V_g = 30$ L h⁻¹ (0,5 vvm), $pH_2^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $pCO_2^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar).

Eine Verdunstung von Ammonium durch die Begasung des Mediums konnte über einen Verdunstungsversuch über 48 Stunden unter Betriebsbedingungen im Laborrührkesselreaktor bei pH 7,0 und einer Temperatur von 30 °C im Medium ohne Bakterienzellen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Der vom Wachstum unabhängige Verbrauch von Ammonium durch *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen wurde daher im Folgenden genauer untersucht. Besteht eine Limitierung an Ammonium, so kann Ammonium beispielsweise im Medium in höheren Konzentrationen vorgelegt werden. Dabei wurde untersucht, welche stickstoffhaltigen Produkte beim Verbrauch von Ammonium gebildet werden.

Zunächst wurde im Parallelansatz ausgehend vom Referenzmedium mit 0,3 g L⁻¹ Ammonium die Ammoniumkonzentration schrittweise bis auf maximal 7,0 g L⁻¹ erhöht.

Wie in Abbildung 6.16 dargestellt, wurde im Referenzansatz ausgehend von einer Start-Biomasse von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ eine Biomassekonzentration von $0,13 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ nach einer Versuchszeit von 48 Stunden gebildet, bei 1 g L^{-1} Ammonium nur noch $0,02 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$. Lag die Ammoniumkonzentration im Medium höher, konnte nur noch eine Abnahme der eingesetzten Biomasse nach Ablauf der Versuchsdauer verzeichnet werden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der gebildeten Konzentration an Acetat. Die im Referenzansatz gebildete Acetatmenge von $4,4 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ nahm mit steigender Ammoniumkonzentration im Medium schrittweise bis auf $0,2 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Ammoniumkonzentration von 3 g L^{-1} ab. Bei höheren Konzentration konnte kein Acetat im Medium mehr nachgewiesen werden. Mit zunehmender Ammoniumkonzentration im Medium akkumulierte Formiat bis zu einer Konzentration von bis zu $0,5 \text{ g L}^{-1}$ im Medium (Daten nicht gezeigt).

Eine Kultivierung bei ansteigender Konzentration an Ammonium im Medium unter heterotrophe Bedingungen hat gezeigt, dass das Wachstum und die Acetatbildung beim Wachstum auf Fructose bis zu einer Ammoniumkonzentration von 3 g L^{-1} nicht beeinträchtigt werden. Erst ab einer Konzentration von 4 g L^{-1} nimmt die Bildung von Biomasse und Acetat innerhalb der Versuchszeit schrittweise ab. Ab diesem Zeitpunkt akkumulierte ebenso Formiat bis zu einer maximalen Konzentration von $0,8 \text{ g L}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

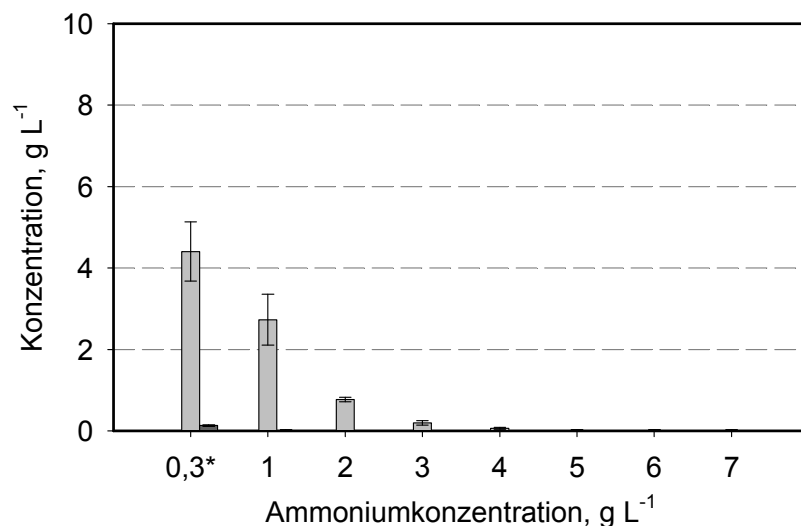


Abbildung 6.16: Konzentrationen an (■) Biomasse und (□) Acetat nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung von *A. woodii* mit ansteigender Konzentration an Ammonium im Medium unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren. ($c_{x0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Die Kultivierungen wurden mindestens im Dreifachansatz durchgeführt.

*: im verwendeten Medium sind standardmäßig $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Ammonium enthalten.

Im pH-kontrollierten Laborrührkesselreaktor wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen in einem Ansatz die Ammoniumkonzentration von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (Referenzansatz) auf $1,6 \text{ g L}^{-1}$ erhöht. Eine weitere Kultivierung wurde mit Medium ohne Zusatz von Ammonium durchgeführt. Zusätzlich wurde die Konzentration an Alanin bestimmt. In der Mureinschicht der Zellwand von *A. woodii* wurde die Aminosäure D-Alanin gefunden, daher wird im folgenden davon ausgegangen, dass es sich um die D-Form dieser Aminosäure handelt (Kandler und Schoberth, 1979).

Bei einer Ammoniumkonzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ im Medium wurden weitaus geringere Produktbildungsraten im Vergleich zum Referenzansatz erreicht (vgl. Tabelle 6.6). Wie in Abbildung 6.17a zu sehen ist, wurde eine Acetatkonzentration von 30 g L^{-1} im Ansatz mit erhöhter Ammoniumkonzentration erst nach 2,8 Tagen erreicht, wohingegen diese Konzentration im Referenzansatz schon nach 1,2 Tagen vorlag. In Medium ohne zugesetztes Ammonium wurde eine maximale volumetrische Produktbildungsrate von $43,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Auch die zellspezifische Rate lag hier etwas höher im Vergleich zum Referenzansatz. Allerdings stagnierte die Acetatbildung im Ansatz ohne zugesetztes Ammonium im Medium früher als im Referenzansatz.

Tabelle 6.6: Zusammenfassung der volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten der vergleichenden Kultivierung von *A. woodii* mit ansteigender Ammoniumkonzentration im Laborrührkesselreaktor.

Ammonium-konzentration, g L^{-1}	vol. Produktionsrate Q_P , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	zellspez. Produktionsrate q_P , $\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
0,0	43,13	17,02
0,3	32,93	14,18
1,6	15,79	6,44

Abbildung 6.17b zeigt, dass die Ammoniumkonzentration im Referenzansatz und mit erhöhter Konzentration an Ammonium ähnlich abnehmen. Im Referenzansatz war Ammonium im Medium jedoch nach 22 Stunden komplett verbraucht. Die im Ansatz ohne zugesetztes Ammonium gemessene Ammoniumkonzentration von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ war innerhalb kürzester Zeit verbraucht. Diese geringe Ammonium könnte im Hefeextrakt enthalten gewesen sein.

Wie in Abbildung 6.17c zu sehen ist, nahm die Konzentration an Formiat im Medium im Referenzansatz erst zu, als eine Acetatkonzentration von 30 g L^{-1} im Medium überschritten wurde und erreichte nach etwa 1,7 Tagen einen Wert von $0,38 \text{ g L}^{-1}$. Im Ansatz ohne vorgelegtes Ammonium wurde eine Acetatkonzentration von 30 g L^{-1} früher überschritten, daher nahm auch die Formiatkonzentration früher auf bis zu $0,22 \text{ g L}^{-1}$ zu. Im Ansatz mit einer

vorgelegten Ammoniumkonzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ im Medium nahm Formiat von Beginn der Kultivierung bis auf $0,69 \text{ g L}^{-1}$ nach 2,8 Tagen zu.

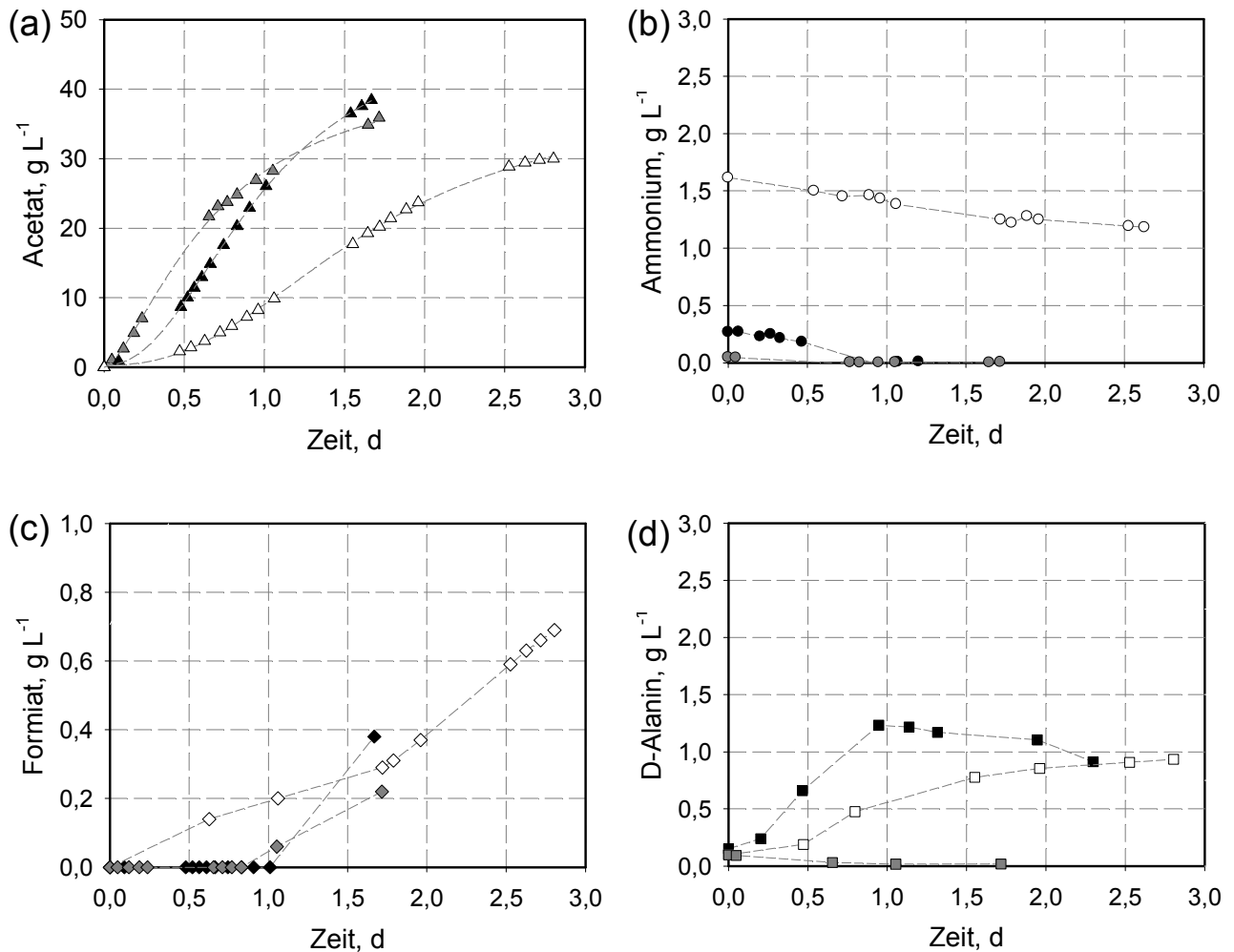


Abbildung 6.17: Verlauf der Konzentrationen an (a) Acetat, (b) Ammonium, (c) Formiat und (d) D-Alanin bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* mit einer zugesetzten Ammoniumkonzentration von (\blacktriangle , \bullet , \blacklozenge , \blacksquare) 0 g L^{-1} , (\blacktriangle , \bullet , \blacklozenge , \blacksquare) $0,3 \text{ g L}^{-1}$ und (\triangle , \circ , \diamond , \square) $1,6 \text{ g L}^{-1}$ unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $\text{pH} = 7,0$, $c_{X0} = 2,65 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ ($0,5 \text{ vvm}$), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

In Abhängigkeit der Ammoniumkonzentration im Medium wurde die Bildung der Aminosäure D-Alanin festgestellt. So nahm die Konzentration an D-Alanin im Referenzansatz mit $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Ammonium im Medium auf $1,2 \text{ g L}^{-1}$ nach einem Tag zu. Ab dem Zeitpunkt, ab dem Ammonium im Medium komplett verbraucht war, wurde D-Alanin wieder verbraucht. Im Ansatz ohne Ammonium im Medium wurde kein Alanin gebildet, stattdessen wurde das im Medium vorhandene Alanin innerhalb eines Tages komplett verbraucht. Im Ansatz mit $1,6 \text{ g L}^{-1}$

Ammonium im Medium wurde Alanin etwas langsamer gebildet, so dass nach etwa 2,8 Tagen $0,9 \text{ g L}^{-1}$ D-Alanin im Medium vorhanden waren.

Diskussion

Während einer autotrophen Kultivierung von *A. woodii* wurden die Konzentrationen an Phosphat und Ammonium gemessen. Allerdings fand unter den gewählten Bedingungen kein Wachstum der Bakterienzellen statt, weshalb die getroffenen Aussagen bezüglich des Verbrauchs der genannten Medienbestandteile nur für die stationäre Phase des Wachstums gültig sind.

Die Konzentration an Phosphat blieb während der gesamten Kultivierung relativ konstant, es war kein signifikanter Verbrauch durch *A. woodii* festzustellen. Eine Limitierung an Phosphat im Medium wäre zudem durch die Bildung von Ethanol feststellbar, das in keiner Kultivierung in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (Buschhorn *et al.*, 1989).

Während der gezeigten Kultivierung konnte eine Abnahme der Stickstoffquelle Ammonium im Medium gemessen werden. Da eine Verdunstung von Ammonium unter den Betriebsbedingungen ausgeschlossen werden konnte, war die Abnahme der Ammoniumkonzentration im Medium eindeutig auf einen Verbrauch dieser Stickstoffquelle durch die Bakterienzellen zurückzuführen.

Es konnte weiterhin eindeutig gezeigt werden, dass sich die Anwesenheit von Ammonium im Medium inhibierend auf die Bildung von Biomasse und Acetat unter autotrophen Bedingungen auswirkt. Diese Inhibierung drückte sich zusätzlich durch eine gesteigerte Akkumulation von Formiat im Medium bei ansteigender Konzentration an Ammonium aus. Formiat ist ein Zwischenprodukt des Acetyl-CoA-Wegs, das während des H_2 -abhängigen Wachstums von acetogenen Bakterien vorübergehend ins Medium abgegeben und anschließend wieder verbraucht wird (Peters *et al.*, 1999). Als Grund für die Sekretion des Zwischenprodukts wurde von den Autoren vermutet, dass die anschließende ATP-abhängige Aktivierung von Formiat einen geschwindigkeits-limitierten Schritt des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs darstellt und die zellinterne Konzentration an Formiat temporär zu groß wird. Acetogene Bakterien sind aber durchaus in der Lage, diese organische Säure wieder als Substrat für den autotrophen Stoffwechsel zu verwenden (Balch *et al.*, 1977). In den vorliegenden Kultivierungen wird Formiat in Abhängigkeit der Ammoniumkonzentration ins Medium sekretiert und nicht wieder aufgenommen, was auf eine Blockade des Acetyl-CoA-Wegs in einem der weiterführenden Schritte ausgehend vom Formiat hindeutet.

In der Literatur finden sich keine Hinweise auf einen inhibierenden Effekt freien Ammoniums im Medium auf den Acetyl-CoA-Weg von *A. woodii*. Mit der Regulation des Acetyl-CoA-Wegs haben sich bis jetzt nur sehr wenige Studien befasst. Der erste Beweis für eine derartige

Regulation wurde dabei mit *A. woodii* erbracht. Die Anwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel Caffeat führte zum totalen Verlust der Fähigkeit, Acetat zu bilden (Tschech und Pfennig, 1984). Das am besten verstandene Beispiel für die Regulation von autotrophem Wachstum ist der Abbau von Nitrat zu Nitrit durch *Moorella thermoacetica* (Fröstl *et al.*, 1996). Wird Nitrit zu Nitrat abgebaut, so wird der Acetyl-CoA-Weg unterdrückt, wobei die Inhibierung durch Unterdrückung der Synthese des membrangebundenen b-Cytochroms erfolgt, das essentiell ist für die Bildung von Methyl-THF im Methyl-Zweig des Acetyl-CoA-Wegs. Außerdem konnten verminderte Mengen einiger Enzyme des Stoffwechselwegs und eine starke Inhibierung der Hydrogenasen nachgewiesen werden (Arendsen *et al.*, 1999). Bei diesen Regulationsmechanismen fehlt aber noch das Verständnis auf molekularer Ebene.

Wurde dem Medium kein Ammonium zugesetzt, so lies sich die Acetatbildungsrate gegenüber allen vorherigen Ansätzen mit Ammonium im Medium deutlich steigern. Hier stagnierte die Acetatbildung jedoch früher, was vermuten lässt, dass der Stickstoffgehalt der übrigen Medienbestandteile durch *A. woodii* aufgebraucht war. Neben Ammonium kann sowohl das Hefeextrakt, als auch eine Vielzahl an Aminosäuren als Stickstoffquelle dienen (Genthner und Bryant, 1981). Es lässt sich dabei feststellen, dass *A. woodii* zwar eine Stickstoffquelle unter autotrophen Bedingungen benötigt, sich freies Ammonium jedoch inhibierend auf den Stoffwechsel dieses Bakteriums auswirkt. Dieses Problem könnte möglicherweise durch den Einsatz alternativer Stickstoffquellen wie beispielsweise Nitrat umgangen werden, was für dieses Bakterium jedoch noch nicht beschrieben ist.

Im Rahmen der gezeigten Kultivierungen wurde die Bildung von D-Alanin von *A. woodii* in Abhängigkeit von Ammonium im Medium unter autotrophen Bedingungen untersucht. Buschhorn *et al.* (1989) konnten beim Wachstum dieses Bakteriums auf Glucose durch Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Medium eine maximale Alaninkonzentration von $0,98 \text{ g L}^{-1}$ im Medium nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde eine vergleichbare maximale Konzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ D-Alanin unter autotrophen Bedingungen gemessen. Alanin wird im Stoffwechsel von Mikroorganismen beispielsweise durch die Aminierung von Pyruvat durch das Enzym Alanin-Dehydrogenase oder Alanin-Aminotransferase gebildet, was für das Bakterium *Pyrococcus furiosus* gezeigt werden konnte (Kengen und Stams, 1994). Bei der Bildung von Alanin aus Pyruvat werden zwei Reduktionsäquivalente verbraucht. Somit könnte dieser Stoffwechselweg unter autotrophen Bedingungen möglicherweise der Regenerierung des Kofaktors NADH/H^+ dienen. Aus der Entschlüsselung des Genoms von *A. woodii* konnte durch Proteomanalysen ermittelt werden, dass im Stoffwechsel eine Alanin-Dehydrogenase in Anwesenheit von H_2/CO_2 induziert wird (Schmidt, 2011).

Einige anaerobe Bakterien besitzen die Fähigkeit, bestimmte Aminosäuren in Abhängigkeit des Redoxhaushalts der Zelle zu den zugehörigen α -Ketosäuren zu oxidieren, die dann in den

Intermediärstoffwechsel der Zelle eingeschleust werden können (Schmitz *et al.*, 2006). So können beispielsweise Lactat oder Alanin zu Pyruvat oxidiert werden, das anschließend zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Ein weiterer Weg in anaeroben Bakterien ist die reduktive Desaminierung von einigen Aminosäuren. Die reduktive Desaminierung ist Teil der Stickland-Reaktion, bei der Aminosäuren paarweise fermentiert werden. So kann beispielsweise Alanin zu Acetat und CO₂ desaminiert werden, wobei die freiwerdenden Reduktionsäquivalente auf Glycin transferiert werden. Glycin kann dann durch das Enzym Glycin-Reduktase unter Bildung von Acetat desaminiert werden. Die Acetatbildung erfolgt dabei über Acetyl-Phosphat, wobei über das Enzym Acetatkinase ATP über Substratkettenphosphorylierung gewonnen wird (Andreesen, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass Alanin in Abhängigkeit von Ammonium im Medium gebildet wird und in Abwesenheit von Ammonium auch wieder verbraucht wird. Ein direkter Einfluss der Bildung oder des Abbaus von Alanin auf den autotrophen Stoffwechsel oder den Energiestoffwechsel von *A. woodii* kann aus den erzielten Ergebnissen jedoch nicht abgeleitet werden.

6.8 Zusammenfassung der Untersuchung von Medienbestandteilen

Tabelle 6.7: Zusammenfassung der untersuchten Medienbestandteile.

Bestandteil	Auswirkung	Maßnahme
Pantothenat	- keine Auswirkung bei Konzentrationserhöhung	-
Fe ²⁺	- förderlicher Einfluss auf Produktbildung	- Erhöhung der Konzentration auf 5,4 mg L ⁻¹ für weitere Kultivierungen
Mg ²⁺ , Ni ²⁺	- kein Einfluss	-
SeO ₃ ²⁻ , MoO ₄ ²⁻	- leicht bis stark inhibierender Einfluss auf Wachstum und Produktbildung bei Konzentrationserhöhung	-
Hefeextrakt	- förderlicher Einfluss auf Wachstum und Produktbildung	- Verdopplung der Konzentration auf 4 g L ⁻¹ für weitere Kultivierungen
PO ₄ ³⁻	- kein Verbrauch feststellbar	-
L-Cystein	- längere Verzögerungsphase bei Konzentrationserhöhung	-
SO ₃ ²⁻	- Inhibierung des autotrophen Stoffwechsels	-
S ₂ O ₃ ²⁻	- kein Einfluss	-
NH ₄ ⁺	- inhibierender Einfluss auf autotrophen Stoffwechsel mit steigender Konz. - Verbrauch feststellbar - ammoniumabhängige Bildung von D-Alanin	- kein Zusatz von Ammonium zum Medium
Aminosäuren	- signifikanter Verbrauch von Aminosäuren im Hefeextrakt - L-Asparagin und L-Tryptophan möglicherweise limitierend	- Erhöhung der Konzentration an L-Asparagin und L-Tryptophan

Einen förderlichen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung unter autotrophen Bedingungen hatten die Konzentrationserhöhung von Hefeextrakt, Fe²⁺-Ionen und einer Kombination an Aminosäuren (vor allem L-Asparagin und L-Tryptophan). Außerdem wirkte sich die Reduktion der Ammoniumkonzentration förderlich auf die Produktbildung aus.

So kann an Hand der Ergebnisse aus der Untersuchung von Medienbestandteilen festgestellt werden, dass das Grundmedium DSMZ 135 für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* wie folgt modifiziert werden sollte:

- Hefeextraktkonzentration mindestens 4 g L^{-1}
- Fe^{2+} -Konzentration mindestens 5 mg L^{-1}
- Konzentration an L-Asparagin und L-Tryptophan mindestens 200 mg L^{-1}
- kein vorgelegtes Ammonium im Medium

Für die weitere Medienentwicklung könnte interessant sein, ob die Schwefelquelle L-Cystein während der Kultivierung aufgebraucht wird. Als zusätzliche lösliche Schwefelquelle konnte Thiosulfat ermittelt werden.

7 Produktinhibierung durch Acetat

Für eine wirtschaftliche Produktion von organischen Säuren mit Hilfe von Mikroorganismen ist eine hohe Toleranz des eingesetzten Stammes gegenüber des gebildeten Produkts erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass *Acetobacterium woodii* fähig ist, eine Acetatkonzentration von bis zu 50 g L^{-1} zu bilden. Dabei wurde Acetat bis zu einer Konzentration von etwa 30 g L^{-1} mit maximaler Produktionsrate gebildet. Mit steigender Acetatkonzentration im Medium nahm die Geschwindigkeit der Acetatbildung im weiteren Verlauf jedoch kontinuierlich ab und näherte sich asymptotisch einem Wert um die 50 g L^{-1} . Die Inhibierung durch Acetat wurde daher unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen mit ansteigender Acetatkonzentration im Medium im Parallelansatz genauer untersucht.

Abbildung 7.1a zeigt die Abhängigkeit der Bildung von Biomasse und Acetat von der Acetatkonzentration im Medium. Ist kein Acetat im Medium vorhanden, so wurde nach 48 Stunden eine Biomassekonzentration von $0,13 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ und eine Acetatkonzentration von $4,8 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ gebildet. War eine höhere Konzentration an Acetat im Medium vorhanden, konnte keine Biomassebildung mehr beobachtet werden und eine mit ansteigender Acetatkonzentration abnehmende Acetatbildung, so dass bei 30 g L^{-1} vorgelegtem Acetat im Medium innerhalb der 48 Stunden nur noch $0,5 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet wurden.

Durch die Verstoffwechslung von organischen Kohlenstoffquellen wie Fructose oder Glucose steht Mikroorganismen mehr Energie im Stoffwechsel zur Verfügung als beim Wachstum auf anorganischen Substraten wie H_2 und CO_2 . Daher wurde in einer weiteren Kultivierung untersucht, ob sich der inhibierende Effekt des Acetats in Anwesenheit von Fructose ebenso stark auf den Stoffwechsel von *A. woodii* auswirkt wie unter autotrophen Bedingungen. In Abbildung 7.1b zeigt sich dabei ein ähnliches Bild wie unter autotrophen Bedingungen. Wurden im Ansatz ohne Acetat noch eine Biomassekonzentration von $0,94 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ gebildet, so nahm diese mit steigender Acetatkonzentration ab auf $0,76 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ (10 g L^{-1} Acetat) und $0,40 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ (20 g L^{-1} Acetat). Ab einer Konzentration von etwa 30 g L^{-1} Acetat im Medium konnte keine Biomassebildung mehr nachgewiesen werden. Auch die Bildung von Acetat nimmt von $4,4 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$ im Ansatz ohne Acetat mit ansteigender Acetatkonzentration im Medium ab, so dass bei einer Acetatkonzentration von 30 g L^{-1} bei Versuchsende nur noch $1,2 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ Acetat im Medium nachgewiesen werden konnten. Bei einer Konzentration von mehr als 30 g L^{-1} konnte sowohl unter auto- wie auch unter heterotrophen Bedingungen keine Acetatbildung mehr nachgewiesen werden.

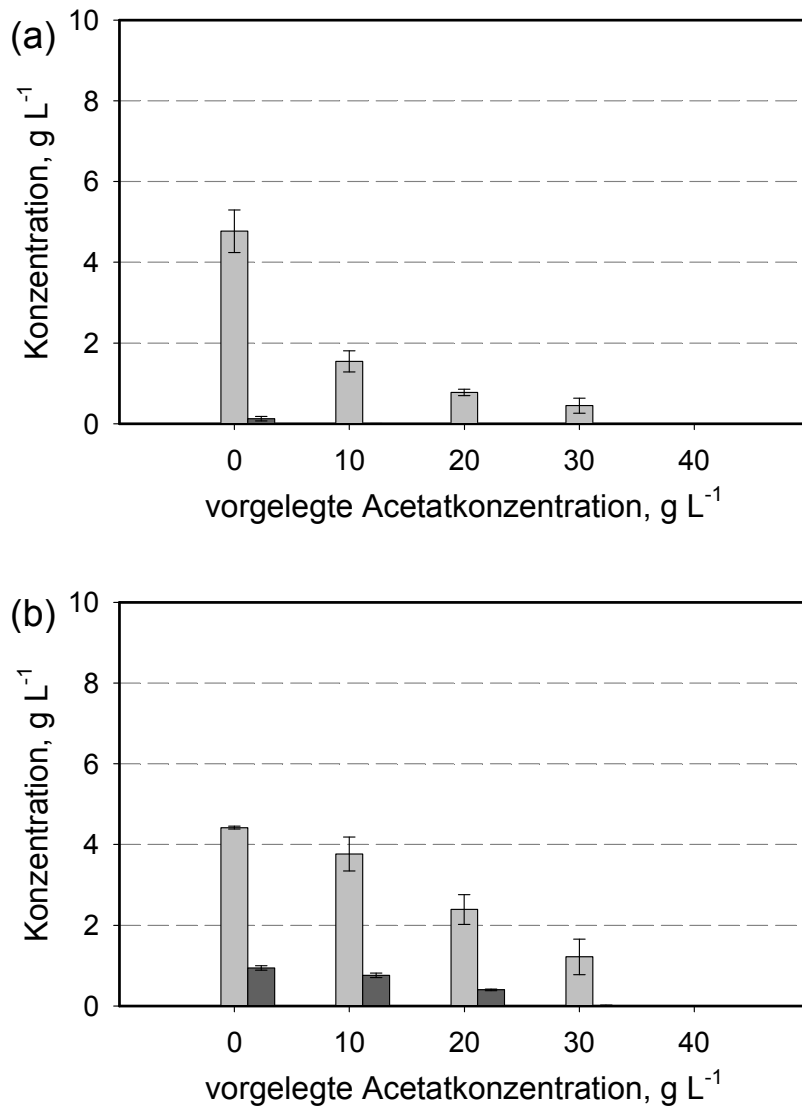


Abbildung 7.1: Konzentrationen an (■) Biomasse und (□) Acetat (a) nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung und (b) nach 24 h bei der heterotrophen Kultivierung ($c_0(\text{Fructose}) = 10 \text{ g L}^{-1}$) von *A. woodii* mit ansteigender Konzentration an Acetat im Medium unter pH-ungeregelten Bedingungen im System aus parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren ($c_{X0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $p_{\text{H}_2}^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $p_{\text{CO}_2}^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Bei der heterotrophen Kultivierung war Stickstoff statt Wasserstoff im Gasvolumenstrom vorhanden. Bei der autotrophen Kultivierung wurde der pH des Mediums vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO_2 zu gewährleisten. Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob *A. woodii* an hohe Acetatkonzentrationen gewöhnt werden kann. Dazu wurden Bakterienzellen während einer autotrophen Kultivierung bei einer Acetatkonzentration von etwa 40 g L^{-1} entnommen und in Septumflaschen kultiviert. Da das Wachstum auf den gasförmigen Substraten H_2 und CO_2 in Septumflaschen

stofftransportlimitiert ist, was sich durch niedrige Wachstums- und Produktbildungsraten zeigt, wurde das energiereiche Substrat Fructose als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

In Abbildung 7.2a ist zu sehen, dass nach Inokulation der autotrophen Bakterienzellen aus dem Laborrührkesselreaktor in frisches Medium das Substrat Fructose nach einer kurzen Verzögerungsphase konstant verbraucht wurde. Die Konzentration an Biomasse nahm dabei von anfangs $0,08 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,32 \text{ g L}^{-1}$ nach zwölf Tagen langsam zu. In der Anfangsphase nahm die Konzentration an Acetat langsam zu, so dass im Verlauf der Kultivierung integral etwa $1,6 \text{ g L}^{-1}$ Acetat gebildet wurde. Nach etwa einem Tag wurde Lactat gebildet und akkumulierte im Medium bis zu einer Konzentration von $4,4 \text{ g L}^{-1}$ nach zwölf Tagen.

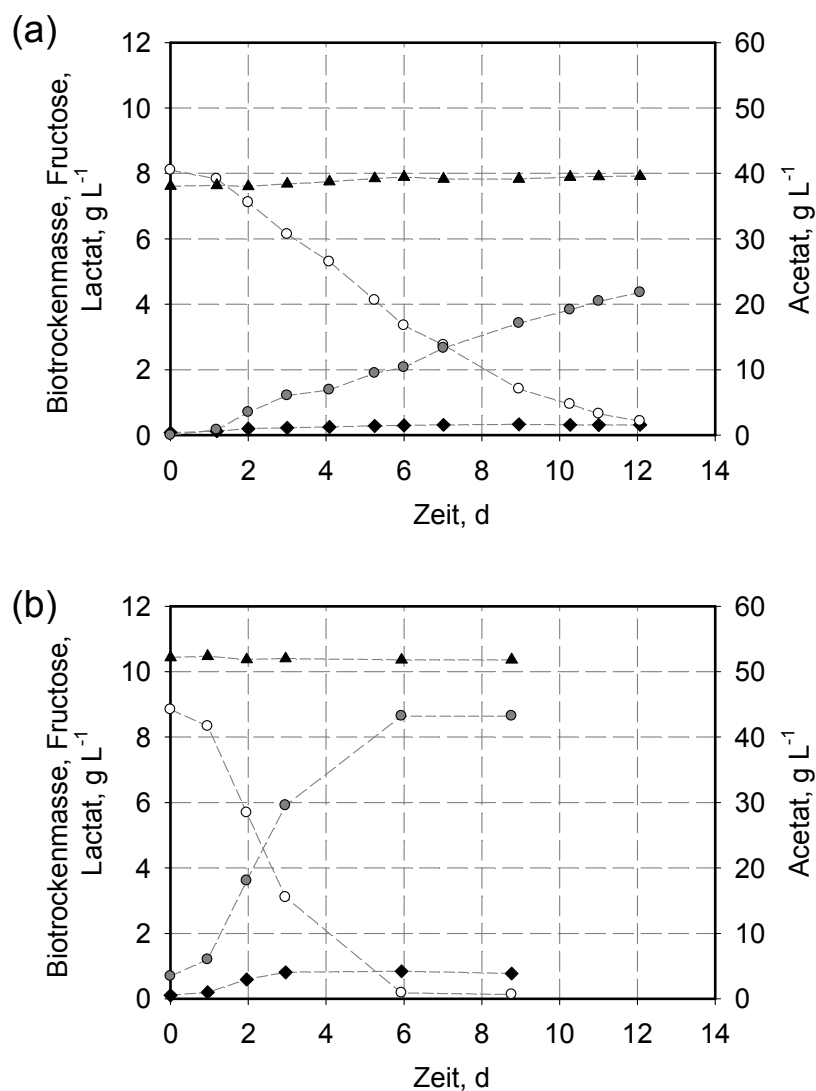


Abbildung 7.2: Verlauf der Konzentrationen an (○) Fructose, (◆) Biotrockenmasse, (▲) Acetat und (●) Lactat bei der heterotrophen Kultivierung von *A. woodii* in Septumflaschen in Anwesenheit von (a) etwa 40 g L^{-1} und (b) etwa 50 g L^{-1} Acetat im Medium. Als Inokulum für (a) wurden autotroph angewachsenen *A. woodii*-Zellen dem Laborrührkesselreaktor bei einer Acetatkonzentration von etwa 40 g L^{-1} entnommen; als Inokulum für (b) dienten Bakterienzellen nach zwei Passagen in Medium mit 40 g L^{-1} Acetat.

In Abbildung 7.2b nach Überimpfen der Bakterienzellen in frisches Medium mit einer Acetatkonzentration von etwa 50 g L^{-1} , nahm die Fructosekonzentration nach einer Verzögerungsphase nach zwei Tagen deutlich stärker ab als im ersten Ansatz, wobei innerhalb von drei Tagen etwa $0,7 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse gebildet wurde. Gleichzeitig nahm die Lactatkonzentration stark zu bis auf $8,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 5,3 Tagen. Die Acetatkonzentration blieb während der gesamten Kultivierung konstant bei 52 g L^{-1} . Es konnte somit keine Bildung von Acetat festgestellt werden.

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an Acetat im Medium auch schon in geringen Konzentrationen von $5 - 10 \text{ g L}^{-1}$ einen deutlich inhibierenden Einfluss auf *A. woodii* ausübt. Es zeigte sich dabei der gleiche inhibierende Effekt auf Wachstum und Produktbildung sowohl unter auto- als auch unter heterotrophen Bedingungen. Somit können die Bakterienzellen die inhibierenden Effekte des Acetats auch nicht durch Anwesenheit der energiereichen Kohlenstoffquellen Fructose umgehen. Im Parallelansatz unter pH-ungeregelten Bedingungen konnte ab einer Acetatkonzentrationen von 30 g L^{-1} kein Wachstum und keine Produktbildung mehr nachgewiesen werden. Im Laborrührkesselreaktor konnte unter pH-geregelten Bedingungen (pH 7,0) jenseits einer Acetatkonzentration von 30 g L^{-1} im Medium zwar kein Wachstum aber noch Produktbildung gemessen werden. Allerdings näherte sich die Acetatkonzentration im Medium gegen Ende der Fermentation abgesehen von den unterschiedlichen Produktbildungsraten immer asymptotisch an eine Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} im Medium an. Diese Konzentration wird üblicherweise von einigen acetogenen Bakterien erreicht (Verser und Eggeman, 2011). Diese Beobachtung deutet auf eine starke Produktinhibierung bei einer Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} hin. So konnten Klemps *et al.* (1987) zeigen, dass das Enzym Acetatkinase aus dem Acetogen *Acetogenium kivui* bei Acetatkonzentrationen von mehr als 48 g L^{-1} inhibiert wird. Acetatkinase katalysiert die terminale Reaktion des Acetyl-CoA-Wegs bei der Produktion von Acetat und eine Inhibierung dieses Enzyms würde zu einem verringerten Kohlenstofffluss durch diesen Stoffwechselweg führen. Ein Hinweis hierfür ist die Akkumulation des Zwischenprodukts Formiat bei Überschreiten einer Acetatkonzentration von etwa 30 g L^{-1} . Dies deutet daraufhin, dass im weiteren Verlauf dieses Stoffwechsels eine Blockade auftritt, die zu einer Akkumulation des Zwischenprodukts Formiat führen kann (Peters *et al.*, 1999).

Ein weiterer Hinweis auf die Inhibierung der Acetatkinase und somit der Blockade des Acetyl-CoA-Wegs konnte beim Versuch gefunden werden, *A. woodii* bei der Kultivierung auf Fructose an hohe Acetatkonzentrationen zu gewöhnen. Bei der ersten Passage aus einer autotrophen Kultivierung mit etwa 40 g L^{-1} Acetat im Medium in Medium mit etwa 40 g L^{-1} Acetat wurden nur etwa 2 g L^{-1} Acetat, jedoch 4 g L^{-1} Lactat gebildet. Bei weiteren Passagen in Anwesenheit von

bis zu 52 g L^{-1} Acetat im Medium konnte keine Acetatbildung mehr festgestellt werden, was auf eine komplette Blockade des Acetyl-CoA-Wegs hindeuten könnte. Die während der Glykolyse anfallenden Reduktionsäquivalente könnten bei einer Blockade des Acetyl-CoA-Wegs nicht mehr durch Bildung von Acetat entsorgt werden. Statt Acetat wurden fast 9 g L^{-1} Lactat aus Fructose gebildet. Lactat wird ausgehend von Pyruvat gebildet, wobei dieser Stoffwechselweg möglicherweise der Regenerierung des Kofaktors NADH/H^+ dienen könnte. Ein mögliches Modell der Inhibierung der Acetatbildung durch Inhibierung des Enzyms Acetatkinase ist in Abbildung 7.3 dargestellt. An der Acetatbildung aus Fructose und aus gasförmigen Substraten ist in beiden Fällen das Enzym Acetatkinase beteiligt. Durch Inhibierung dieses Enzyms könnte es zu einer kompletten Blockade der Acetatbildung kommen, was bedeuten würde, dass Pyruvat akkumuliert und nicht mehr weiterverwertet werden kann. Einige Acetogene besitzen jedoch die Fähigkeit, reduzierte Elektronentransfermoleküle, wie beispielsweise NADH_2 , über alternative Stoffwechselwege zu recyceln. Ein Beispiel für einen alternativen terminalen elektronen-akzeptierenden Prozess ist die Bildung von Lactat aus Pyruvat über das Enzym Lactat-Dehydrogenase (Drake *et al.*, 2002). Über diesen Stoffwechselweg können 2 Moleküle ATP aus dem Abbau der Fructose gewonnen werden. Die Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase wird dabei durch Fructose-1,6-bisphosphat hochreguliert (Holland und Pritchard, 1975). Deshalb wird vermutet, dass *A. woodii* diesen alternativen Stoffwechselweg besitzt, um beispielsweise in Gegenwart hoher Acetatkonzentrationen Energie für den Stoffwechsel zu gewinnen. Diese Fähigkeit wurde zwar für *A. woodii* noch nicht beschrieben, jedoch zeigte die Analyse des Genoms, dass dieser Stamm eine Lactat-Dehydrogenase besitzt (Schmidt, 2011).

Da *A. woodii* in Gegenwart hoher Acetatkonzentrationen fähig ist zu wachsen und Lactat zu bilden, wird vermutet, dass Acetatkonzentrationen von mehr als 50 g L^{-1} generell kein Problem darstellen für diesen Organismus. Daher resultiert die Inhibierung des Wachstums in Gegenwart von Acetatkonzentrationen $\geq 30 \text{ g L}^{-1}$ vermutlich zu einem großen Teil in der Inhibierung des Enzyms Acetatkinase und somit einer Blockade des Acetyl-CoA-Wegs.

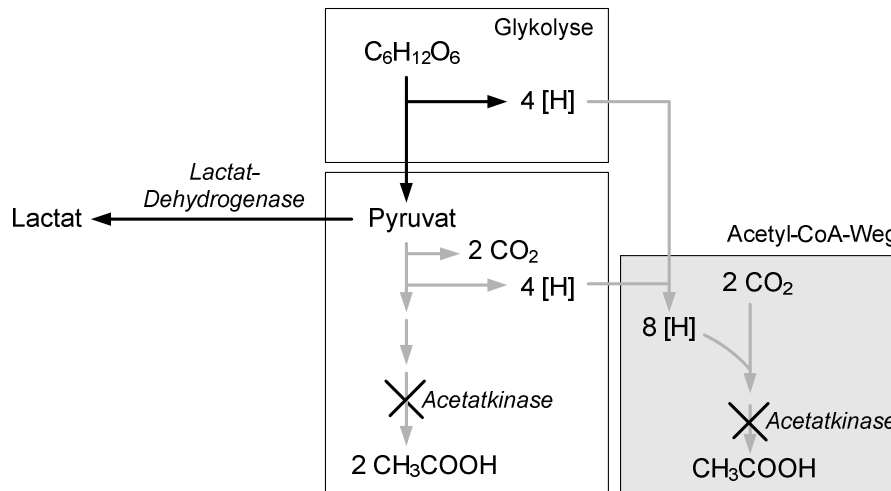


Abbildung 7.3: Vermutete Inhibierung der Acetatbildung von *A. woodii*. Durch Inhibierung des Enzyms Acetatkinase kann weder Pyruvat zu Acetat abgebaut werden, noch die in der Glykolyse anfallenden Reduktionsäquivalente über den Acetyl-CoA-Weg für die Reduktion von CO_2 zu Acetat verwendet werden. Dies führt zu Bildung von Lactat als reduziertem Endprodukt über einen in Acetogenen noch unbekanntem Weg.

Baronofsky *et al.* (1984) konnten zeigen, dass neben dem Acetation auch die undissoziierte Essigsäure einen inhibierenden Effekt auf den Stoffwechsel von acetogenen Bakterien ausübt. Die freie Säure diffundiert dabei über die Zellmembran ins Zellinnere und dissoziiert aufgrund des höheren zellinternen pH. Dabei werden transmembrane Protonengradienten entkoppelt, was zum Verlust der Protonenmotorischen Kraft führt, an die Mechanismen zur Energiekonservierung gekoppelt sind. Um die inhibierenden Effekte der freien Essigsäure gering zu halten, werden acetogene Mikroorganismen oftmals durch Kontrolle des pH im neutralen Bereich kultiviert.

Für die stabile Produktion großer Mengen an Essigsäure ist die Resistenz gegenüber dieser organischen Säure ausschlaggebend. So ist eines der wichtigsten Merkmale der industriell eingesetzten Essigsäurebakterien ihre hohe Toleranz gegenüber der gebildeten Essigsäure (Raspor und Goranovic, 2008). So kann beispielsweise mit *Acetobacter aceti* Essigsäure mit einer Konzentration von bis zu 170 g L^{-1} hergestellt werden, wobei die Bakterienzellen nur bis zu einer Konzentration von 120 g L^{-1} wachsen (Berraud, 2000). Einige der Mechanismen der Resistenz gegenüber Essigsäure wurden dabei entschlüsselt. So konnte dem Enzym Citratsynthase eine zentrale Rolle zugeschrieben werden, da es Acetat über den Citrat- oder Glyoxylatzyklus verstoffwechselt und damit ATP bereitstellt, um die toxischen Effekte der organischen Säure zu bewältigen (Francois *et al.*, 2006). Ein weiterer Schutzmechanismus gegenüber der gebildeten Essigsäure sind die Ethanol-verwertenden Enzyme Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase. Über die Oxidation von Ethanol werden dabei Elektronen zum Aufbau einer protonenmotorischen Kraft über die Zellmembran bereitgestellt. Diese Kraft liefert wiederum die Energie für den Transport von Essigsäure aus der Bakterienzelle über einen

Transporter in der Membran und ermöglicht so dem Bakterium, bei hohen Konzentrationen dieser organischen Säure zu wachsen (Matsushita *et al.*, 2005). Außerdem konnten Nakano *et al.* (2004) zeigen, dass das Enzym Aconitase eine Rolle in der Acetattoleranz spielt. Das Enzyme Aconitase katalysiert im Citratzyklus die Umwandlung von Citrat oder Isocitrat in Aconitat. Durch Überexpression dieses Enzyms konnten eine verkürzte Lag-Phase sowie höhere Essigsäurekonzentrationen erreicht werden.

In Tabelle 7.1 ist die Toleranz des eingesetzten Bakterienstamms vergleichend dargestellt zu einem natürlichen aeroben Essigsäureproduzenten und industriell eingesetzten Plattformorganismen. Für die Vielzahl an Mikroorganismen ist Essigsäure schädlich für den Stoffwechsel in Konzentrationen von etwa 5 g L^{-1} (Conner und Kotrola, 1995). So liegen auch die tolerierten Konzentrationen an Essigsäure/Acetat einiger Plattformorganismen in diesem Bereich. Gebhardt (2010) erreichte mit einem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* Stamm zur Produktion von Succinat 56 g L^{-1} Acetat als Nebenprodukt. Besonders anzumerken ist zudem *Escherichia coli*, der sehr empfindlich ist gegenüber organischen Säuren (Luli und Strohl, 1990).

Tabelle 7.1: Zusammenstellung der Toleranz verschiedener Mikroorganismen gegenüber Acetat/Essigsäure beim jeweiligen pH.

Organismus	pH	Essigsäure/Acetat, g L^{-1}	Quelle
<i>Acetobacter aceti</i>	-	170	Berraud, 2000
<i>Acetobacterium woodii</i>	7,0	50	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>	7,0	5	Luli und Strohl, 1990
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,0	7,5	Maiorella <i>et al.</i> , 1983
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> rekombinant	5,0	56	Gebhardt, 2010
<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i>	-	10,8	Wendisch <i>et al.</i> , 2000
<i>Zymomonas mobilis</i>	5,0	10	Lawford und Rousseau, 1994

8 Charakterisierung von rekombinanten *Acetobacterium woodii* unter definierten Reaktionsbedingungen

Im folgenden wird eine weitere Möglichkeit untersucht, um die Geschwindigkeit der autotrophen Acetatbildung zu erhöhen. Beim Kooperationspartner, dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Universität Ulm), wurde der eingesetzte Bakterienstamm durch Überexpression von Enzymen des Acetyl-CoA-Wegs gentechnisch modifiziert, um den Kohlenstofffluss durch diesen Stoffwechselweg und somit die Acetatbildungsrate zu erhöhen. In Abbildung 8.1 sind die Überexpressionen des Acetyl-CoA-Wegs graphisch dargestellt.

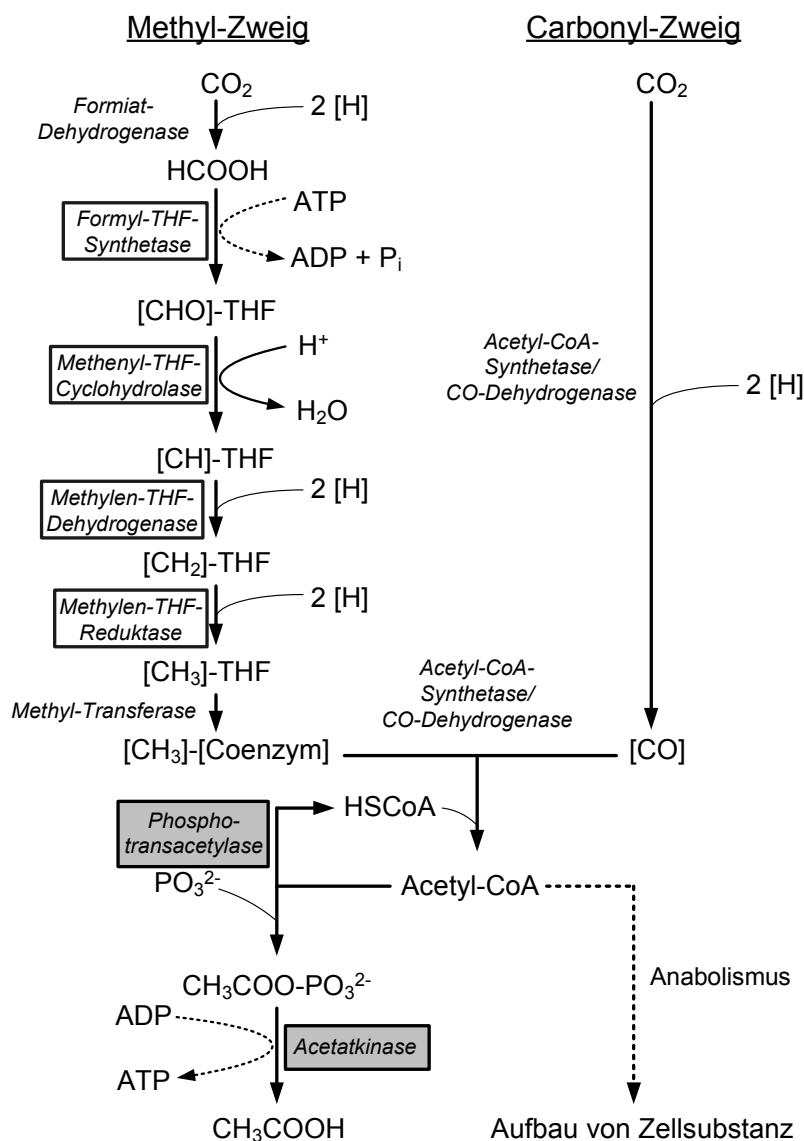


Abbildung 8.1: Schema des Acetyl-CoA-Weg zur Darstellung der gentechnischen Veränderungen rekombinanter *A. woodii* Stämme. Der Stamm "*A. woodii* THF" trägt Überexpressionen der vier THF-abhängigen Enzyme (schwarz eingerahmt) aus *Clostridium ljungdahlii*; "*A. woodii* pta-ack" trägt Überexpressionen der Enzyme Phosphotransacetylase (pta) und Acetatkinase (ack) (schwarz eingerahmt und grau hinterlegt) aus *Clostridium ljungdahlii*.

Peters *et al.* (1999) zeigten, dass das Zwischenprodukt Formiat beim H₂-abhängigen Wachstum von acetogenen Bakterien vorübergehend im Medium akkumuliert, anschließend jedoch wieder verbraucht wird. Daraus folgerten sie, dass die ATP-abhängige Bildung von Formyl-THF ausgehend von Formiat, das durch Reduktion von CO₂ über die Formiat-Dehydrogenase gebildet wird, einen kurzzeitigen Engpass in diesem Stoffwechselweg darstellt. In einem Ansatz sollte die Weiterverarbeitung des Zwischenprodukts Formiat über den Methylzweig durch gemeinsame Überexprimierung der vier Enzyme, die die folgenden Schritte des Acetyl-CoA-Wegs katalysieren, beschleunigt und dieser mögliche Engpass somit umgangen werden. Da alle vier Enzyme Tetrahydrofolat (THF) als Coenzym benötigen, wird dieser rekombinante Stamm im Folgenden als "*A. woodii* THF" bezeichnet (Abbildung 8.1).

Durch Überexprimierung der Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase, die die terminalen Reaktionen des Acetyl-CoA-Wegs katalysieren, sollte der Stofffluss in einem weiteren Ansatz durch den Acetyl-CoA-Weg und somit die Acetatbildungsrate gesteigert werden. Bei der Umsetzung von Acetyl-Phosphat zu Acetat durch die Acetatkinase wurde zudem ein Molekül ATP über Substratkettenphosphorylierung gewonnen. In Anwesenheit einer erhöhten Enzymkonzentration der Acetatkinase könnte so der Energiegewinn der Bakterienzelle gesteigert werden. Der rekombinante Bakterienstamm, der diese Überexprimierungen trägt, wird im Folgenden "*A. woodii* pta-ack" genannt (Abbildung 8.1).

Die Genomsequenz von *A. woodii* war zum Zeitpunkt der gentechnischen Arbeiten an diesem Stamm zwar entschlüsselt (Schmidt, 2011), jedoch noch nicht veröffentlicht. Daher wurden alle eingebrachten Gensequenzen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dürre (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm) aus dem veröffentlichten Genom des acetogenen Bakteriums *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 entnommen. Es handelt sich folglich um heterolog in *A. woodii* exprimierte Enzyme.

Für die Überexpression der Enzyme aus *C. ljungdahlii* wurde der *Escherichia coli*-*Clostridium*-Shuttlevektor pJIR750 verwendet, der routinemäßig *Clostridium acetobutylicum* und anderen Clostridien eingesetzt wurde (Bannam und Rood, 1993; Cai und Bennett, 2011). Der hier verwendete Vektor enthält als Selektionsmarker eine Resistenz gegen das Antibiotikum Thiamphenicol. Auf den Vektoren pJIR750_pta-ack und pJIR750_THF, die die Gensequenzen für die zu überexprimierenden Enzyme enthalten, ist zusätzlich eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol enthalten. Alle Kultivierungen der rekombinanten Stämme wurden in Gegenwart von 20 mg L⁻¹ Thiamphenicol durchgeführt. In Anwesenheit dieses Antibiotikums zeigte der Wildtypstamm kein Wachstum.

8.1 Kultivierung im Parallelansatz

Die rekombinanten Stämme von *A. woodii* wurden unter autotrophen Bedingungen im Vergleich zum Wildtypstamm mit und ohne Leerplasmid kultiviert. Es wurden dabei die Standardbedingungen für die parallele autotrophe Kultivierung von *A. woodii* im Medium DSMZ 135 verwendet.

Abbildung 8.2 zeigt, dass in den Ansätzen mit dem Wildtyp-Stamm eine Acetatkonzentration von $4,0 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ innerhalb von 48 Stunden gebildet wurde, wohingegen in den Ansätzen mit rekombinanten Stämmen in Anwesenheit von Thiamphenicol nur eine Acetatkonzentration von $1,8 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. In den Ansätzen mit dem Wildtypstamm wurde innerhalb der Prozesszeit eine Biomassekonzentration von $0,17 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ gebildet, in allen Ansätzen mit rekombinanten Stämmen nur $0,06 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$.

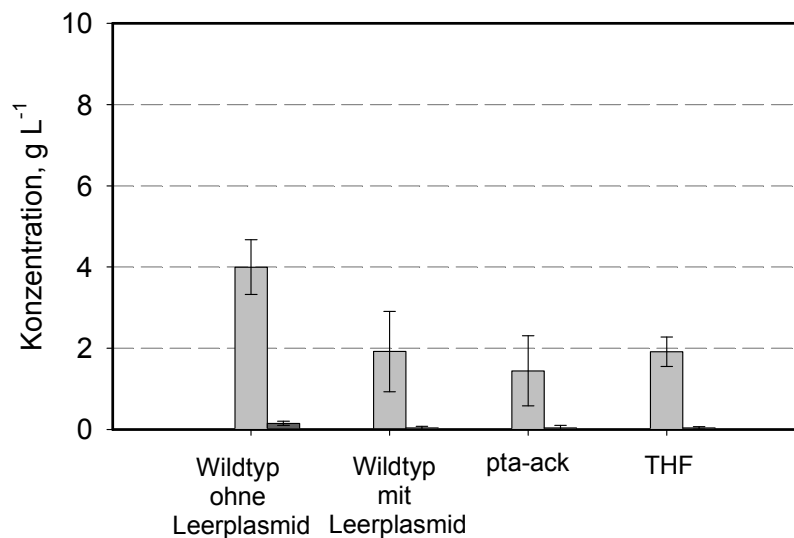


Abbildung 8.2: Konzentrationen an (■) Biomasse und (▒) Acetat nach 48 h bei der autotrophen Kultivierung der rekombinanten Stämme *A. woodii* pta-ack und *A. woodii* THF im Vergleich zum Wildtyp-Stamm mit und ohne Leerplasmid (pJIR750) unter pH-ungeregelten Bedingungen in parallelen Rührkesselreaktoren im Satzverfahren ($c_{x0} = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $V_0 = 12 \text{ mL}$, Medium = DSMZ 135, $T = 30 \text{ °C}$, $n = 2800 \text{ min}^{-1}$, $V_g = 48 \text{ L h}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 800 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 200 \text{ mbar}$). Der pH des Mediums wurde vor Beginn der Kultivierung auf 7,2 eingestellt, um eine ausreichende Verfügbarkeit des gasförmigen CO_2 zu gewährleisten. Die Kultivierungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Diskussion

Eine vergleichende parallele Kultivierungen von rekombinanten *Acetobacterium woodii* im Satzverfahren ohne pH-Kontrolle im System aus parallelen Rührkesselreaktoren hat gezeigt, dass sowohl der Wildtyp-Stamm mit Leerplasmid als auch die rekombinanten Stämme deutlich weniger Biomasse und Acetat gebildet haben als der Wildtyp-Stamm ohne Leerplasmid. Dies kann möglicherweise auf die Anwesenheit des Antibiotikums Thiamphenicol im Medium der

plasmid-tragenden Stämme zurückzuführen sein. Dieser Effekt konnte bei vergleichenden Kultivierungen der rekombinanten Stämme in Septumflaschen unter heterotrophen Bedingungen nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

8.2 Vergleichende Kultivierung im Litermaßstab

Im Folgenden wurden die rekombinanten *A. woodii* Stämme unter autotrophen Bedingungen im Litermaßstab vergleichend kultiviert. Als Referenzstämme dienten der Wildtyp mit und ohne Leerplasmid pJIR750. Anhand der vorherigen Untersuchungen zur Limitierung der Acetatproduktion unter autotrophen Bedingungen wurden die Kultivierungsbedingungen für die vergleichende Charakterisierung der rekombinanten Stämme so gewählt, dass nach aktuellem Kenntnisstand weder eine Limitierung des Stofftransports, noch eine Limitierung durch das Medium auftrat. So ist eine vergleichende Charakterisierung der rekombinanten Stämme möglich, da eine Limitierung unter diesen Bedingungen nur kinetisch bedingt durch den Stoffwechsel der Bakterien auftreten kann.

In Kapitel 5.4 wurde ermittelt, dass mit einer Biomassekonzentration von unter 1 g L^{-1} die Bakterienzellen die als maximal ermittelte zellspezifische Produktbildungsrate erreichten. Diese Bedingungen wurden als nicht-limitierend bezüglich des Gas-Flüssig-Stofftransports und des Mediums angenommen. So wurden sowohl der Vergleich des Wildtyp-Stamm mit und ohne Leerplasmid als auch der Vergleich der rekombinanten Stämme mit einer Biomassekonzentration von $0,57 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ gestartet.

Bei Vergleich der Verläufe der Biomassekonzentrationen in Abbildung 8.3a lässt sich erkennen, dass sich die Anwesenheit des Leerplasmids stabilisierend auf das Wachstum des Wildtyps auswirkt. Wird vom Wildtyp ohne Leerplasmid eine Wachstumsrate von $0,035 \text{ h}^{-1}$ und eine maximale Biomassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, so liegt diese beim Stamm mit Leerplasmid bei $0,052 \text{ h}^{-1}$ und bei $1,7 \text{ g L}^{-1}$. Auffällig ist auch, dass die Biomasse des Wildtyps bis zum Ende der Kultivierung nicht so stark abnahm wie beim Stamm ohne Leerplasmid, so dass bei Versuchsende nach 3,7 Tagen noch eine Biomassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ im Medium vorhanden war. Beim Wildtyp ohne Leerplasmid nahm die Biomasse nach etwa 1,8 Tagen wieder ab, was ohne Nachdosierung von Antischaummittel zur Entleerung eines Teil des Mediums in die Schaumfalle des Reaktors und somit zum Ende des Versuchs nach zwei Tagen geführt hat. In Abbildung 8.3b zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf der Acetatbildung, es werden von beiden Stämmen sehr ähnliche volumetrische und zellspezifische Produktbildungsrate von $25,1 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $20,8 \pm 0,2 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Die maximal erreichte Acetatkonzentration beim Wildtyp mit Leerplasmid lag nach 3,7 Tagen bei $44,7 \text{ g L}^{-1}$, die vom Wildtyp ohne Leerplasmid in früheren Versuchen (siehe Kapitel 5.4) jedoch auch schon

erreicht wurde, was an dieser Stelle auf Grund des übergeschämten Reaktors jedoch nicht gezeigt werden konnte.

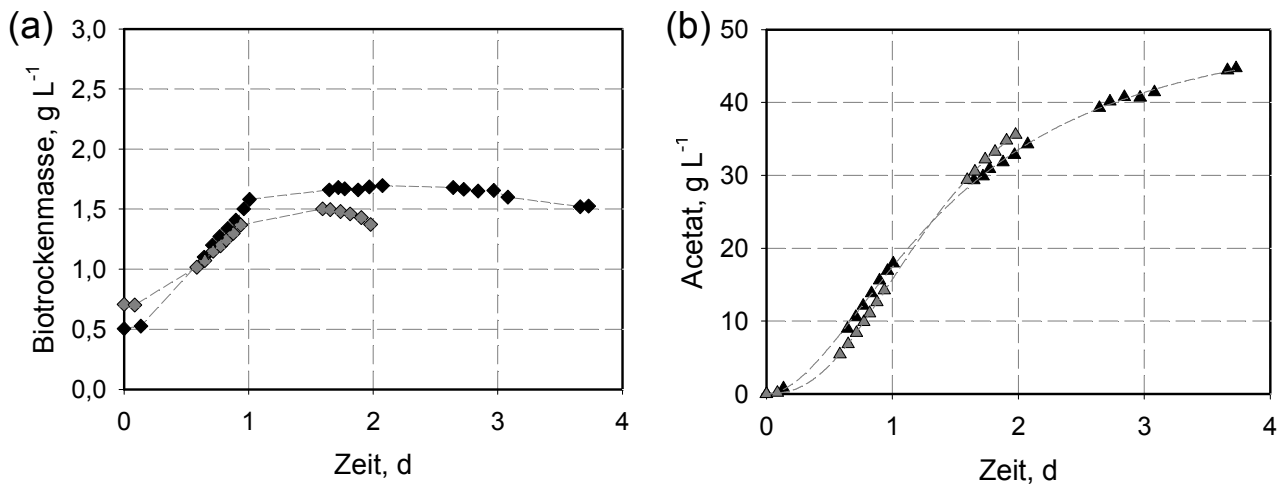


Abbildung 8.3: Verlauf der Konzentrationen and (a) Biotrockenmasse und (b) Acetat bei der vergleichenden autotrophen Kultivierung von *A. woodii* (◆, ▲) mit und (◇, ▲) ohne Leerplasmid unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, pH = 7,0, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L⁻¹), $n = 1200$ min⁻¹, $V_g = 30$ L h⁻¹ (0,5 vvm), $p_{H_2}^{\text{Eingang}} = 400$ mbar, $p_{CO_2}^{\text{Eingang}} = 100$ mbar, $p_{\text{tot}} = 1,0$ bar).

Im Folgenden wurden die rekombinanten Stämme *A. woodii* pta-ack und *A. woodii* THF im Vergleich zum Wildtyp-Stamm mit Leerplasmid (Kontrollstamm) unter denselben autotrophen Bedingungen wie eben beschrieben charakterisiert.

Wie in Abbildung 8.4a dargestellt, nimmt die Biomasse in den Ansätzen mit den rekombinanten Stämmen *A. woodii* pta-ack und *A. woodii* THF etwas schneller zu als im Referenzansatz mit dem Wildtyp-Stamm mit Leerplasmid, was sich in der Wachstumsrate in Tabelle 8.1 jedoch kaum bemerkbar macht. Dabei werden in den Ansätzen mit den rekombinanten Stämmen höhere maximale Biomassekonzentrationen von $1,9$ g L⁻¹ (*A. woodii* pta-ack) und $2,0$ g L⁻¹ (*A. woodii* THF) im Vergleich zum Kontrollstamm ($1,7$ g L⁻¹) erreicht. Nach etwa 2 - 3 Tagen nahm die Biomassekonzentration in allen Ansätzen wieder leicht ab, so dass gegen Versuchsende nach 3,7 Tagen eine Konzentration von $1,58 \pm 0,04$ g L⁻¹ vorhanden war.

In allen Ansätzen setzte die Acetatbildung nach einer kurzen Verzögerungsphase ein, so dass nach etwa einem halben Tag in allen Ansätzen maximale Produktbildungsrate erreicht wurden (Abbildung 8.4b). Dabei wurde vom Kontrollstamm und vom Stamm *A. woodii* THF eine zellspezifische Produktbildungsrate von $20,6 \pm 0,1$ g g⁻¹ d⁻¹ erreicht, die vergleichbar mit der des Wildtyps ohne Leerplasmid ist. Für den Stamm *A. woodii* pta-ack wurde eine leicht höhere zellspezifische Rate von $21,7$ g g⁻¹ d⁻¹ ermittelt.

Die volumetrischen Produktbildungsraten der beiden rekombinanten Stämme lagen dabei auf Grund der schnelleren Biomassezunahme mit $28,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ über der des Kontrollstamm (25,3 $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Die Acetatbildung verlangsamte sich beim Kontrollstamm etwas früher als bei den rekombinanten Stämmen, so dass bei Versuchsende nach 3,7 Tagen maximale Acetatkonzentrationen von $44,7 \text{ g L}^{-1}$ (Kontrollstamm), $50,5 \text{ g L}^{-1}$ (*A. woodii* pta-ack) und $51,0 \text{ g L}^{-1}$ *A. woodii* (THF) im Medium vorhanden waren.

Wie in Abbildung 8.4c zu sehen ist, akkumuliert in allen Ansätzen das Zwischenprodukt Formiat im Medium, sobald eine Acetatkonzentration im Medium von etwa 20 g L^{-1} überschritten ist. Dies tritt im Stamm *A. woodii* THF früher als im Kontrollstamm und im Stamm *A. woodii* pta-ack auf. Bei Versuchsende waren in diesen beiden Ansätzen $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Formiat im Medium akkumuliert, wohingegen bei *A. woodii* THF $0,4 \text{ g L}^{-1}$ vorlagen.

Tabelle 8.1: Zusammenfassung der Wachstumsraten und der volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten der vergleichenden Kultivierung des Wildtyp-Stamm mit und ohne Leerplasmid aus Abbildung 8.3 und der rekombinanten Stämme *A. woodii* pta-ack und *A. woodii* THF im Vergleich zum Wildtyp mit Leerplasmid aus Abbildung 8.4.

Stamm	Wachstumsrate μ_{\max} , h^{-1}	vol. Produktionsrate Q_P , $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	zellspez. Produktionsrate q_P , $\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Wildtyp	0,035	24,96	20,99
Wildtyp mit Leerplasmid	0,052	25,31	20,54
pta-ack	0,050	28,81	21,74
THF	0,056	28,75	20,59

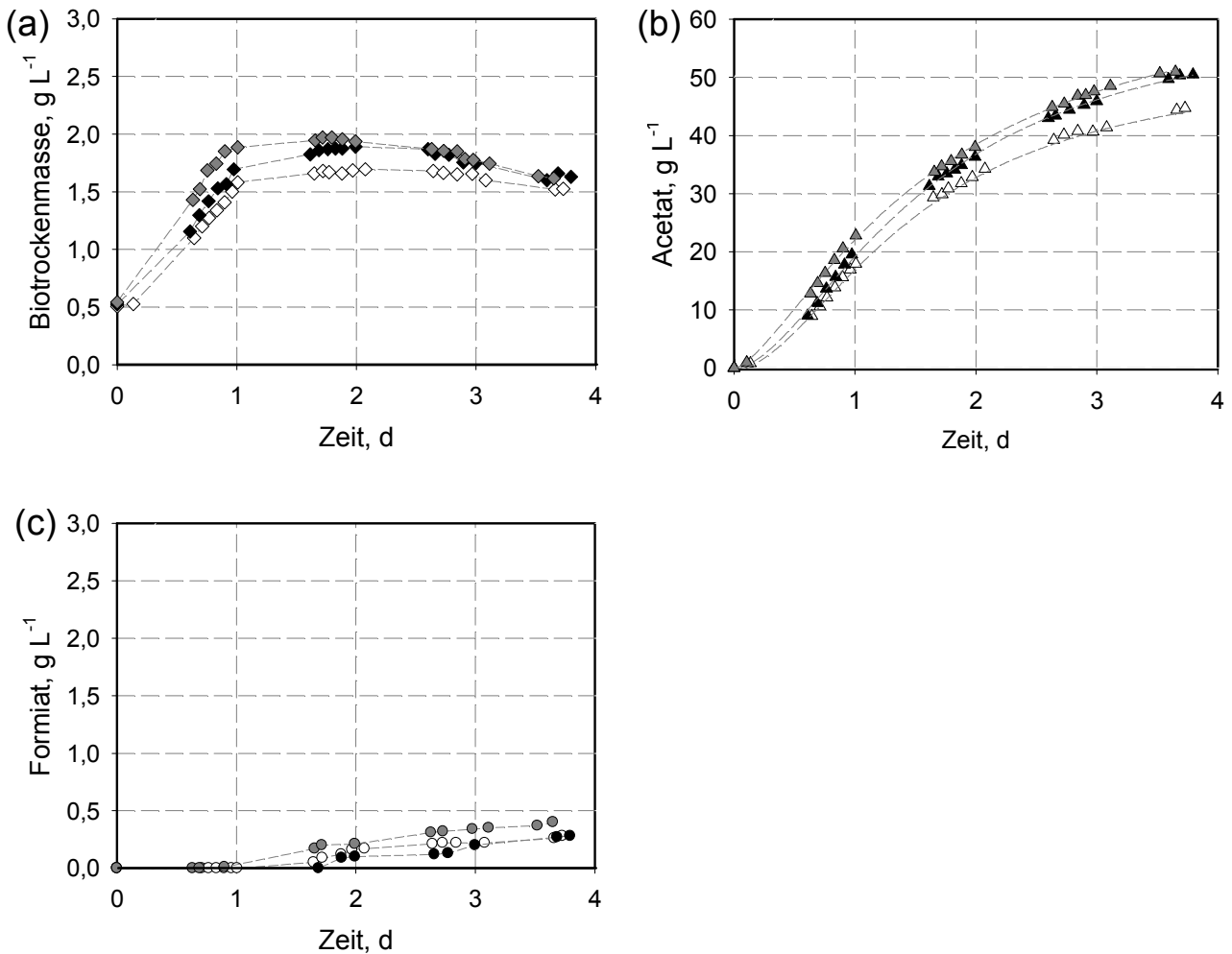


Abbildung 8.4: Verlauf der Konzentrationen an (a) Biotrockenmasse, (b) Acetat und (c) Formiat bei der vergleichenden autotrophen Kultivierung von (\diamond , Δ , \circ) *A. woodii* mit Leerplasmid, (\blacklozenge , \blacktriangle , \bullet) *A. woodii* pta-ack und (\blacklozenge , \blacktriangle , \bullet) *A. woodii* THF unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0$ L, $\text{pH} = 7,0$, Medium = DSMZ 135HF, $T = 30$ °C, Titrationsmittel NaOH (10 mol L^{-1}), $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, $\dot{V}_g = 30 \text{ L h}^{-1}$ (0,5 vvm), $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$, $\text{pCO}_2^{\text{Eingang}} = 100 \text{ mbar}$, $\text{p}_{\text{tot}} = 1,0 \text{ bar}$).

Diskussion

Ein Vergleich der rekombinanten Stämme im Litermaßstab unter autotrophen Bedingungen hat gezeigt, dass sich die Anwesenheit des Plasmids pJIR750 in *A. woodii* stabilisierend auf das Wachstumsverhalten der plasmidtragenden Stämme ausgewirkt hat. Während die Biomassekonzentrationen beim Wildtyp-Stamm in autotrophen Kultivierungen in dieser Arbeit im Verlauf der Kultivierung nach einer kurzen stationären Phase generell wieder abgenommen haben, so blieben die rekombinanten Bakterienzellen im Vergleich länger in der stationären Phase.

Da dieser stabilisierende Effekt auf das Wachstum auch beim Wildtypstamm mit Leerplasmid auftrat, wird dieser Effekt möglicherweise durch das Plasmid pJIR750 ausgelöst und durch

Einbringen von Genen für den Acetyl-CoA-Weg noch weiter erhöht. Auf dem Plasmid pJIR750 sind die Gene das *catP* und das *lacZ* enthalten, die für die Enzyme Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) und β -Galactosidase kodieren (Bannam und Rood, 1993). Diese beiden Enzyme können nach aktuellem Wissensstand nicht mit dem wachstumsfördernden Effekt des Plasmid pJIR750 auf *A. woodii* in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren ist auf dem verwendeten Plasmid das *rep*-Gen enthalten, das für eine DNA-Helikase aus *Escherichia coli* kodiert, der möglicherweise ein fördernder Effekt auf die Vermehrung von *A. woodii*-Zellen zugesprochen werden könnte. Die Rep-Helikase spielt eine Rolle in der Replikation, Reparatur und Rekombination von DNA (Wong *et al.*, 1996). Die Erhöhung der DNA-Replikation durch Anwesenheit der Rep-Helikase in *A. woodii* könnte zu einem förderlichen Effekt auf das Wachstum dieses Bakteriums führen. Diese Hypothese könnte durch Entfernung dieses Gens vom eingesetzten Plasmid und Untersuchung des Wachstumsverhaltens der neu transformierten Stämme untersucht werden.

Die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate des Kontrollstamms änderte sich durch Einbringung des Leerplasmids oder Erhöhung der zellinternen Konzentrationen der THF-abhängigen Enzyme nicht. Durch Erhöhung der Konzentration der Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase in *A. woodii* konnte die zellspezifische Acetatbildungsrate leicht erhöht werden von 21,0 auf 21,7 g g⁻¹ d⁻¹, nicht jedoch die maximal erreichte Acetatkonzentration. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass das Enzym Acetatkinase durch das gebildete Acetat inhibiert wird. So beschrieben Klemps *et al.* (1987), dass die Acetatkinase aus dem Acetogen *Thermoanaerobacter kivui* bei Acetatkonzentrationen über 48 g L⁻¹ inhibiert wird. Da von acetogenen Mikroorganismen generell Acetatkonzentration von etwa 50 g L⁻¹ erreicht werden können (Verser und Eggeman, 2011), scheint die Inhibierung der Acetatkinase allgemein bei Acetogenen aufzutreten. So kann aus den Ergebnissen der ersten Kultivierung des rekombinanten Stammes *A. woodii* mit erhöhter zellinterner Konzentration an Acetatkinase und Phosphotransacetylase geschlossen werden, dass zwar eine leicht erhöhte zellspezifische Acetatbildung, jedoch keine signifikante Erhöhung der maximal erreichbaren Acetatkonzentration erreicht werden konnte.

Möglicherweise könnte die maximale Acetatkonzentration durch Aufhebung der Inhibierung der Acetatkinase erhöht werden. Ingram-Smith *et al.* (2005) berichteten zum Beispiel von einer erhöhten Affinität der Acetatkinase zu Acetat aus *Methanosarcina thermophila* durch genetische Modifikation der Acetat-Bindestasche. Dieser Organismus verwendet Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle für die Produktion von Methan (Ingram-Smith *et al.*, 2006). Alternativ dazu könnte dieses Enzym durch Herabsetzen der Affinität für Acetat in Anwesenheit von Acetat länger aktiv bleiben und so höhere höhere Acetatkonzentrationen erreicht werden.

9 Zusammenfassung

Essigsäure stellt eines der wichtigsten Ausgangsprodukte der chemischen Industrie dar und wird gegenwärtig ausschließlich auf der Basis von fossilen Rohstoffen hergestellt. Die biotechnologische Produktion von Essigsäure aus gasförmigen Substraten mit Hilfe von acetogenen Mikroorganismen stellt eine Alternative zu den traditionellen petrochemischen Produktionsprozessen dar. Die Kenngrößen eines biotechnologischen Acetatproduktionsprozesses mit dem acetogenen Mikroorganismus *Acetobacterium woodii* waren dabei jedoch noch weitgehend unbekannt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war deshalb die reaktionstechnische Untersuchung der autotrophen Herstellung von Acetat mit *A. woodii*. Dabei galt es, limitierende Schritte bei der Umsetzung der gasförmigen Substrate in Rührkesselreaktoren im Labormaßstab zu identifizieren und ein geeignetes Reaktionsmedium für die autotrophe Kultivierung von *A. woodii* zu entwickeln. Dabei wurde der eingesetzte Bakterienstamm bezüglich Acetatbildungsrate und erreichbare Acetatkonzentration charakterisiert.

Nachdem gezeigt wurde, dass *A. woodii* bei Kontrolle des pH auf 7,0 Acetat in Konzentration von mehr als 30 g L^{-1} im Satzverfahren produzieren kann, wurden zunächst einflussnehmende Größen und mögliche Limitierungen bei der Umsetzung der gasförmigen Substrate H_2 und CO_2 in Rührkesselreaktoren untersucht. Bei einem volumetrischen Leistungseintrag $< 1 \text{ W L}^{-1}$ kam es dabei zu einer unzureichenden Versorgung der Bakterienzellen mit dem schlecht löslichen Substrat Wasserstoff. Unter diesen Bedingungen konnte die Wasserstoff-Eintragsrate im Laborrührkesselreaktor durch Erhöhung des Partialdrucks an Wasserstoff von 400 auf 1700 mbar verbessert und somit eine deutliche Steigerung der volumetrischen Acetatbildungsrate erzielt werden. Durch Erhöhung des Leistungseintrages auf $15,4 \text{ W L}^{-1}$ im Parallelrührkesselreaktorsystem im Millilitermaßstab, beziehungsweise $5,5 \text{ W L}^{-1}$ im Laborrührkesselreaktor im Litermaßstab konnte eine Gas-Flüssig-Stofftransportlimitierung überwunden werden. Im Laborrührkesselreaktor wurde dabei eine maximale Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} erreicht, was etwa fünfmal mehr ist, als die für *A. woodii* veröffentlichte Acetatkonzentration. Bei einer Biomassekonzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ wurde dabei eine maximale zellspezifische Acetatbildungsrate von $21,0 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für *A. woodii* unter autotrophen Bedingungen gemessen. Diese Rate kann aus Mangel an vergleichbaren Literaturwerten für diesen Mikroorganismus nicht verglichen werden, liegt jedoch deutlich über den zellspezifischen Acetatbildungsraten, die mit anderen acetogenen Mikroorganismen unter autotrophen Bedingungen im Satzverfahren ermittelt wurden.

Bei einer Erhöhung der Zelldichte im Reaktor wurde eine Abnahme der zellspezifischen Acetatbildungsrate gemessen, was auf eine weitere Limitierung der autotrophen Acetatbildung neben der Wasserstoff-Eintragsrate hindeutet. Auf der Suche nach weiteren Limitierungen der

autotrophen Acetatproduktion konnten durch reaktionstechnische Untersuchungen von *A. woodii* in einem Parallelrührkesselreaktorsystem limitierende Bestandteile des Reaktionsmediums identifiziert werden. So zeigte sich, dass die Erhöhung der Konzentration von Eisen(II)-Ionen und von Hefeextrakt zu einer Steigerung des Wachstums und der Produktbildung unter autotrophen Bedingungen geführt hat. Des Weiteren konnte bei der Satzkultivierung im Laborrührkesselreaktor gemessen werden, dass die Aminosäuren L-Tryptophan und L-Asparagin im vorgelegten Hefeextrakt komplett verbraucht wurden. Eine selektive Erhöhung dieser Aminosäuren hatte eine deutlich erhöhte Acetatbildungsrate unter autotrophen Bedingungen zur Folge. Außerdem wurde beobachtet, dass der autotrophe Stoffwechsel von *A. woodii* von der Stickstoffquelle Ammonium abhängig ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich freies Ammonium im Medium inhibierend auf den Stoffwechsel von *A. woodii* auswirkt. Unter optimierten Reaktionsbedingungen in Medium ohne Ammonium konnte eine maximale volumetrische Produktbildungsrate von $43,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einer Biomassekonzentration von $3,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Da mit einer zellspezifischen Acetatbildungsrate von $14 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nicht die maximale mögliche Rate von $21,0 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht wurde, wird vermutet, dass die autotrophe Acetatbildung auch unter diesen Reaktionsbedingungen einer noch unbekanntem Limitierung unterliegt.

Bei genügend hohem Leistungseintrag von $5,5 \text{ W L}^{-1}$ konnte die volumetrische Acetatbildungsrate bei der autotrophen Kultivierung in optimiertem Medium somit um den Faktor 35 im Vergleich zur Kultivierung bei einem Leistungseintrag von $0,2 \text{ W L}^{-1}$ und einem Wasserstoffpartialdruck von 400 mbar gesteigert werden (siehe Abbildung 9.1). So konnte eine Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} innerhalb von rund drei Tagen erreicht werden.

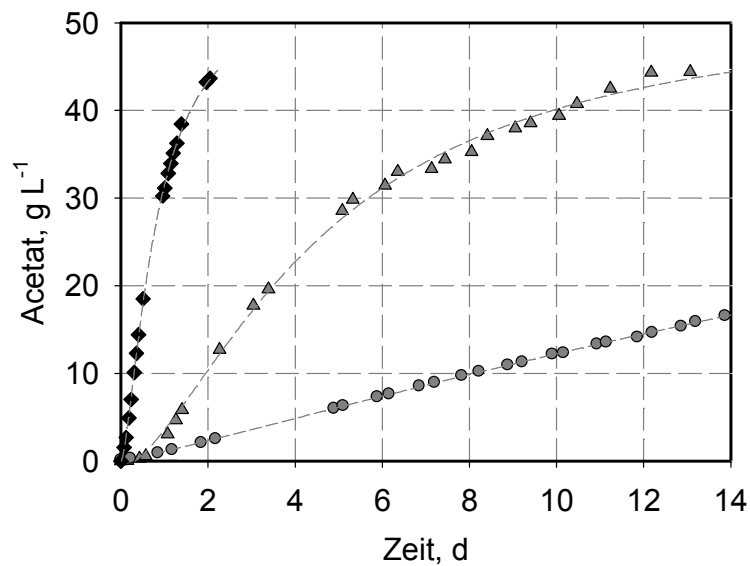


Abbildung 9.1: Vergleich der Acetatbildung bei autotrophen Kultivierungen von *A. woodii* unter pH-geregelten Bedingungen im Laborrührkesselreaktor ($V_0 = 1,0 \text{ L}$, $T = 30 \text{ °C}$, $\text{pH} = 7,0$).

Bedingungen: (●) $P/V = 0,2 \text{ W L}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ (▲) $P/V = 0,2 \text{ W L}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 1700 \text{ mbar}$ und (◆) $P/V = 5,5 \text{ W L}^{-1}$, $\text{pH}_2^{\text{Eingang}} = 400 \text{ mbar}$ in optimiertem Medium.

Des Weiteren wurde der Verbrauch von Ammonium im Medium festgestellt, der unabhängig vom Wachstum von *A. woodii* war. In Abhängigkeit der Ammoniumkonzentration wurde die Bildung der Aminosäure D-Alanin beobachtet. Die Produktion von D-Alanin im autotrophen Stoffwechsel erfolgt ausgehend von Pyruvat und dient möglicherweise der Regenerierung des Kofaktors NADH/H^+ .

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die maximal erreichbare Acetatkonzentration von 50 g L^{-1} unabhängig von den Versuchsbedingungen war. Bei Acetatkonzentrationen $> 30 \text{ g L}^{-1}$ kam das Wachstum der Bakterienzellen komplett zum Erliegen und es trat eine Akkumulation des Zwischenprodukts Formiat des Acetyl-CoA-Wegs auf. Diese Beobachtung deutet auf eine Blockade im unteren Teil des Acetyl-CoA-Wegs hin, was zu einem Rückstau von Kohlenstoff bis hin zu Formiat führt. Diese Blockade könnte bedingt sein durch die Inhibierung eines der Enzyme Phosphotransacetylase und/oder Acetatkinase der terminalen Reaktionen des Acetyl-CoA-Wegs ausgehend von Acetyl-CoA durch das gebildete Acetat.

Des Weiteren wurde beim Wachstum auf Fructose in Anwesenheit von Acetatkonzentrationen von 50 g L^{-1} im Medium die organische Säure Lactat statt Acetat gebildet. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis für die Blockade des Acetyl-CoA-Wegs bei hohen Acetatkonzentrationen im Medium. So können die während der Glykolyse anfallenden Reduktionsäquivalente nicht mehr durch Bildung von Acetat über den Acetyl-CoA-Weg entsorgt werden. Durch die Bildung von Lactat ausgehend von Pyruvat können während der Glykolyse

gebildete Reduktionsäquivalente unter Regenerierung von NADH/H⁺ entsorgt werden, was gleichzeitig Wachstum von *A. woodii* bei hohen Acetatkonzentrationen ermöglicht.

Auf Grund der vermuteten Inhibierung von Enzymen der terminalen Reaktionsschritte des Acetyl-CoA-Wegs wurde ein rekombinanter *A. woodii* Stamm, der eine erhöhte zellinterne Konzentration der Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase besaß, unter autotrophen Bedingungen reaktionstechnisch untersucht. Mit diesem rekombinanten Bakterienstamm konnte die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate auf 21,7 g g⁻¹ d⁻¹ im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ($q_{P,max} = 21,0 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) leicht erhöht werden. Es wurde jedoch eine zum Wildtyp-Stamm vergleichbare Acetatkonzentration im Bereich von 50 g L⁻¹ erreicht und es trat ebenso eine Akkumulation von Formiat auf. Somit konnte die vermutete Blockade des Acetyl-CoA-Wegs durch gemeinsame Erhöhung der Konzentration der Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase im rekombinanten *A. woodii* Stamm nicht umgangen werden.

10 Ausblick

Die Produktion von Chemikalien und Kraftstoffen über Synthesegas-Fermentationen besitzt großes Potential, traditionelle chemische Routen zur Herstellung dieser Stoffe langfristig zu ersetzen. Bei mikrobiellen Synthesegas-Fermentationen handelt es sich jedoch um eine relativ neue Technologie, in der bestehende Engpässe noch erforscht und beseitigt werden müssen.

Im Laufe der reaktionstechnischen Untersuchungen zur biotechnologischen Produktion von Acetat aus H_2 und CO_2 konnten zwar Limitierungen des Gas-Flüssig-Stofftransports und des Mediums identifiziert und beseitigt werden, die maximale erreichbare Acetatkonzentration im Bereich von 50 g L^{-1} konnte jedoch nicht überschritten werden. Um höhere Produktkonzentrationen zu erreichen, müssten zunächst mögliche Produktinhibierungen von Enzymen des Biosynthesewegs identifiziert werden, um diese nachfolgend mit Hilfe gentechnischer Methoden beseitigen zu können.

Darüber hinaus wurde das Redoxpotential des Mediums in dieser Arbeit nicht kontrolliert. Durch Verbrauch von Schwefelquellen kann sich dieses verändern. Eine Überwachung und gegebenenfalls eine Regelung des Redoxpotentials während des Produktionsprozesses könnte daher sinnvoll sein, um höhere Ausbeuten erreichen zu können.

Die parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab haben sich als sehr effizient erwiesen. Um auch höhere Acetatkonzentrationen in diesem Maßstab erreichen zu können, wäre der Betrieb des Parallelreaktorsystems unter pH-geregelten Bedingungen analog zum Laborrührkesselreaktor von großem Nutzen.

Für hohe volumetrische Produktivitäten wäre eine Erhöhung der Zelldichte im Rührkesselreaktor, beispielsweise durch Zellrückhaltung sinnvoll. Dadurch könnte ein kontinuierlicher Betrieb realisiert werden und damit die Reaktionsbedingungen noch besser kontrolliert werden.

Bei hohen Zelldichten im Rührkesselreaktor ist eine ausreichende Versorgung der Bakterienzellen mit den gasförmigen Substraten H_2 und CO_2 von entscheidender Bedeutung, was durch höhere Drücke im Reaktor ermöglicht werden könnte.

11 Literaturverzeichnis

Abrini J., Naveau H., Nyns E.J. (1994) *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide, Arch. Microbiol. **161**, 345-351.

Adams M.W.W., Mortenson L.E., Chen J.-S. (1981) Hydrogenase, Biochim. Biophys. Acta **594** (2-3), 105-176.

Adams M.R., Moss M.O. (2008) Fermented and microbial foods, in: Food Microbiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, S. 310-369.

Agar J.N., Dean D.R., Johnson M.K. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis, in: Ljungdahl L.G., Adams M.W., Barton L.L., Ferry J.G., Johnson M.K. (Hrsg.) Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria., Springer Verlag, New York, S. 46-66.

Ahmed A., Cateni B.G., Huhnke R.L., Lewis R.S. (2006) Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7, Biomass Bioenerg. **30**, 665-672.

Ahmed A., Lewis R.S. (2007) Fermentation of biomass-generated synthesis gas: effects of nitric oxide, Biotechnol. Bioeng. **97**, 1080-1086.

Aizawa K., Miyachi S. (1986) Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria, FEMS Microbiol. Rev. **39** (3), 215-233.

Andreesen J.R., Schaupp A., Neurauter C., Brown A., Ljungdahl L.G. (1973) Fermentation of glucose, fructose and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effects of metals on growth yield, enzymes and the synthesis of acetate from CO₂, J. Bacteriol. **114** (2), 743-751.

Andreesen J.R., Ghazzawi E.E., Gottschalk G. (1974) The effect of ferrous ions, tungstate and selenite on the level of formate dehydrogenase in *Clostridium formicoaceticum* and formate synthesis from CO₂ during pyruvate fermentation, Arch. Microbiol. **96**, 103-118.

Andreesen J.R. (1994) Glycine metabolism in anaerobes, Anton. Leeuw. **66**, 223-237.

Arendsen A.F., Soliman M.Q., Ragsdale S.W. (1999) Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*, J. Bacteriol. **181** (5), 1489-1495.

Arpe H.-J. (2010) Industrial organic chemistry, Wiley VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.

Bache R., Pfennig N. (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields, Arch. Microbiol. **130**, 255-261.

- Balch W.E., Schoberth S., Tanner R.S.** (1977) *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 355-361.
- Bannam T.L., Rood J.I.** (1993) *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants, *Plasmid* **229**, 233-235.
- Baronofsky J.J., Schreurs W.J.A., Kashket E.R.** (1984) Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*, *Appl. Environ. Microbiol.* **48 (6)**, 1134-1139.
- Berg I.A., Kockelkorn D., Ramos-Vera W.H., Say R.F., Zarzycki J., Hügler M., Alber B.E., Fuchs G.** (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea, *Nat. Microbiol. Rev.* **8**, 447-460.
- Berraud C.** (2000) Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture, *Biotechnol. Lett.* **22**, 451-454.
- Biegel E., Müller V.** (2010) Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107 (42)**, 18138-18142.
- Biegel E., Müller V.** (2011a) A Na⁺-translocating pyrophosphatase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*, *J. Biol. Chem.* **286 (8)**, 6080-6084.
- Biegel E., Schmidt S., González J.M., Müller V.** (2011b) Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes, *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 613-634.
- Bloom F.R., Kretschmer P.J.** (1983) Effects of genetic engineering of microorganisms on the future production of amino acids from a variety of carbon sources, in: Wise D.L. (Hrsg.) *Organic chemicals from biomass*, Benjamin Cummings Publishing Co. Inc., San Francisco, USA, S. 145-171.
- Boenigk R., Dürre P., Gottschalk G.** (1989) Carrier-mediated acetate transport in *Acetobacterium woodii*, *Arch. Microbiol.* **152**, 589-593.
- Braun M., Mayer F., Gottschalk G.** (1981) *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide, *Arch. Microbiol.* **128 (3)**, 288-293.
- Braun M., Gottschalk G.** (1981) Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemoorganotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*, *Arch. Microbiol.* **128 (3)**, 294-298.
- Braus-Stromeyer S.A., Schnappauf G., Braus G.H., Gößner A.S., Drake H.L.** (1997) Carbonic anhydrase in *Acetobacterium woodii* and other acetogenic bacteria, *J. Bacteriol.* **179 (22)**, 7197-7200.

- Bredwell M.D., Srivastava P., Worden R.M.** (1999) Reactor design issues for synthesis-gas fermentation, *Biotechnol. Prog.* **15**, 834-844.
- Breznak J.A., Blum J.S.** (1991) Mixotrophy in the termite gut acetogen, *Sporomusa termitida*, *Arch. Microbiol.* **156**, 105-110.
- 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^T, *PLoS One* **5**, 1-12.
- Busche R.M.** (1991) Extractive fermentative of acetic acid - economic tradeoff between yield of *Clostridium* and concentration of *Acetobacter*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28/29**, 605-621.
- Buschhorn H., Dürre P., Gottschalk G.** (1989) Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*, *Appl. Environ. Microbiol.* **55 (7)**, 1835-1840.
- Cai X., Bennett G.N.** (2011) Improving the *Clostridium acetobutylicum* butanol fermentation by engineering the strain for co-production of riboflavin, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1013-1025.
- Chang I.-S., Kim B.-H., Kim D.-H., Lovitt R.W., Sung H.-C.** (1999) Formulation of a defined media for carbon monoxide fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612 and the growth characteristics of the bacterium, *J. Biosci. Bioeng.* **88 (6)**, 682-685.
- Cheung H., Tanke R.S., Torrence P.G.** (2005) Acetic acid, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, S. 1-30.
- Chisti Y.** (2010) Mass transfer, in: Flickinger M.C. (Hrsg.) Encyclopedia of Industrial Biotechnology - Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology, S. 3241-3276.
- Chmiel H.** (2006) Bioprozesstechnik, 8. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Chukwu U.N., Cheryan M.** (1999) Electrodialysis of acetate fermentation broths, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**, 485-499.
- Conner D.E., Kottrola J.S.** (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* **61 (1)**, 382-385.
- Cussler E.L.** (2007) Diffusion - Mass transfer in fluid systems, 3rd edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Cypionka H.** (2010) Grundlagen der Mikrobiologie, Springer Verlag, Heidelberg.
- Dangel W., Schulz H., Diekert G., König H., Fuchs G.** (1987) Occurrence of corrinoid-containing membrane proteins in anaerobic bacteria, *Arch. Microbiol.* **148**, 52-56.

- Daniel S.L., Hsu T., Dean S.I., Drake H.L.** (1990) Characterization of the H₂- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*, J. Bacteriol. **172** (8), 4464-4471.
- 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**, 167-176.
- Diekert G., Ritter M.** (1982) Nickel requirement of *Acetobacterium woodii*, J. Bacteriol. **151** (2), 1043-1045.
- Diekert G., Wohlfarth G.** (1994) Energetics of acetogenesis from C₁ units, in: Drake H.L. (Hrsg.) Acetogenesis, Chapman and Hall Inc., New York, S. 157-179.
- van Dijk C., Veeger C.** (1981) The effects of pH and redox potential on the hydrogen production activity of the hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*, Eur. J. Biochem. **114**, 209-219.
- Doran P.M.** (2006) Mass Transfer, in: Bioprocess Engineering Principles, Elsevier Ltd., Oxford.
- Drake H.L.** (1994) Acetogenesis, acetogenic bacteria and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives, in: Drake H.L. (Hrsg.) Acetogenesis, Chapman and Hall Inc., New York, S. 3-60.
- Drake H.L., Küsel K., Matthies C.** (2002) Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens, Anton. Leeuw. **81**, 203-213.
- Drake H.L., Küsel K., Matthies C.** (2006) Acetogenic prokaryotes, in: Dworkin M., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (Hrsg.) The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 2 (Ecophysiology and Biochemistry), Springer Verlag, New York, S. 354-420.
- Drake H.L., Gößner A.S., Daniel S.L.** (2008) Old Acetogens, New Light, Ann. N.Y. Acad. Sci. **1125**, 100-128.
- Drennan C.L., Doukov T.I., Ragsdale S.W.** (2004) The metalloclusters of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase: a story in pictures, J. Biol. Inorg. Chem. **9**, 511-515.
- Eden G., Fuchs G.** (1982) Total synthesis of acetyl coenzyme A involved in autotrophic CO₂ fixation in *Acetobacterium woodii*, Arch. Microbiol. **133**, 66-74.
- Eden G., Fuchs G.** (1983) Autotrophic CO₂ fixation in *Acetobacterium woodii* - II. demonstration of enzymes involved, Arch. Microbiol. **135**, 68-73.
- Emde R., Schink B.** (1987) Fermentation of triacetin and glycerol by *Acetobacterium* sp.: no energy is conserved by acetate excretion, Arch. Microbiol. **149**, 142-148.

- Fontaine F.E., Peterson W.H., McCoy E., Johnson M.J., Ritter G.J.** (1942) A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp., J. Bacteriol. **43**, 701-715.
- Francois J.A., Starks C.M., Sivanuntakorn S., Jiang H., Ransome A.E., Nam J.-W., Constantine C.Z., Kappock T.J.** (2006) Structure of NADH-sensitive hexameric citrate synthase that resists acid inactivation, Biochemistry **45**, 13487-13499.
- Fröstl J.M., Seifritz C., Drake H.L.** (1996) Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*, J. Bacteriol. **178** (15), 4597-4603.
- Fuchs R., Ryu D.D.Y.** (1971) Effect of surface aeration on scale-up procedures for fermentation processes, Ind. Eng. Chem. Proc. D. D. **10** (2), 190-196.
- Fuchs G., Stupperich E.** (1978) Evidence for an incomplete reductive carboxylic acid cycle in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Arch. Microbiol. **118**, 121-125.
- Fuchs G., Schlegel H.-G.** (2007) Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fuchs G.** (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life?, Ann. Rev. Microbiol. **65**, 631-658.
- Furdui C., Ragsdale S.W.** (2000) The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl pathway, J. Biol. Chem. **275** (37), 28494-28499.
- Gaddis E.S.** (1999) Mass transfer in gas-liquid contactors, Chem. Eng. Proc. **38**, 503-510.
- Gaddy J.L., Arora D.K., Ko C.W., Phillips J.R., Basu R., Wilkstrom C.V., Clausen E.C.** (2007) Methods for increasing the production of ethanol from microbial fermentation, Patent, US 7285402 B2.
- Gebhardt G.** (2010) Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur Bernsteinsäureherstellung, Dissertation, Technische Universität München.
- Genthner B.R.S., Davis C.L., Bryant M.P.** (1981) Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species, Appl. Environ. Microbiol. **42** (1), 12-19.
- Genthner B.R.S., Bryant M.P.** (1987) Additional characteristics of one-carbon compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*, Appl. Environ. Microbiol. **53** (3), 471-476.
- Gottschalk G.** (1986) Bacterial metabolism, 2nd edition, Springer Verlag, New York.
- Gottschalk G., Thauer R.K.** (2001) The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea, Biochim. Biophys. Acta **1505**, 28-36.

- Hass V.C., Pörtner R.** (2009) Charakteristika von Rührkesselbioreaktoren, in: Praxis der Bioprosesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 11-28.
- Haynes A.** (2006) Acetic acid synthesis by catalytic carbonylation of methanol, Top. Organomet. Chem. **18**, 179-205.
- Heijthuisen J.H.F.G., Hansen T.A.** (1989) Selection of sulphur sources for the growth of *Butyribacterium methylotrophicum* and *Acetobacterium woodii*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**, 186-192.
- Heise R., Müller V., Gottschalk G.** (1989) Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*, J. Bacteriol. **171**, 5473-5478.
- Heise R., Müller V., Gottschalk G.** (1992) Presence of a Na⁺-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*, Eur. J. Biochem. **206**, 553-557.
- 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**, 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.
- Heo J., Staples C.R., Ludden P.W.** (2001) Redox-dependent CO₂-reduction activity of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*, Biochemistry **40**, 7604-7611.
- Holland R., Pritchard G.G.** (1975) Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-bisphosphate and metal ions, J. Bacteriol. **121 (3)**, 777-784.
- Hortsch R.** (2011) Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen, Dissertation, Technische Universität München.
- 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.
- Huang Y., Yang S.-T.** (1998) Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor, Biotechnol. Bioeng. **60 (4)**, 498-507.
- Huhnke R., Lewis R.S., Tanner R.S.** (2008) Isolation and characterization of novel clostridial species, Patent, WO2008/028055.
- Hungate R.E., Macy J.** (1973) The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes, Bull. Ecol. Res. Comm. **17**, 123-126.

- Hügler M., Sievert S.M.** (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean, *Ann. Rev. Mar. Sci.* **3**, 261-289.
- Imkamp F., Müller V.** (2007) Acetogenic bacteria, in: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, New Jersey, S. 1-8.
- Ingram-Smith C., Gorrell A., Lawrence S.H., Iyer P., Smith K., Ferry J.G.** (2005) Characterization of the acetate binding pocket in the *Methanosarcina thermophila* acetate kinase, *J. Bacteriol.* **187** (7), 2386-2394.
- Ingram-Smith C., Martin S.R., Smith K.** (2006) Acetate kinase: not just a bacterial enzyme, *Trends Microbiol.* **14** (6), 249-253.
- Kadic E.** (2010) Survey of gas-liquid mass transfer in bioreactors, M.Sc. Thesis, Iowa State University, USA.
- Kandler O., Schoberth S.** (1979) Murein structure of *Acetobacterium woodii*, *Arch. Microbiol.* **120**, 181-183.
- Karnholz A., Küsel K., Gößner A., Schramm A., Drake H.L.** (2002) Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2), 1005-1009.
- Katikaneni S.P.R., Cheryan M.** (2002) Purification of fermentation-derived acetic acid by liquid-liquid extraction and esterification, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**, 2745-5752.
- Kawase Y., Moo-Young M.** (1990) The effect of antifoam agents on mass transfer in bioreactors, *Bioproc. Eng.* **5**, 169-173.
- Kengen S.W.M., Stams A.J.M.** (1994) Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, *Arch. Microbiol.* **161**, 168-175.
- Kim B.H., Bellows P., Datta R., Zeikus J.G.** (1984) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields, *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (4), 764-770.
- Klasson K.T., Ackerson M.D., Clausen E.C., Gaddy J.L.** (1993) Biological conversion of coal and coal-derived synthesis gas, *Fuel.* **72**, 1673-1678.
- Klemps R., Schoberth S.M., Sahm H.** (1987) Production of acetic acid by *Acetogenium kivui*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 229-234.
- Kodama T., Goto E., Minoda Y.** (1976) Determination of hydrogen concentration and $[k_{La}]_{H_2}$ in submerged culture vessels, *Agr. Biol. Chem.* **40** (12), 2373-2377.
- Koesnandar A., Nishio N., Nagai S.** (1990) Stimulation by cysteine on growth of *Clostridium thermoaceticum* in minimal medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 711-714.

- 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., Mihalcea C., Bromley J.C., Simpson S.D.** (2011a) Fermentative production of ethanol from carbon monoxide, Curr. Opin. Biotechnol. **22**, 320-325.
- Köpke M., Mihalcea C., Liew F.M., 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.
- Kundiyana 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.
- Kundiyana D.K., Huhnke R.L., Wilkins M.R.** (2011) Effect of nutrient limitation and two-stage continuous fermenter design on productivities during "*Clostridium ragsdalei*" syngas fermentation, Bioresour. Biotechnol. **102**, 6058-6064.
- Lawford H.G., Rousseau J.D.** (1994) The pH-dependent energetic uncoupling of *Zymomonas* by acetic acid, Appl. Biochem. Biotechnol. **45/46**, 437-448.
- Leigh J.A., Mayer F., Wolfe R.S.** (1981) *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium, Arch. Microbiol. **129**, 275-280.
- Lide D.R.** (2007) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th edition, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lindskog S., Henderson L.E., Kannan K.K., Liljas A., Strandberg P.O.B.** (1971) Carbonic anhydrase, in: Boyer P.D. (Hrsg.) The Enzymes, Vol. 5, Academic Press, New York, S. 587-665.
- Linek V., Vacek V., Benes P.** (1987) A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen-transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte-solutions and viscous liquids, Chem. Eng. J. **34 (1)**, 11-34.
- Linek V., Benes P., Vacek V.** (1989) Dynamic pressure method for k_{La} measurement in large-scale bioreactors, Biotechnol. Bioeng. **33 (11)**, 1406-1412.
- Liou J.S., Blakwill 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. Microbiol. **55**, 2085-2091.
- Liu S., Suflita J.M.** (1995) H₂ as an energy source for mixotrophic acetogenesis from the reduction of CO₂ and syringate by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*, Curr. Microbiol. **31**, 245-250.

- Löser C., Schröder A., Deponte S., Bley T.** (2005) Balancing the ethanol formation in continuous bioreactors with ethanol stripping, *Eng. Life Sci.* **5** (4), 325-332.
- Luli G.W., Strohl W.R.** (1990) Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations, *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (4), 1004-1011.
- Lundie L.L., Drake H.L.** (1984) Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*, *J. Bacteriol.* **159**, 700-703.
- Maier B., Dietrich C., Büchs J.** (2001) Correct application of the sulphite oxidation methodology of measuring the volumetric mass transfer coefficient $k_L a$ under non-pressurized and pressurized conditions, *Food Bioprod. Process.* **79** (2), 107-113.
- Maiorella B., Blanch H.W., Wilke C.R.** (1983) By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* **25** (1), 103-121.
- Martin W.F.** (2011) Hydrogen, metals, bifurcating electrons, and proton gradients: the early evolution of biological energy conservation, *FEBS Lett.*, doi:10.1016/j.febslet.2011.09.031.
- Matsushita K., Inoue T., Adachi O., Toyama H.** (2005) *Acetobacter acetii* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid, *J. Bacteriol.* **187** (13), 4346-4352.
- McInerney M.J., Gieg L.M.** (2004) An overview of anaerobic metabolism, in: Nakano M.M., Zuber P. (Hrsg.) *Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects*, CRC Press, Boca Raton, Florida., S. 27-66.
- Menon S., Ragsdale S.W.** (1996) Evidence that carbon monoxide is an obligately intermediate in anaerobic acetyl-CoA synthesis, *Biochemistry* **35**, 12119-12125.
- Menzel U., Gottschalk G.** (1985) The internal pH of *Acetobacterium wieringae*, and *Acetobacter acetii* during growth and production of acetic acid, *Arch. Microbiol.* **143**, 47-51.
- Michels P.A.M., Michels J.P.J., Boonstra J., Konings W.N.** (1979) Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products, *FEMS Microbiol. Lett.* **5**, 357-364.
- 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. Sustain. Energy Rev.*, doi:10.1016/j.rser.2011.07.124.
- Morinaga T., Kawada N.** (1990) The production of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by an anaerobic bacterium, *J. Biotechnol.* **14**, 187-194.
- Mönch T.T., Zeikus J.G.** (1983) Nutritional growth requirements for *Butyribacterium methylotrophicum* on single carbon substrates and glucose, *Curr. Microbiol.* **9**, 151-154.

- Munoz M.A., Codina J.C., de Vicente A., Sanchez J.M., Borrego J.J., Morinigo M.A.** (1996) Effects of nickel and lead and a support material on the methanogenesis from sewage sludge, *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 339-342.
- Müller V.** (2003) Energy conservation in acetogenic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **69 (11)**, 6345-6353.
- Müller V., Bowien S.** (1995) Differential effects of sodium ions on motility in the homoacetogenic bacteria *Acetobacterium woodii* and *Sporomusa sphaeroides*, *Arch. Microbiol.* **164**, 363-369.
- Müller V., Imkamp F., Rauwolf A., Küsel K., Drake H.L.** (2004) Molecular and cellular biology of acetogenic bacteria, in: Nakano M., Zuber P. (Hrsg.) *Strict and facultative anaerobes: Medical and Environmental Aspects*, Horizon Scientific Press, Norfolk, S. 251-281.
- Müller J.H., Johnson E.R.** (1941) Acid hydrolysates of casein to replace peptone in the preparation of bacteriological media, *J. Immunol.* **40**, 33-38.
- Nakano S., Fukaya M., Horinouchi S.** (2004) Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter acetii*, *FEMS Microbiol. Lett.* **235**, 315-322.
- Nevin K.P., Hensley S.A., Franks A.E., Summers Z.M., Ou J., Woodard T.L., Snoeyenbos-West O.L., Lovley D.R.** (2011) Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* **77 (9)**, 2882-2886.
- Partin L.R., Heise W.H.** (1992) Bioderived acetic acid, in: Agreda V.H., Zöllner J.R. (Hrsg.) *Acetic acid and its derivatives*, Marcel Dekker Inc., New York, S. 3-14.
- Peters V., Janssen P.H., Conrad R.** (1999) Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen, *Curr. Microbiol.* **38**, 285-289.
- Phillips J.R., Klasson K.T., Clausen E.C., Gaddy J.L.** (1993) Biological production of ethanol from coal synthesis gas - medium development studies, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**, 559-571.
- Phillips J.R., Remondet N.M., Atiyeh H.K., Wilkins M.R., Huhnke R.L.** (2011) Designing syngas fermentation medium for fuels and bulk chemicals production, ASABE Paper No. 1111052, St. Joseph, Mich.: ASABE.
- 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.

- Puskeiler R.** (2004) Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung, Dissertation, Technische Universität München.
- Puskeiler R., Kaufmann K., Weuster-Botz D.** (2005) Development, parallelization and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD), *Biotechnol. Bioeng.* **89** (5), 512-523.
- Ragsdale S.W., Kumar M.** (1996) Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, *Chem. Rev.* **96**, 2515-2539.
- Ragsdale S.W.** (2003) Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, *Chem. Rev.* **103**, 2333-2346.
- Ragsdale S.W., Pierce E.** (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation, *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1873-1898.
- Raspor P., Goranovic D.** (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria, *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**, 101-124.
- Ren N.-Q., Lin H.-L., Zhang K., Zheng G.-X., Duan Z.-J., Lin M.** (2007) Cloning, expression, and characterization of an acetate kinase from a high rate of biohydrogen bacterial strain *Ethanoligenens* sp. *hit B49*, *Curr. Microbiol.* **55**, 167-172.
- Rogers P., Chen J.-S., Zidwick M.J.** (2006) Organic acid and solvent production part I: acetic, lactic, gluconic, succinic and polyhydroxyalkanoic acids, in: Dworkin M., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (Hrsg.) *The Prokaryotes*, 3rd ed., Vol. 1 (Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology), Springer Verlag, New York, S. 511-755.
- 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.
- Sakai S., Nakashimada Y., Inokuma K., Kita M., Okada H., Nishio N.** (2005) Acetate and ethanol production from H₂ and CO₂ by *Moorella* sp. using a repeated batch culture, *J. Biosci. Bioeng.* **99** (3), 252-258.
- Savage M.D., Drake H.L.** (1986) Adaption of the acetogen *Clostridium thermoautotrophicum* to minimal medium, *J. Bacteriol.* **165** (1), 315-318.
- Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P.** (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets, *Trends Biotechnol.* **26** (2), 100-108.
- Saxena J., Tanner R.S.** (2011) Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 513-521.
- Schmidt S.** (2011) Die Entschlüsselung des Genoms von *Acetobacterium woodii*: neue Einblicke in die Lebensweise und Bioenergetik eines acetogenen Bakteriums, Dissertation, Goethe-Universität, Frankfurt.

Schmidt R.L., Cooney C.L. (1986) Production of acetic acid from hydrogen and carbon dioxide by *Clostridium* species ATCC 29797, Chem. Eng. Commun. **45**, 61-73.

Schmidt K.D., Klasson K.T., Ackerson M.D., Clausen E.C., Gaddy J.L. (1991) COS degradation by selected CO-utilizing bacteria, Appl. Biochem. Biotechnol. **28/29**, 787-796.

Schmidt S., Biegel E., Müller V. (2009) The ins and outs of Na⁺ bioenergetics in *Acetobacterium woodii*, Biochim. Biophys. Acta **1787**, 691-696.

Schoberth S. (1977) Acetic acid from H₂ and CO₂ - formation of acetate by cell extracts of *Acetobacterium woodii*, Arch. Microbiol. **114**, 143-148.

Riedel E. (2004) Anorganische Chemie, 6. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Schmitz R.A., Daniel R., Deppenmeier U., Gottschalk G. (2006) The anaerobic way of life, in: Dworkin M., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (Hrsg.) The Prokaryotes, 3rd ed., Vol. 2 (Ecophysiology and Biochemistry), Springer Verlag, New York, S. 86-101.

Schumpe A. (1993) The estimation of gas solubilities in salt solutions, Chem. Eng. Sci. **48 (1)**, 153-158.

Schure E.G., Silljé H.H.W., Verkleij A.J., Boonstra J., Verrips C.T. (1995) The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. **177 (22)**, 6672-6675.

Shah M.M., Cheryan M. (1995) Improvement of productivity in acetic acid fermentation with *Clostridium thermoaceticum*, Appl. Biochem. Biotechnol. **51/52**, 418-422.

Simpson S., Warner I., Fung J., Köpke M. (2010) Optimised fermentation media, Patent LanzaTech, WO2010/064932 A1.

Sipma J., Henstra A.M., Parshina S.N., Lens P.N.L., Lettinga G., Stams A.J.M. (2006) Microbial CO conversions with applications in synthesis gas purification and bio-desulfurization, Crit. Rev. Biotechnol. **26**, 41-65.

Slivka R.M., Chinn M.S., Grunden A.M. (2011) Gasification and synthesis gas fermentation: an alternative route to biofuel production, Biofuels **2 (4)**, 405-419.

Smith J.S., Hillier A.J., Lees G.J., Jago G.R. (1975) The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract, J. Dairy Res. **42**, 123-138.

Speers A.M., Cologgi D.L., Reguera G. (2009) Anaerobic cell culture, Curr. Protoc. Microbiol. Supplement **12 (A4)**, F.1-16.

Suresh S., Srivastava V.C., Mishra I.M. (2009) Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: a review, J. Chem. Technol. Biotechnol. **84 (8)**, 1091-1103.

- Suzuki T., Matsuo T., Ohtaguchi K., Koide K.** (1992) Quantitative analysis of flocculation of *Acetobacterium woodii* by chemical flocculants, J. Chem. Eng. Jpn. **25 (4)**, 439-441.
- Suzuki T., Matsuo T., Ohtaguchi K., Koide K.** (1993) Continuous production of acetic acid from CO₂ in repeated-batch cultures using flocculated cells of *Acetobacterium woodii*, J. Chem. Eng. Jpn. **26 (5)**, 459-462.
- Syldatk C.** (2006) Organische Säuren, in: Antranikian G.. (Hrsg.) Angewandte Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin, S. 341-353.
- Tang I-C., Okos M.R., Yang S.-T.** (1989) Effects of pH and acetic acid on homoacetic fermentation of lactate by *Clostridium formicoaceticum*, Biotechnol. Bioeng. **34**, 1063-1074.
- 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**, 232-236.
- Thauer R.K., Jungermann K., Decker K.** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, Bacteriol. Rev. **41 (1)**, 100-180.
- Tiemeyer A.K.** (2007) Reaktionstechnische Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*, Dissertation, Technische Universität München.
- Tirado-Acevedo O., Chinn M.S., Grunden A.M.** (2010) Production of biofuels from synthesis gas using microbial catalysts, Adv. Appl. Microbiol. **70**, 57-92.
- Tschech A., Pfennig N.** (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*, Arch. Microbiol. **137**, 163-167.
- Verser D.W., Eggeman T.J.** (2011) Process for producing ethanol from corn dry milling, Patent Zechem Inc., US 7888082 B2.
- Wang G., Wang D.I.C.** (1984) Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum*, Appl. Environ. Microbiol. **47 (2)**, 294-298.
- Weisenberger S., Schumpe A.** (1996) Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K, AIChE J. **42 (1)**, 298-300.
- Wendisch V.F., de Graaf A.A., Sahm H., Eikmanns B.J.** (2000) Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose, J. Bacteriol. **182 (11)**, 3088-3096.
- Wiegel J., Braun M., Gottschalk G.** (1981) *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide, Curr. Microbiol. **5**, 255-260.

- Wiegel J.** (1994) Acetate and the potential of homoacetogenic bacteria for industrial applications, in: Drake H.L. (Hrsg.) Acetogenesis, Chapman and Hall Inc., New York, S. 484-504.
- Wilhelm E., Battino R., Wilcock R.J.** (1977) Low-pressure solubility of gases in liquid water, Chem. Rev. **77**, 219-262.
- Wilke C.R., Chang P.** (1955) Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, AIChE J. **1** (2), 264-270.
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S.** (1963) Formation of methane by bacterial extracts, J. Biol. Chem. **238** (8), 2882-2886.
- Wong I., Moore K.J.M., Bjornson K.P., Hsieh J., Lohman T.M.** (1996) ATPase activity of *Escherichia coli* rep helicase is dramatically dependent on DNA ligation and protein oligomeric states, Biochemistry **35**, 5723-2734.
- Worden R.M., Bredwell M.D., Grethlein A.J.** (1997) Engineering issues in synthesis-gas fermentations, in: Saha B.C, Woodward J. (Hrsg.) Fuels and Chemicals from Biomass Volume 666, American Chemical Society, Washington, 320-335.
- Xu D., Tree D.R., Lewis R.S.** (2011) The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels, Biomass Bioenerg. **35**, 2690-2696.
- Yamamoto I., Saiki T., Liu S.M., Ljungdahl L.G.** (1983) Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoautotrophicum*, a tungsten-selenium-iron protein, J. Biol. Chem. **258**, 1826-1832.
- Yerushalmi L., Volesky B.** (1985) Importance of agitation in acetone-butanol fermentation, Biotechnol. Bioeng. **27** (9), 1297-1305.
- Yoneda N., Kusano S., Yasui M., Pujado P., Wilcher S.** (2001) Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid, Appl. Catal. A-Gen. **221**, 253-265.
- 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**, 381-386.
- Zhou G., Kresta S.M.** (1996) Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers, AIChE J. **42** (9), 2476-2490.
- Zlokarnik M.** (1973) Rührleistung in begasten Flüssigkeiten, Chem.-Ing.-Tech. **48** (9/10), 689-692.
- Zlokarnik M.** (1999) Rührtechnik - Theorie und Praxis, Springer Verlag, Berlin.

12 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung	Einheit
pta-ack	Acetatkinase und Phosphotransacetylase	
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>	
ATP	Adenosintriphosphat	
BTM	Biotrockenmasse	g L ⁻¹
CoA	Coenzym A	
CTR	Kohlendioxid-Eintragsrate (<i>carbon dioxide transfer rate</i>)	mmol L ⁻¹ h ⁻¹
CUR	Kohlendioxid-Aufnahmerate (<i>carbon dioxide uptake rate</i>)	mmol L ⁻¹ h ⁻¹
D	binärer Diffusionskoeffizient	m ² s ⁻¹
HTR	Wasserstoff-Eintragsrate (<i>hydrogen transfer rate</i>)	mmol L ⁻¹ h ⁻¹
HUR	Wasserstoff-Aufnahmerate (<i>hydrogen uptake rate</i>)	mmol L ⁻¹ h ⁻¹
K _H	Henry-Konstante	mmol L ⁻¹ bar ⁻¹
k _L a	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient	s ⁻¹
μ _{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	h ⁻¹
n	Rührerdrehzahl	min ⁻¹
p _{tot}	Absolutdruck im Reaktor	bar
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck	mbar
pCO ₂ ^{Ausgang}	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck am Gasausgang des Reaktors	mbar
pCO ₂ ^{Eingang}	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck am Gaseingang des Reaktors	mbar
pH ₂	Wasserstoff-Partialdruck	mbar
pH ₂ ^{Ausgang}	Wasserstoff-Partialdruck am Gasausgang des Reaktors	mbar
pH ₂ ^{Eingang}	Wasserstoff-Partialdruck am Gaseingang des Reaktors	mbar
q _P	zellspezifische Produktbildungsrate	g g ⁻¹ d ⁻¹
Q _P	volumetrische Produktbildungsrate	g L ⁻¹ d ⁻¹

t	Zeit	h
T	Temperatur	°C
t _E	Ansprechzeit	s
THF	Tetrahydrofolat	
V	Reaktorvolumen	L
\dot{V}_g	Gasvolumenstrom	L h ⁻¹
Y	Ausbeute	g g ⁻¹

13 Anhang

13.1 Sättigungskonzentrationen für H₂ und CO₂

Die in dieser Arbeit eingesetzten Partialdrücke an H₂ und CO₂ wurde laut dem Henry-Gesetz (Gleichung 3.27) in die entsprechenden Sättigungskonzentrationen für das Lösungsmittel Wasser an der Gas-Flüssig-Grenzschicht umgerechnet. Dazu wurden für H₂ und CO₂ die Henrykonstanten $0,7494 \cdot 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ und $0,2939 \cdot 10^{-1} \text{ mmol L}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ bei 30 °C verwendet.

Tabelle 13.1: Sättigungskonzentrationen an H₂ und CO₂ beim jeweiligen Partialdruck am Gaseingang des Reaktors.

H ₂		CO ₂	
Partialdruck (pH ₂ ^{Eingang}), mbar	c* _{H₂} , mmol L ⁻¹	Partialdruck (pCO ₂ ^{Eingang}), mbar	c* _{CO₂} , mmol L ⁻¹ (pH = 7,0)
400	0,60	100	2,94
800	0,60	200	5,88
1200	0,90	360	10,58
1440	1,08		
1700	1,27		

13.2 Medien, Medienzusätze und Puffer

An dieser Stelle zusammengefasst sind die Zusammensetzungen der eingesetzten Medien sowie der dazugehörigen Zusätze und des PBS-Puffers.

Für die Kultivierung des strikt anaeroben Organismus *Acetobacterium woodii* müssen alle Medien, Medienzusätze und Kohlenstoffquellen anaerobisiert, das heißt sauerstofffrei sein. Um den Sauerstoff zu entfernen, wurden alle Lösungen für mindestens 20 Minuten aufgekocht und anschließend unter Stickstoffbegasung auf Eis abgekühlt. Dann wurden die Lösungen gasdicht verschlossen und nur unter sauerstofffreier Atmosphäre in der Anaerobwerkbank geöffnet.

Medien

Im Folgenden aufgeführt ist die Zusammensetzung des von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) für die Kultivierung von *Acetobacterium woodii* empfohlene Medium DSMZ 135 (Tabelle 13.2) sowie die Zusätze zu diesem Medium.

Das Medium wurde nach der Technik von Hungate und Macy (1973) hergestellt. Es wurden alle Medienbestandteile bis auf Natriumhydrogencarbonat, L-Cystein Hydrochlorid und Natriumsulfid in VE-Wasser gelöst und anaerobisiert. Anschließend wurden die fehlenden Bestandteile unter sauerstofffreien Bedingungen im Anaerobzelt zugegeben und das Medium mit anaerobem VE-Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Das fertige Medium wurde aliquotiert zu 5 mL in Hungate-Kulturröhrchen und zu je 50 mL, 200 mL und 500 mL in Septumflaschen. Diese wurden anschließend für 20 min bei 121 °C verschlossen autoklaviert.

Tabelle 13.2: Zusammensetzung des Mediums DSMZ 135 für die Kultivierung von *Acetobacterium woodii*.

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

Spurenelementlösung

Die Spurenelementlösung für das Medium DSMZ 135 setzt sich wie in Tabelle 13.3 beschrieben zusammen. Für die Herstellung wird zuerst die Nitrilotriessigsäure gelöst und der pH mit KOH (4 M) auf einen Wert von 6,5 eingestellt. Dann werden die übrigen Bestandteile gelöst und der pH anschließend mit KOH auf 7,0 eingestellt. Die Spurenelementlösung wird auf 50 mL Zentrifugentröhrchen aliquotiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 13.3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Medium DSMZ 135.

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

Vitaminlösung

Die Zusammensetzung der Vitaminlösung für das Medium DSMZ 135 basiert auf Wolin *et al.* (1963) und ist in Tabelle 13.4 aufgeführt. Es werden alle Bestandteile in VE-Wasser gelöst, auf 50 mL aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 13.4: Zusammensetzung der Vitaminlösung für das Medium DSMZ 135 (nach Wolin *et al.*, 1963).

Komponente	Konzentration	Einheit
D(+)-Biotin	2,0	g L ⁻¹
Folsäure	2,0	g L ⁻¹
Pyridoxin-HCl	10,0	g L ⁻¹
Thiamin-HCl	5,0	g L ⁻¹
Riboflavin	5,0	g L ⁻¹
Nikotinsäure	5,0	g L ⁻¹
Calcium-D-Pantothenat	5,0	g L ⁻¹
Cyanocobalamin	0,1	g L ⁻¹
p-Aminobenzoensäure	5,0	mg L ⁻¹
Liponsäure	5,0	mg L ⁻¹

Kohlenstoffquellen

Als Kohlenstoffquelle für *A. woodii* wurden standardmäßig 10 g L⁻¹ Fructose eingesetzt. Dazu wurde eine Stammlösung von 250 g L⁻¹ unter anaeroben Bedingungen hergestellt. Sollten andere Kohlenstoffquellen zum Einsatz kommen, so ist dies an entsprechender Stelle im Text erwähnt. Alle Kohlenstoffquellen und sonstige Zusätze sind anaerobisiert und steril.

Antibiotika

Thiamphenicol diente als Selektionsmarker für das Plasmid pJIR750. Die Konzentration der Stammlösung in N,N-Dimethylformamid (DMF) betrug 20 mg mL⁻¹, die Arbeitskonzentration 20 mg L⁻¹. Das Antibiotikum wurde sterilfiltriert und lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

PBS-Puffer

Für die Verdünnung der Zellsuspensionsproben zur Messung der Optischen Dichte wurde eine Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, "phosphate buffered saline solution") verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 13.5 aufgeführt ist. PBS ist eine isotonische Pufferlösung mit einem pH von etwa 7,4, die zur Aufrechterhaltung der Osmolarität der Zellen beim Verdünnen dient.

Tabelle 13.5: Zusammensetzung von PBS-Puffer (pH 7,4).

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

Puffer und Lösungen für die Aminosäureanalytik (HPLC)

Lösung für Ziel-Probengefäße

Für die Derivatisierung der Proben zur Analyse der Aminosäuren per HPLC werden in den Ziel-Probengefäße je 650 µL Bicin-Puffer (40 mM, pH 10,2, mit NaOH eingestellt) und 8 µL 3-Mercaptopropanol(MCP)/Bicin-Lösung (2,5 µL MCP in 1 mL Bicin-Puffer) vorgelegt.

o-Phthaldialdehyd(OPA)-Lösung

Für die Derivatisierung der Aminosäuren wird OPA-Lösung in einer 10 mL-Rollrandflasche vorgelegt. Dazu werden 100 mg ortho-Phthaldialdehyd und 65 µL 3-Mercaptopropanol in 5 mL Methanol und 5 mL Bicin-Puffer gelöst.

Iodessigsäure-Lösung

Für die Derivatisierung der Aminosäuren wird Iodessigsäure-Lösung in einer 10 mL-Rollrandflasche vorgelegt. Dazu wird 65 mg Iodessigsäure in 10 mL Bicin-Puffer gelöst.

13.3 HPLC-Methodik

Über die HPLC (Tabelle 13.6) wurden zum einem organische Säuren und Zucker über eine HPX-87H-Säule (Bio-Rad) und einen RI-Detektor und zum anderen Aminosäuren über eine Gemini C18-Säule (Phenomenex) und einen Fluoreszenz-Detektor im Kulturüberstand gemessen.

Tabelle 13.6: HPLC-System.

Komponente	Typ / Version	Hersteller
Manager	Smartline 5000	Knauer
Autosampler	Midas	Spark
Säulenofen	Jet Stream 5 - 85 °C	Knauer
Pumpe	Smartline 1000	Knauer
Software	Chromgate Version 3.1	Knauer
RI-Detektor	Smartline 2300	Knauer
UV/Vis-Detektor	LC-295	Perkin Elmer
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge (125-0129)	Bio-Rad
Trennsäule	Aminex HPX-87H, 300x7,8 mm (125-0140)	Bio-Rad
Fluoreszenz-Detektor	RF-20A	Shimadzu
Vorsäule	SecurityGuard Cartridges Gemini C18 4x3 mm	Phenomenex
Trennsäule	Gemini 5u C18 110Å 150x4,6 mm	Phenomenex

Bestimmung von organischen Säuren und Zuckern

Zur Bestimmung des Fructose-Verbrauchs und der Produktion von Acetat und Formiat wurden Proben des Kulturüberstandes nach den in Tabelle 13.7 angegebenen Bedingungen über eine HPX-87H-Säule und einen RI-Detektor gemessen. Die Ermittlung der Konzentrationen der Substanzen erfolgte durch Vergleich mit den Standards, die in den Tabellen 10.8 und 10.9 angegeben sind. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in den Standards wurde den jeweils maximal zu erwartenden Konzentrationen in den Fermentationsproben angepasst.

Tabelle 13.7: HPLC-Methode zur Bestimmung von organischen Säuren und Zuckern über eine HPX-87H-Säule und einen RI-Detektor.

Parameter	Wert
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säule	50 °C
Laufmittel	5 mM H ₂ SO ₄
Flussrate	0,7 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	20 µL
Messdauer	30 min

Tabelle 13.8: HPLC-Standard zur Bestimmung von organischen Säuren und Zuckern für Kultivierungen im Litermaßstab.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
D(-)-Fructose	50,0
Natriumacetat Trihydrat	50,0
Natriumformiat	5,0

Tabelle 13.9: HPLC-Standard zur Bestimmung von organischen Säuren und Zuckern für Kultivierungen in Septumflaschen und im System aus parallelen Rührkesselreaktoren.

Komponente	Konzentration, g L ⁻¹
D(-)-Fructose	10,0
Natriumacetat Trihydrat	10,0
Natriumformiat	5,0

Bestimmung von Aminosäuren

In ausgewählten Proben aus Kultivierungen im Litermaßstab wurde zudem die Konzentration einiger Aminosäuren über eine Gemini C18-Säule und einen Fluoreszenzdetektor im Kulturüberstand über Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) gemessen. Die Messungen erfolgten unter den in Tabelle 13.10 angegebenen Bedingungen. Vor Injektion der Probe auf die Säule wurde diese mit Hilfe des Midas Autosamplers vollautomatisch derivatisiert mit o-Phthaldialdehyd nach der Methode in Tabelle 13.11. Die anschließende Trennung der

Aminosäuren über die Gemini C18-Säule erfolgte über einen Laufmittel-Gradienten, dessen Profil in Tabelle 13.12 dargestellt ist. Die Ermittlung der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch Vergleich mit Standards, die in Tabelle 13.13 angegeben sind. Auf Grund von Überlappungen der Peaks wurden die Substanzen gruppiert in drei Standards, dargestellt durch die horizontalen Teilungen der Tabelle.

Tabelle 13.10: HPLC-Methode zur Bestimmung von Aminosäuren über eine Gemini C18-Säule und einen Fluoreszenz-Detektor.

Parameter	Wert
Temperatur Autosampler	4 °C
Säulentemperatur	40 °C
Laufmittel A	40 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,75)
Laufmittel B	45 % (v/v) Acetonitril 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) VE-Wasser
Flussrate	1,0 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	10 µL Probe 20 µL nach Derivatisierung
Wellenlänge Extinktion	340 nm
Wellenlänge Absorption	450 nm
Messdauer	43 min

Tabelle 13.11: Methode zur automatischen Derivatisierung von Proben zur Analyse der Aminosäuren mittels Midas Autosampler.

10 µL	Probe ins Ziel-Probengefäß
3x 150 µl	Probengemisch aufziehen und abgeben
30 Sekunden warten	
20 µL	Iodessigsäure-Lösung ins Ziel-Probengefäß
3x 150 µl	Probengemisch aufziehen und abgeben
30 Sekunden warten	
70 µL	OPA-Lösung ins Ziel-Probengefäß
3x 150 µl	Probengemisch aufziehen und abgeben
20 µL	Probe aus Ziel-Probengefäß auf Säule injizieren

Tabelle 13.12: Gradientenprofil zur Bestimmung von Aminosäuren.

Zeit, min	Laufmittel A, % (v/v)	Laufmittel B, % (v/v)
0,00	100	0
3,00	100	0
8,50	75	25
28,50	60	40
30,00	60	40
30,02	0	100
32,00	0	100
32,02	20	80
34,00	20	80
38,00	100	0
43,00	100	0

Tabelle 13.13: HPLC-Standards zur Bestimmung von Aminosäuren.

Komponente	Konzentration, mg L ⁻¹
L-Cystein	1000
L-Asparagin	250
L-Arginin	400
L-Valin	250
D-Ornithin	250
L-Lysin	400
L-Aspartat	250
L-Serin	250
DL-Alanin	750
L-Isoleucin	250
L-Leucin	250
L-Tyrosin	2000
L-Tryptophan	2000
L-Phenylalanin	200

13.4 Bestimmung von Ammoniak

Die Bestimmung der Ammoniakkonzentration in Fermentationsproben wurde enzymatisch über einen Ammoniaktest (Ammoniak UV Test, Nr. 11 112 732 035, R-Biopharm) durchgeführt. Der Test basiert auf der Umsetzung von NADH zu NAD⁺ und der dadurch verbundenen Abnahme der Absorption bei 340 nm. Dabei setzt das Enzym Glutamat-Dehydrogenase 2-Oxoglutarat zusammen mit NADH und NH₄⁺ zu L-Glutamat und NAD⁺ um.

Die Messungen der Ammoniakkonzentration in Fermentationsproben wurden im µL-Maßstab in 96-Well-Platten durchgeführt. Der Messbereich des Ammoniumtest liegt zwischen 0 und 0,08 g L⁻¹ Ammonium. Die zu analysierenden Proben wurden daher dementsprechend mit VE-Wasser verdünnt zwischen 1: 10 und 1:100 nach den Angaben in Tabelle 13.14 gemessen. Die Proben oder der mitgelieferte Standard (0,08 g L⁻¹ Ammonium) wurden mit Lösung 1 (2-Oxoglutarat, Triethanolaminpuffer, NADH) und VE-Wasser in der jeweiligen Vertiefung 96-Well-Platte vermischt und 5 Minuten inkubiert. Für jede Messreihe wurde ein Leerwert gemessen, bei dem anstatt Probe nur VE-Wasser zugegeben wurde. Nach der ersten Absorptionsmessung (E1) wurde die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Nach 20 Minuten wurde die Abnahme der Absorption erneut gemessen (E2) und die Ammoniumkonzentration aus der Differenz der Absorption und Korrektur um den Leewert über Vergleich mit einer Standardgerade ermittelt.

Tabelle 13.14: Volumenangaben und Durchführung des Ammoniaktests in 96-Well-Platten.

Lösung 1	100 µL
Probe /Standard	10 µL
VE-Wasser	190 µL
Inkubation 5 min	
Absorptionsmessung (E1)	
Enzymlösung (1:5)	10 µL
Inkubation 20 min	
Absorptionsmessung (E2)	

13.5 Mikro-GC-Methodik

Die Konzentrationen an H₂ und CO₂ im Abgas des Rührkesselreaktors wurden mit Hilfe eines Mikro-Gaschromatographen (Tabelle 13.15) online im Abstand von 10 Minuten nach den Bedingungen in Tabelle 13.16 ermittelt. Es wurde Stickstoff als Trägergas verwendet mit einer Flussrate von 10 mL min⁻¹. Die Retentionszeiten betragen dabei für H₂ 13,0 s und für CO₂ 17,9 s, die Gesamtanalysenzeit 45 s. Die Quantifizierung der Anteile der Gase erfolgte durch Kalibrierung der einzelnen Kanäle für den jeweils erwarteten Bereich des einzelnen Gases.

Tabelle 13.15: Mikro-Gaschromatograph-System.

Komponente	Typ / Version	Hersteller
Mikro-Gaschromatograph	CP-4900	Varian
GC-Modul für H ₂ , mit Vorsäule, Säule und Wärmeleitfähigkeitsdetektor	Mol Sieve 5Å, 10 m	Varian
GC-Modul für CO ₂ , mit Vorsäule, Säule und Wärmeleitfähigkeitsdetektor	PloraPlot PPQ, 10 m	Varian

Tabelle 13.16: Methodik zur Bestimmung der Konzentration an H₂ und CO₂ im Abgas.

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

13.6 Geräte

Tabelle 13.17: Allgemeine Geräte.

Gerät	Ausführung	Hersteller
Analytische Waage	Explorer E121245 (0,1 mg - 210 g)	Ohaus
Analytische Waage	Explorer E1N213 (5 g - 32 kg)	Ohaus
Autoklav	Varioklav H+P 500 EC-Z	H+P Labortechnik
Autoklav	Systec 5075 ELV	Systec
Sterilbank	Typ SWB, Klasse I	Waldner

		Laboreinrichtungen
Magnetrührer	Variomag 90750	2mag AG
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich
Tischzentrifuge	Mikro 120	Hettich
Vakuumpumpe	Laboport SD, N842.3FT.40.18, 20 L min ⁻¹	KNF Neuberger
pH-Meter	CG843	Schott
pH-Elektrode	BlueLine 24 pH	Schott
mobiles pH-Meter	PCE-PHD2	PCE Group
pH-Elektrode	HI 1330 B	HANNA Instruments
Einstrahlphotospektrometer	Spectronic Genesys 20	Thermo Electron
MTP-Photometer	EL808	Bio-Tek Instruments
Brutschrank/Inkubator	Serie BD 240 L (30 °C)	Binder
Brutschrank/Inkubator	INB 200 (30 °C)	Memmert
Trockenschrank	Serie E 28 L (80 °C)	Binder
Heizpilz	U2/2000 2L	Heraeus-Wittman
Pipetten	Transferpette S 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 10 mL	Brand

Tabelle 13.18: Geräte zum Betrieb der Anaerobwerkbank.

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

Tabelle 13.19: Geräte zum Betrieb des Systems aus 48 parallelen Rührkesselreaktoren unter kontrollierter Atmosphäre.

Gerät	Ausführung	Hersteller
mL-Bioreaktorblock	Prototyp	2mag AG
Sterilgasabdeckung mit Hohlachsen und Rührern	Prototyp, Magnetrührer aus PEEK mit eingekapselten Magneten	2mag AG
Reaktorabdeckung zur Absaugung der Reaktorabluft	Prototyp	2mag AG
Vakuumpumpe	Laboport SD, N842.3FT.40.18, 20 L min ⁻¹	KNF Neuberger
Steuergerät zur Ansteuerung des Bioreaktorblocks mit integrierter Rührerausfallerkennung	Prototyp	2mag AG
Gasmischstation für die individuelle Mischung der Gase N ₂ , H ₂ und CO ₂	MX 4/1	DASGIP AG
Umwälzthermostat	ME-12	Julabo
Durchlaufkühlaggregat	DLK-402, -10 bis +40 °C	G. Heinemann

Tabelle 13.20: Laborrührkesselreaktor inklusive zugehörige Peripheriegeräte.

Gerät	Ausführung	Hersteller
Laborrührkesselreaktor mit Steuereinheit	Labfors 2, Glasgefäß mit Doppelmantel zur Temperierung (Totalvolumen 2 L, Arbeitsvolumen 0,5 - 1,5 L), Schikanenkorb mit 3 Strömungsbrechern, zwei 6-Blatt-Scheibenrührer, mechanische Gleitringdichtung, Obenantrieb, Begasung über Begasungsrohr am Boden des Rührkesselreaktors	Infors
Software	IrisNT Pro Balance Version 4.11	Infors
Schnellprobenahmesystem ohne Totvolumen	Prototyp, Patent DE 102005049226	2 mag AG
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo
pO ₂ -Elektrode	InPro 6000	Mettler Toledo
Druckaufnehmer	PR-25HT (bis 2 bar Überdruck)	Keller Druckmesstechnik
Gasmischstation	WMR 4000	Westphal Mess- & Regelungstechnik
Massendurchflussregler für	5850E	Brooks Instruments

N ₂ , H ₂ und CO ₂		
Massendurchflussregler für N ₂	red-y compact regulator GCR	Vögtlin Instruments
Gasdurchflussmessgerät digital	Intelligent Digital Flowmeter	Varian
Peristaltikpumpe	BVP 7518-00	Ismatec
Basenschlauch	Marprene, 1,6 mm Innendurchmesser	Watson-Marlow

13.7 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Gase

Tabelle 13.21: Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Acetonitril (HPLC gradient grade)	CH ₃ CN	J.T. Baker
DL-Alanin	C ₂ H ₇ NO ₂	Fluka Chemie
p-Aminobenzoesäure (PABA)	C ₇ H ₇ NO ₂	Merck
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Carl Roth
L-Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Merck
L-Asparagin	H ₂ NCOCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	Sigma Aldrich
L-Aspartat Natriumsalz Monohydrat	HO ₂ CCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ Na·H ₂ O	Alfa Aesar
BICIN (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)glycin)	C ₆ H ₁₃ NO ₄	Carl Roth
D(+)-Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Carl Roth
Biozidal ZF, Desinfektionsmittel		WAK Chemie Medical
Borsäure	H ₃ BO ₃	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	Merck
Calcium-D-Pantothenat	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Carl Roth
Cobalt(II)sulfat Heptahydrat	CoSO ₄ ·7 H ₂ O	Merck
Cyanocobalamin	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ P	Carl Roth
L-Cystein Hydrochlorid	C ₃ H ₇ NO ₂ S HCl	Carl Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	HCON(CH ₃) ₂	Carl Roth
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	Carl Roth
Ethanol, absolut, zur Analyse	C ₂ H ₅ OH	Merck
Folsäure	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	Carl Roth
D(-)-Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carl Roth
Glycerin, ~ 98 %	C ₃ H ₈ O ₃	Carl Roth

Hefeextrakt		Carl Roth
Iodessigsäure	$C_2H_3IO_2$	Sigma Aldrich
L-Isoleucin	$C_6H_{13}NO_2$	Sigma Aldrich
Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Carl Roth
Kupfer(II)sulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Carl Roth
L-Leucin	$C_6H_{13}NO_2$	Carl Roth
Liponsäure	$C_8H_{14}O_2S_2$	Carl Roth
L-Lysin Monohydrat	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O$	Carl Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth
Mangan(II)sulfat Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	Merck
Methanol (HPLC gradient grade)	CH_4O	Carl Roth
3-Mercaptopropanol	$HSCH_2CH_2CO_2H$	Sigma Aldrich
Natriumacetat Trihydrat	$CH_3COONa \cdot 3 H_2O$	Carl Roth
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumformiat	HCOONa	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Carl Roth
Natriumhydroxid	NaOH Plätzchen	Carl Roth
Natriummolybdat Dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck
Natriumselenit	Na_2SeO_3	Sigma Aldrich
Natriumsulfid Hydrat	$Na_2S \cdot H_2O$	Sigma Aldrich
Natriumsulfit	Na_2SO_3	Merck
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Merck
Nickel(II)chlorid Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck
Nikotinsäure	$C_6H_5NO_2$	Merck
Nitrilotriessigsäure	$C_6H_9NO_6$	Merck
D-Ornithin Hydrochlorid	$C_5H_{12}N_2O_2 HCl$	Sigma Aldrich
L-Phenylalannin	$C_9H_{11}NO_2$	Carl Roth
pH-Kalibrierlösung pH 4, 7, 9		Carl Roth
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	$C_8H_6O_2$	Carl Roth

Polypropylenglykol (PPG)	$\text{H}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_n\text{OH}$	Sigma Aldrich
Pyridoxin Hydrochlorid	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	Carl Roth
Resazurin, Natriumsalz	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$	Alfa Aesar
Riboflavin	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	Sigma Aldrich
D(+)-Saccharose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Carl Roth
Schwefelsäure 95-97 %	H_2SO_4	Merck
L-Serin	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	Sigma Aldrich
Thiamin Hydrochlorid	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS HCl}$	Sigma Aldrich
Thiampehnicol	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_5\text{S}$	Sigma Aldrich
L-Tryptophan	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	Carl Roth
L-Tyrosin	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Carl Roth
L-Valin	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	Merck
Zinksulfat Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck

Tabelle 13.22: Verbrauchsmaterial.

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Anaerobe Kulturröhrchen	Hungate Typ, 16x125 mm, mit Butylgummi-Septum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
Butylstopfen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Einmalkanülen	0,6x30 mm und 0,9x 70 mm	Braun Melsungen
Einwegküvetten	Ratiolab Küvetten, Halbmikro	Ratiolab
Einwegspritzen	1, 3, 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
HPLC Probefläschchen	Rollrandflasche ND20 mit Aluminium-Bördelkappe und Septum, 10 mL	Carl Roth
Zentrifugenröhrchen	Falcon-Typ, 15 und 50 mL	Greiner Bio-One
Laborglasflaschen, beschichtet	Duran protect mit DIN Gewinde GL45, PU-ummantelt, 250, 1000 und 2000 mL	Sigma Aldrich

Lochkappen für Laborflaschen	für Gewinde GL 45	Glasgerätebau Ochs
Mikrozentrifugiergefäße	1,5 und 2 mL	Greiner Bio-One
Mikrozentrifugiergefäße	2 mL mit Safelock	Eppendorf
Mikrotiterplatte	Deepwell, 8 Streifen	Nunc
mL-Bioreaktoren	ohne Sensoren	2mag AG
Pipettenspitzen	200 und 1000 µL	Gilson
Pipettenspitzen, steril	200 und 1000 µL	VWR
Pipettenspitzen	10 mL	Brand
Probenahmeröhrchen	BD Vacutainer, 2, 3 und 5 mL	Becton Dickinson
Spritzenvorsatzfilter, HPLC-zertifiziert	Spartan Filter 0,2 µm	Whatman
Spritzenvorsatzfilter	Porengröße, 0,45 µm, steril	Pall Corporation
Zu-/Abluftfilter	AcroR 37 TF, PTFE 0,2 µM auf PP-Träger	Pall Corporation

Tabelle 13.23: Eingesetzte 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

