TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Reaktionstechnische Untersuchungen zur Gasfermentation mit *Clostridium aceticum*

Alexander Michael Mayer

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

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier
Prüfer:	1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
	2. Prof. Dr. rer. nat. Peter Dürre

Die Dissertation wurde am 23.04.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 21.06.2018 angenommen.

„Wer noch nie einen Fehler gemacht hat, hat sich noch nie an etwas Neuem versucht.“

Albert Einstein (1879-1955)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Während dieser Zeit haben viele Personen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten und anspruchsvollen Projektes danken. Trotz vieler Freiräume, welche mir bei der Bearbeitung des Projektes gewährt wurden, stand er mir bei auftretenden Schwierigkeiten stets mit konstruktiver Kritik und hilfreichen Ratschlägen zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit zur Seite.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Dürre sowie Frau Prof. Dr. Sonja Berensmeier für die Übernahme der jeweiligen Aufgaben des Korreferenten sowie des Prüfungsvorsitzenden.

Bei allen Mitarbeitern der Projektpartner am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm sowie am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart möchte ich mich für die konstruktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Meinen beiden Kollegen Kathrin Doll und Peter Riegler danke ich für die in allen Belangen professionelle, intensive und freundschaftliche Zusammenarbeit, für ihre Ratschläge sowie ihr jederzeit offenes Ohr.

Danken möchte ich auch allen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik sowie der Fachgebiete für Selektive Trenntechnik und Systembiotechnologie für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Xenia Priebe, Samantha Hensler, Sabine Wagner, Anna Groher, Christina Kantzow, Christoph Mähler, Christian Burger, Torben Schädler, Anton Rückel und Ingmar Polte für ihre Unterstützung und Freundschaft, die die Zeit für mich unvergesslich gemacht hat. Bei Gabriele Herbrik, Ellen Truxius, Marlene Schocher, Markus Amann, Georg Kojro und Norbert Werth möchte ich mich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Belangen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Michelle Ebersberger, Caroline Schiestl, Kristin Schoppel, Sascha Trunz, Thomas Stelzer, Emmeran Bieringer, Thomas Chrusciel und Constantin Kessler für die hervorragende Unterstützung meines Projekts in vielfältiger Weise.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meiner Freundin Cristina für ihre vollste Unterstützung, ihren Rückhalt und vor allem für ihr Verständnis und ihre Geduld während der gesamten Zeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

2 Problemstellung und Zielsetzung ... 3

3 Theoretische Grundlagen ... 6

3.1 Acetogenese ... 6

3.1.2 Heterotropher Metabolismus ... 8

3.1.3 Autotropher Metabolismus ... 9

3.1.4 Energiemetabolismus ... 12

3.2 *Clostridium aceticum* ... 14

3.3 Gasfermentation ... 15

3.3.1 Synthesegas ... 17

3.3.2 Reaktorkonfigurationen ... 19

3.4 Bioprozesstechnik ... 25

3.4.1 Mikrobielles Wachstum ... 25

3.4.2 Stoffbilanz ... 29

3.4.3 Substratüberschussinhibierung im Chemostaten ... 31

3.4.4 Massentransfer im idealen Rührkesselreaktor ... 32

4 Material und Methoden ... 36

4.1 Anaerobtechnik ... 36

4.2 Reaktionsmedien ... 37

4.2.1 Vitamin-, Spurenelement- und Stammlösungen ... 37

4.2.2 Vorkulturmedium ... 38

4.2.3 Prozessmedium ... 38

4.2.4 Zulaufmedium ... 39

4.3 Stamm und Stammhaltung ... 40

4.3.1 Heterotrophe Stammhaltung ... 40

4.3.2 Vorkulturherstellung und Zellernte ... 40

4.4 Reaktionstechnische Untersuchungen ... 41
4.4.1 Parallelansatz ... 41
4.4.2 Satzprozesse im Rührkesselreaktor ... 42
4.4.3 Kontinuierliche Prozessführung ... 44
4.5 Analytische Methoden ... 48
4.5.1 Optische Dichte und Biotrockenmassekonzentration ... 48
4.5.2 Produktanalytik ... 48
4.5.3 Abgasanalytik ... 49
4.5.4 Bestimmung zellspezifischer Raten ... 52
4.5.5 Identifikation der Substratüberschussinhibierungskinetik ... 53
5 Voruntersuchungen ... 54
5.1 Medium ... 54
5.1.1 Vitamine und Spurenelemente ... 54
5.1.2 Hefeextrakt ... 56
5.2 Temperatur ... 60
5.3 Produktinhibierung ... 61
5.4 pH-Regelung ... 63
6 Gasfermentationen mit *Clostridium aceticum* im Satzprozess ... 66
6.1 Leistungseintrag ... 66
6.2 Verwertung gasförmiger Substrate ... 69
6.2.1 Kohlenstoffmonoxid ... 69
6.2.2 Kohlenstoffdioxid/Wasserstoff ... 72
6.2.3 Kohlenstoffmonoxid/Kohlenstoffdioxid ... 75
6.2.4 Synthesegas ... 78
6.2.5 Diskussion ... 81
6.3 Energiestoffwechsel ... 88
6.3.1 Natriumbedarf ... 88

6.3.2 Entkopplungsexperimente ... 93
6.4 Substratinhibierung ... 102
6.4.1 Kohlenstoffmonoxid ... 102
6.4.2 Wasserstoff ... 111
7 Kontinuierliche Gasfermentationen mit *Clostridium aceticum* ... 115
7.1 Verwertung gasförmiger Substrate ... 116
7.1.1 Kohlenstoffmonoxid/Kohlenstoffdioxid ... 116
7.1.2 Kohlenstoffdioxid/Wasserstoff ... 124
7.1.3 Zweiphasige Prozessführung ... 129
7.2 Partialdruckkontrolle ... 134
7.2.1 Chemostat ... 134
7.2.2 Membranbioreaktor ... 137
8 Zusammenfassung ... 144
9 Ausblick ... 149
10 Literaturverzeichnis ... 151
11 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis ... 173
12 Anhang ... 177
12.1 Medien, Vitamine und Spurenelemente ... 177
12.2 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien ... 179

1 Einleitung

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung und dem Anstieg des allgemeinen Lebensstandards steigt der weltweite Energiebedarf stetig an. Zu dessen Deckung stellen fossile Rohstoffe, wie Erdöl, Erdgas oder Kohle, mit derzeit über 80 % die weitaus wichtigsten Energieträger dar. Weiterhin werden diese auch zur Bereitstellung von Kraftstoffen sowie zur Produktion petrochemisch basierter Basischemikalien benötigt. Trotz stetem Ausbau und steigender Energieeffizienz tragen regenerative Energiequellen gegenwärtig lediglich zur Deckung des steigenden Energiebedarfs bei ohne dabei fossile Energieträger langfristig zu ersetzen. Folglich ist deren Nutzung und Erfordernis noch für Dekaden prognostiziert (Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe [BGR], 2017). Neben der Endlichkeit fossiler Ressourcen sind insbesondere die bei deren Nutzung und Verarbeitung freiwerdenden Treibhausgase, allen voran von Kohlenstoffdioxid, problematisch. Diese verstärken und beschleunigen die Erderwärmung und die mit ihr verbundenen Folgen des Klimawandels, wie das Abschmelzen der Polkappen oder der Anstieg des Meeresspiegels (U.S. Global Change Research Program, 2017). Die 2015 im nicht bindenden Pariser Klimaabkommen von 195 Staaten beschlossene Begrenzung der Erderwärmung um maximal 2 °C macht die drastische Reduktion der weltweiten CO_2-Emissionen und somit eine Abkehr der Nutzung fossiler Energieträger nötig (Friedlingstein et al., 2014; McGlade & Ekins, 2015; United Nations, 2015). Hierdurch rücken erneuerbare, CO_2-neutrale Prozesse zur Energie- und Kraftstoffgewinnung weiter in den Fokus der Wissenschaft.

Als Schlüsseltechnologie bieten biotechnologische Fermentationsprozesse eine Möglichkeit der Nutzung nachwachsender Kohlenstoffquellen zur Produktion von Biokraftstoffen. Dabei verwenden bereits etablierte Prozesse der ersten Generation zur mikrobiellen Produktion von Bioethanol und Biodiesel zucker- und stärkehaltige Nahrungs- oder Nutzpflanzen wie Mais, Raps oder Zuckerrohr (Naik et al., 2010). Somit steht diese Technologie in direkter Konkurrenz zur Produktion von Lebensmitteln, fördert bei verstärktem Einsatz die soziale Ungleichheit und ist folglich gesellschaftlich umstritten (Clearfield, 2008; Havlík et al., 2011). Weiterhin ist für den verbreiteten Einsatz von Biokraftstoffprozessen der ersten Generation die Rodung von Naturräumen nötig, wodurch zusätzliche CO_2-Emissionen entstehen und damit die CO_2-Bilanz deutlich verschlechtert wird (Fargione et al., 2008; Searchinger et al., 2008).

Regenerative Biokraftstoffprozesse der zweiten Generation hingegen verwerten mikrobiell schwerer zugängliche lignocellulosehaltige Biomasse, wie Hölzer oder Graspflanzen, pflanzliche Nebenprodukte und sogar organische Abfallstoffe, wodurch die beschriebenen

Nachteile der Biokraftstoffprozesse der ersten Generation verringert oder gar vermieden werden können (Balat & Balat, 2009; Sims et al., 2010). Bei Biokraftstoffprozessen der zweiten Generation können drei Alternativen unterschieden werden: Einerseits kann lignocellulosehaltige Biomasse zunächst thermochemisch und enzymatisch aufgespalten und die dadurch gewonnenen Zuckermonomere als Substrat für klassische biotechnologische Fermentationsprozesse genutzt werden (Bugg et al., 2011; Naik et al., 2010). Andererseits können lignocellulosehaltige Biomasse sowie organische Abfallstoffe durch deren Vergasung zur Erzeugung von Synthesegas genutzt werden. Dieses CO-, CO_2- und H_2-reiche Gas kann dann thermochemisch im sogenannten Fischer-Tropsch-Prozess zur Kohlenwasserstoff-synthese verwendet werden. Eine biotechnologische Alternative zum Fischer-Tropsch-Prozess stellt die Gasfermentation dar. Diese nutzt strikt anaerobe acetogene Mikroorganismen zur Umsetzung von Synthesegas sowie auch industriellen Ab- und Prozessgasen zur Produktion von Biokraftstoffen und Basischemikalien. Dabei bietet die mikrobielle Fermentation gegenüber der thermochemischen Umsetzung gewisse Vorteile, etwa höhere Toleranz gegenüber Verunreinigungen, sowie moderatere Prozessbedingungen. Weiterhin ergibt sich durch die mikrobielle Verwertung von CO_2 eine negative CO_2-Bilanz, was zur aktiven Reduktion von Treibhausgasemissionen führt. Durch die Nutzung von industriellen Ab- und Prozessgasen besteht weiterhin die Möglichkeit bislang ungenutzte Kohlenstoff-quellen zu nutzen (Daniell et al., 2012; Liew et al., 2013; Redl et al., 2017). Die verwendeten acetogenen Mikroorganismen nutzen dabei das Synthesegas als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Aufbau von Biomasse und zur Energiegewinnung, wobei als Stoffwechselendprodukte stammspezifisch Basischemikalien und Biokraftstoffe, etwa Acetat, Ethanol, Butanol und Butyrat, gebildet werden (Bengelsdorf et al., 2013; Daniell et al., 2012; Dürre & Eikmanns, 2015).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die aktuellen Debatten über die Nutzung endlicher fossiler Rohstoffe und die bei deren Verwertung freiwerdenden Emissionen klimaschädlicher Treibhausgase erhöhen das gesellschaftliche und industrielle Interesse an der Nutzung regenerativer Rohstoffe zur Produktion von Kraftstoffen und Basischemikalien. Durch Vergasung lignocellulosehaltiger Biomasse und organischer Abfallstoffe kann CO-, H_2- und CO_2-haltiges Synthesegas gewonnen werden, welches mit anaeroben acetogenen Mikroorganismen, sogenannte Acetogene, zur Produktion von Biokraftstoffen und Basischemikalien umgesetzt werden kann. Alternativ ist die Verwertung mikrobiell bislang ebenso ungenutzter industrieller Ab- und Prozessgase möglich (Köpke, Mihalcea, Bromley et al., 2011). Die für Gasfermentations-prozesse genutzten acetogenen Mikroorganismen sind in der Lage anorganische Energie- und Elektronenquellen wie H_2 oder CO zur Reduktion von CO_2 zu nutzen und hierbei Biomasse aufzubauen, was als Chemolithoautotrophie bezeichnet wird (Fuchs, 2014; Munk, 2008). Dabei werden neben dem Stoffwechselprodukt Acetat von einigen Acetogenen auch Ethanol, Butanol, Butyrat und Butandiol gebildet. Trotz des wachsenden Interesses von Wissenschaft und Industrie an Gasfermentationen existieren noch keine kommerziellen Produktionsanlagen (Köpke & Liew, 2011; Liew et al., 2016; Ragsdale & Pierce, 2008).

Obwohl die Gruppe der acetogenen Mikroorganismen geschätzt über 100 Spezies umfasst sind bislang nur wenige Stämme auf reaktionstechnischer Basis charakterisiert worden. Daher ist das Potential vieler Acetogene für technische Gasfermentationsprozesse noch ungeklärt (Drake et al., 2008). Zu den bisher wenig untersuchten Acetogenen zählt auch der erste isolierte acetogene Mikroorganismus *Clostridium aceticum*. Dieser Stamm wurde bereits 1936 aus Bodenproben isoliert, war aber nachfolgend verloren gegangen (Wieringa, 1936, 1940). Die Aufklärung des für acetogene Mikroorganismen typischen katabolen Stoffwechselweges, der reduktive Acetyl-CoA-Weg, sowie der verwendeten Energiekonservierungsmechanismen erfolgte in der Zwischenzeit anhand weiterer isolierter acetogener Stämme (Ljungdahl & Wood, 1969; Ljungdahl, 1986; Thauer et al., 1977). Nach erneuter Isolierung von *C. aceticum* wurden daher nur wenige biochemische Untersuchungen durchgeführt, weshalb die Untersuchung von *C. aceticum* im Hinblick auf technische Gasfermentationsprozesse von Interesse ist (Adamse, 1980; Braun & Gottschalk, 1981; Lux & Drake, 1992).

Um die Gruppe für technische Gasfermentationen nutzbarer Acetogene zu erweitern ist daher ein Ziel dieser Arbeit die quantitative Charakterisierung und der Vergleich der chemolithoautotrophen Stoffwechselleistung von *Clostridium aceticum* mit unterschiedlichen

Gasen unter kontrollierten Standardbedingungen im Labormaßstab. Hierzu steht ein vollständig kontrollierbarer und kontinuierlich begaster 1 L-Rührkesselreaktor zur Verfügung.

Neben der begrenzten Anzahl quantitativ charakterisierter acetogener Mikroorgansimen stehen der erweiterten industriellen Anwendung von Gasfermentationen auch technische Herausforderungen gegenüber. Insbesondere die geringe Löslichkeit der Substrate CO und H_2 in Wasser und wässrigen Reaktionsmedien bedingt die kontinuierliche Zufuhr dieser Substrate über die Gasphase. Aus diesem Grund ist die Geschwindigkeit des Stofftransports aus der Gas- in die Flüssigphase, der sogenannte Massentransfer, häufig ein limitierender Faktor bei Gasfermentationsprozessen (Henstra et al., 2007; Klasson et al., 1991; Yasin et al., 2015). Eine Steigerung der Löslichkeit sowie des Stofftransports und somit die Überwindung möglicher Massentransferlimitierungen kann beispielsweise durch Erhöhung der Partialdrücke der gasförmigen Substrate erreicht werden (Demler & Weuster-Botz, 2011). Aufgrund hoher hydrostatischer Drücke am Reaktorboden und nicht-idealer Durchmischung können sich in industriellen Gasfermentationsreaktoren lokal hohe Gelöstkonzentrationen dieser Substrate ausbilden (Bengelsdorf et al., 2018; Munasinghe & Khanal, 2010b; Munasinghe & Khanal, 2010a). Für einige acetogene Mikroorganismen ist jedoch bekannt, dass hohe Konzentrationen der Substrate CO und/oder H_2 durch Inhibierung zu reduzierten Wachstums- und Produktbildungsraten führen können (Kantzow & Weuster-Botz, 2016; Vega et al., 1989). Da hierdurch die Effizienz der Synthesegasverwertung reduziert wird ist die Kenntnis über tolerierte Substratkonzentrationen acetogener Mikroorganismen wichtig, um deren Eignung für technische Gasfermentationsprozesse beurteilen zu können. Da für *C. aceticum* keine Informationen über tolerierte Substratkonzentrationen unter kontrollierten Prozessbedingungen vorliegen, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Aufklärung möglicher Substratinhibierungen durch CO und H_2, wobei insbesondere eine quantitative Beschreibung der Reaktionskinetik von Wachstum und Produktbildung ermöglicht werden soll.

Bei den meisten acetogenen Mikroorganismen kann bei der chemolithoautotrophen Umsetzung von Synthese- oder Prozessgasen entweder die Verwertung von CO_2/H_2 oder CO beobachtet werden (Bengelsdorf et al., 2013). Für eine möglichst effiziente Verwertung dieser Gase wäre hingegen die parallele Umsetzung aller drei Substrate sinnvoll (Daniell et al., 2012). Um die chemolithoautotrophe Verwertung unterschiedlicher Gase quantitativ vergleichen zu können muss zunächst der Einfluss des Mediums sowie der Prozessbedingungen auf das Wachstums- und Produktbildungsverhalten identifiziert werden, wodurch die Definition von Standardbedingungen ermöglicht wird. In Satzprozessen kann anschließend unter kontrollierten Bedingungen durch quantitative Ermittlung der Zustandsgrößen die Stoffwechselleistung bei der Verwertung unterschiedlicher Gase verglichen werden. Die

Aufklärung des Energiemetabolismus kann zudem das Verständnis des Energiekonservierungsmechanismus von *C. aceticum* erweitern und dabei helfen die Prozessleistung in Bezug auf Wachstum und Produktbildung zu verbessern (Geerligs et al., 1989; Kantzow, 2015).

Aufgrund der geringen Wertschöpfung werden technische Gasfermentationsprozesse zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten kontinuierlich betrieben (Bengelsdorf et al., 2018). Allerdings sind wegen der geringen Energieausbeute bei der chemolithoautotrophen Verstoffwechslung von Synthese- oder Prozessgasen die erzielbaren Wachstumsraten und Biomasseausbeuten im Vergleich zu aeroben Prozessen geringer, sodass nur geringe Biomassekonzentrationen erreicht werden, wodurch die Raum-Zeit-Ausbeuten bei kontinuierlicher Prozessführung begrenzt sind (Latif et al., 2014). Durch Verweilzeitent-kopplung von Biomasse und Flüssigphase könnten in kontinuierlichen Prozessen jedoch auch für acetogene Mikroorganismen mit geringen Wachstumsraten und Biomasseausbeuten höhere Biomassekonzentrationen und damit höhere Raum-Zeit-Ausbeuten ermöglicht werden. Die Verweilzeitentkopplung kann im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung realisiert werden, wodurch auch bei Substratinhibierung ein stabiler kontinuierlicher Betrieb möglich wäre (Kantzow et al., 2015).

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Acetogenese

Die anaerobe mikrobielle Reduktion von CO_2 mit H_2 zu Acetat mit aus Faulschlamm gewonnenen Mikroorganismen wurde erstmalig 1932 beschrieben (Fischer et al., 1932). Diese später als Acetogene bezeichneten Mikroorganismen stellen eine heterogene Gruppe obligat anaerober Bakterien dar, die per Definition den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zur reduktiven Synthese von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) aus CO_2 zur terminalen Elektronenübertragung und Energiekonservierung sowie zur Kohlenstofffixierung in Biomasse nutzen (Drake et al., 2006). Weiterhin sind die meisten Acetogene in der Lage, die Gase CO_2/H_2 und/oder CO als chemolithoautotrophe Kohlenstoff- und Energiequellen unter strikt anaeroben Bedingungen zu nutzen und zudem anaerob verschiedene Zucker stöchiometrisch zu Acetat umzusetzen (Drake, 1994). Der chemolithoautotrophe reduktive Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zählt dabei zu den ältesten bekannten Stoffwechselwegen der CO_2-Fixierung (Ragsdale, 2004). Acetogene Mikroorganismen besiedeln viele unterschiedliche Lebensräume und kommen nahezu ubiquitär in der Natur vor. Da die für den chemolithoautotrophen Stoffwechsel nötigen Enzyme zu hohen Anteilen aus oxidationssensiblen Metalloenzymen bestehen, erklärt sich die obligat anaerobe Lebensweise (Karnholz et al., 2002). So wurden acetogene Mikroorganismen beispielsweise aus Schlamm und Erdreich (Rosencrantz et al., 1999), in Frisch- und Schmutzwassersedimenten (Andreesen et al., 1970; Balch et al., 1977; Schink, 1984) und aus tierischen und menschlichen Verdauungstrakten (Bernalier, 1996; Graber et al., 2004) isoliert. Die vielfältigen Habitate spiegeln sich dabei auch in den individuellen Eigenschaften der Stämme und Klassen wider. So wurden neben mesophilen Spezies (Braun & Gottschalk, 1982) auch thermophile (Slobodkin et al., 1997) und psychrophile (Kotsyurbenko et al., 1995) Spezies isoliert. Heute sind über 100 acetogene Arten beschrieben, welche 25 Gattungen angehören, wobei die Gattungen *Acetobacterium* und *Clostridium* am häufigsten und am besten untersucht sind (Drake et al., 2008). Obwohl lange unterschätzt, spielen acetogene Mikroorganismen bei der globalen Kohlenstofffixierung aus CO_2 eine bedeutende Rolle (Drake et al., 1997; Drake et al., 2006). In Tabelle 3.1 sind exemplarisch einige acetogene Mikroorganismen mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 3.1: Beispielhafte Aufstellung einiger acetogener Mikroorganismen, deren Substrat- und Produktspektrum sowie die optimalen Prozesstemperaturen T_{opt} und pH-Bereiche pH_{opt}.

Spezies	Substrate	Produkte	T_{opt}, °C	pH_{opt}, -	Quelle
Acetobacterium wieringae	CO_2/H_2	Acetat	30	7,2 - 7,8	(Braun & Gottschalk, 1982)
Acetobacterium woodii	CO_2/H_2	Acetat	30	6,8	(Balch et al., 1977)
Blautia producta	CO_2/H_2, CO	Acetat	37	7,0	(Lorowitz & Bryant, 1984)
Clostridium authoethanogenum	CO_2/H_2, CO	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol, Lactat	37	5,8 - 6,0	(Abrini et al., 1994; Bruno-Barcena et al., 2013)
Clostridium carboxidivorans	CO/CO_2	Acetat, Ethanol, Butyrat, Butanol, Hexanol	38	6,2	(Ahmed et al., 2006; Liou et al., 2005; Phillips et al., 2015)
Clostridium formicoaceticum	CO	Acetat, Formiat	37	n. a.	(Andreesen et al., 1970; Diekert & Thauer, 1978)
Clostridium ljungdahlii	CO_2/H_2, CO	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol	37	6,0	(Köpke et al., 2010; Tanner et al., 1993)
Clostridium ragsdalei	CO_2/H_2, CO	Acetat, Ethanol, 2,3-Butandiol, Lactat	37	6,3	(Kundiyana et al., 2011; Sun et al., 2018)
Eubacterium limosum	CO_2/H_2, CO	Acetat	38	7,9 - 7,2	(Genthner & Bryant, 1982)
Moorella thermoacetica	CO_2/H_2, CO	Acetat	55	6,5 - 6,8	(Drake & Daniel, 2004; Jiang et al., 2009)
Thermoanaerobacter kivui	CO_2/H_2	Acetat	66	6,4	(Leigh et al., 1981)

3.1.2 Heterotropher Metabolismus

Neben der Nutzung chemolithoautotropher Substrate sind acetogene Mikroorganismen auch in der Lage unterschiedliche heterotrophe Substrate, wie verschiedene Hexosen, zur Energiegewinnung und Kohlenstofffixierung zu nutzen, wobei Acetat als einziges Produkt gebildet wird. Der gesamte Vorgang wird als Homoacetogenese bezeichnet und ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Dabei wird eine Hexose zunächst über Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat umgesetzt, wobei pro Molekül Hexose vier Reduktionsäquivalente [H] sowie über Substratkettenphosphorylierung zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen werden. Das entstandene Pyruvat kann anschließend über eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Hierbei werden je umgesetztes Pyruvatmolekül ein Molekül CO_2 sowie zwei Reduktionsäquivalente [H] frei. Zur optimalen Energieausbeute wird Acetyl-CoA über eine Phosphotransacetylase sowie eine Acetatkinase weiter zu zwei Molekülen Acetat umgesetzt, wobei erneut zwei Moleküle ATP gewonnen werden (siehe Gleichung 3.1). Die zwei zuvor entstandenen Moleküle CO_2 werden mit den insgesamt acht gewonnenen Reduktionsäquivalenten [H] in den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg eingeschleust und über diesen zur Bildung eines dritten Moleküls Acetat verwendet, wodurch die Regeneration der Reduktionsäquivalente gewährleistet wird (siehe Gleichung 3.2).

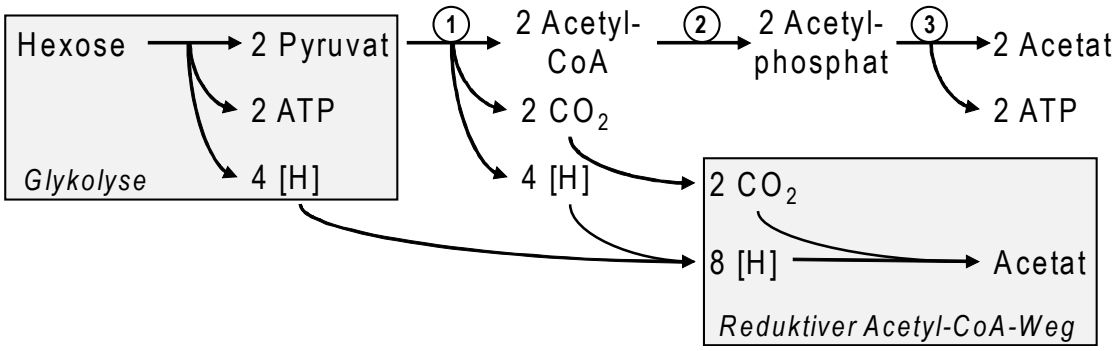

Abbildung 3.1: Heterotrophe Metabolisierung von Hexosen in Acetogenen über die Glykolyse sowie den reduktiven Acetyl-CoA-Weg. Enzyme: 1) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; 2) Phosphotransacetylase; 3) Acetatkinase. Abgeändert nach Drake et al. (1994) und Müller et. al (2004).

Die vollständige Umsetzung eines Hexosemoleküls $C_6H_{12}O_6$ bringt dem Organismus somit netto vier Moleküle ATP, wobei drei Moleküle Acetat CH_3COOH entstehen (Gleichung 3.3) (Barker & Kamen, 1945; Wood, 1952). Über das zentrale Stoffwechselintermediat Acetyl-CoA sind somit der heterotrophe und der autotrophe Metabolismus miteinander gekoppelt (Ljungdahl & Wood, 1969).

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CH_3COOH + 2\ CO_2 + 8\ [H] \quad 3.1$$

$$2\ CO_2 + 8\ [H] \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O \quad 3.2$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3\ CH_3COOH \quad (\Delta G^{0'} = -311\ kJ\ mol^{-1}) \quad 3.3$$

3.1.3 Autotropher Metabolismus

Zur Umsetzung autotropher Substrate verwenden Acetogene den reduktiven Acetyl-CoA-Weg zur Energiekonservierung und Kohlenstofffixierung. Da dieser Stoffwechselweg insbesondere durch Wood und Ljungdahl anhand des isolierten Acetogenen *Moorella thermoacetica* (ehemals *Clostridium thermoaceticum*) aufgeklärt wurde, wird er auch als Wood-Ljungdahl-Weg bezeichnet (Collins et al., 1994; Ljungdahl & Wood, 1965, 1969; Wood et al., 1986). Der lineare Stoffwechselweg, welcher die Fixierung von CO_2 sowie CO in Acetyl-CoA ermöglicht, setzt sich aus dem Methyl- sowie dem Carbonyl-Zweig zusammen (Ragsdale, 1997). Steht CO_2 als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so wird eine Elektronenquelle, entweder H_2 oder CO, benötigt, während CO auch von einigen Acetogenen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann. Von einigen anderen acetogenen Mikroorganismen ist wiederum bekannt, dass diese nicht in der Lage sind CO als alleiniges Substrat für den autotrophen Stoffwechsel zu nutzen sondern zusätzlich geringe Mengen CO_2 benötigen (Rajagopalan et al., 2002). Die Nettogleichungen der Bildung von Acetat, das Hauptstoffwechselprodukt der meisten Acetogene, mit CO_2/H_2 sowie CO mit den freien Standardenthalpien $\Delta G^{0'}$ ist in den Gleichungen 3.4, 3.5 und 3.6 dargestellt (Daniell et al., 2012; Ljungdahl, 1986). Da bei der Umsetzung der unterschiedlichen Substrate zum Primärprodukt Acetat unterschiedliche Änderungen der freien Standardenthalpie $\Delta G^{0'}$ vorliegen, unterscheidet sich die Menge an ATP, welche pro Molekül Acetat theoretisch synthetisiert werden kann (Fuchs, 2014).

$$2\ CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O \quad (\Delta G^{0'} = -95\ kJ\ mol^{-1}) \quad 3.4$$

$$4\ CO + 2\ H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2\ CO_2 \quad (\Delta G^{0'} = -175\ kJ\ mol^{-1}) \quad 3.5$$

$$2\ CO + 2\ H_2 \rightarrow CH_3COOH \quad (\Delta G^{0'} = -135\ kJ\ mol^{-1}) \quad 3.6$$

Im Folgenden werden die Grundlagen des Acetyl-CoA-Stoffwechselwegs anhand Abbildung 3.2 verdeutlicht. Für detailliertere Beschreibungen, insbesondere der enzymatischen Reaktionen, wird an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen (Diekert &

Wohlfarth, 1994; Drake, 1994; Fuchs, 1986; Ljungdahl & Wood, 1969; Poston et al., 1964; Ragsdale, 1997; Ragsdale & Pierce, 2008).

Zur Generierung von Reduktionsäquivalenten [H] mit H_2 als Energiequelle wird eine Hydrogenase (1) verwendet, während mittels bifunktioneller CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (2) die biologische Wasser-Gas-Shift-Reaktion mit CO sowie CO_2 stattfindet. Je nachdem, welche Kohlenstoffquelle vorliegt, wird dabei im Carbonyl-Zweig entweder CO direkt als Carbonyl-Gruppe verwendet oder CO_2 über die biologische Wasser-Gas-Shift-Reaktion unter Aufwand zweier Reduktionsäquivalente zunächst zur Carbonyl-Gruppe reduziert. In den Methyl-Zweig wird entweder CO_2 direkt eingespeist oder CO zuvor mittels der Wasser-Gas-Shift-Reaktion oxidiert. Ausgehend von CO_2 findet im Methyl-Zweig dann eine schrittweise enzymatische Reduktion statt. Dabei wird CO_2 zunächst mittels einer Formiatdehydrogenase (3) unter Aufwand zweier Reduktionsäquivalente zu Formiat reduziert. Anschließend wird die Formyl-Gruppe unter ATP-Verbrauch mittels Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase (4) auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen. Unter Abspaltung von Wasser entsteht an einer Formyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase (5) Methenyl-THF, welches im nächsten Schritt durch eine Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase (6) und den Verbrauch zweier Reduktions-äquivalente weiter zu Methylen-THF reduziert wird. Die darauffolgende Reduktion zu Methyl-THF mittels Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (7) benötigt zwei weitere Reduktions-äquivalente. Durch eine Methyl-Transferase-Reaktion (8) wird die Methyl-Gruppe auf ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeS-P) übertragen. Am zentralen Stoffwechselenzym, der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase, laufen nun Methyl- und Carbonyl-Zweig durch die Synthese von Acetyl-CoA zusammen (9). Dieses kann der acetogene Organismus nun entweder für anabole Reaktionen und den Aufbau von Biomasse oder zur Bildung von Acetat über Acetyl-Phosphat (10, 11) nutzen, wodurch das CoA erneut zur Verfügung steht und zudem ein Molekül ATP generiert wird. Dadurch wird klar, dass die aufgenommenen Substrate nicht zu 100 % stöchiometrisch zu Acetat umgesetzt werden können (Eden & Fuchs, 1982).

Bei der Betrachtung des Methyl-Zweigs wird insbesondere deutlich, dass im reduktiven Acetyl-CoA-Weg die Netto-ATP-Bildung selbst bei Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA null ist. Der Grund hierfür ist, dass das gewonnene ATP zuvor im Methyl-Zweig bei der Reduktion von Formiat investiert werden muss. Ausgehend vom zentralen Acetyl-CoA können einige Acetogene weitere Endprodukte, beispielsweise Ethanol, Butyrat, Butanol, oder über die Bildung von Pyruvat und Acetolactat auch 2,3-Butandiol bilden (Köpke, Mihalcea, Liew et al., 2011).

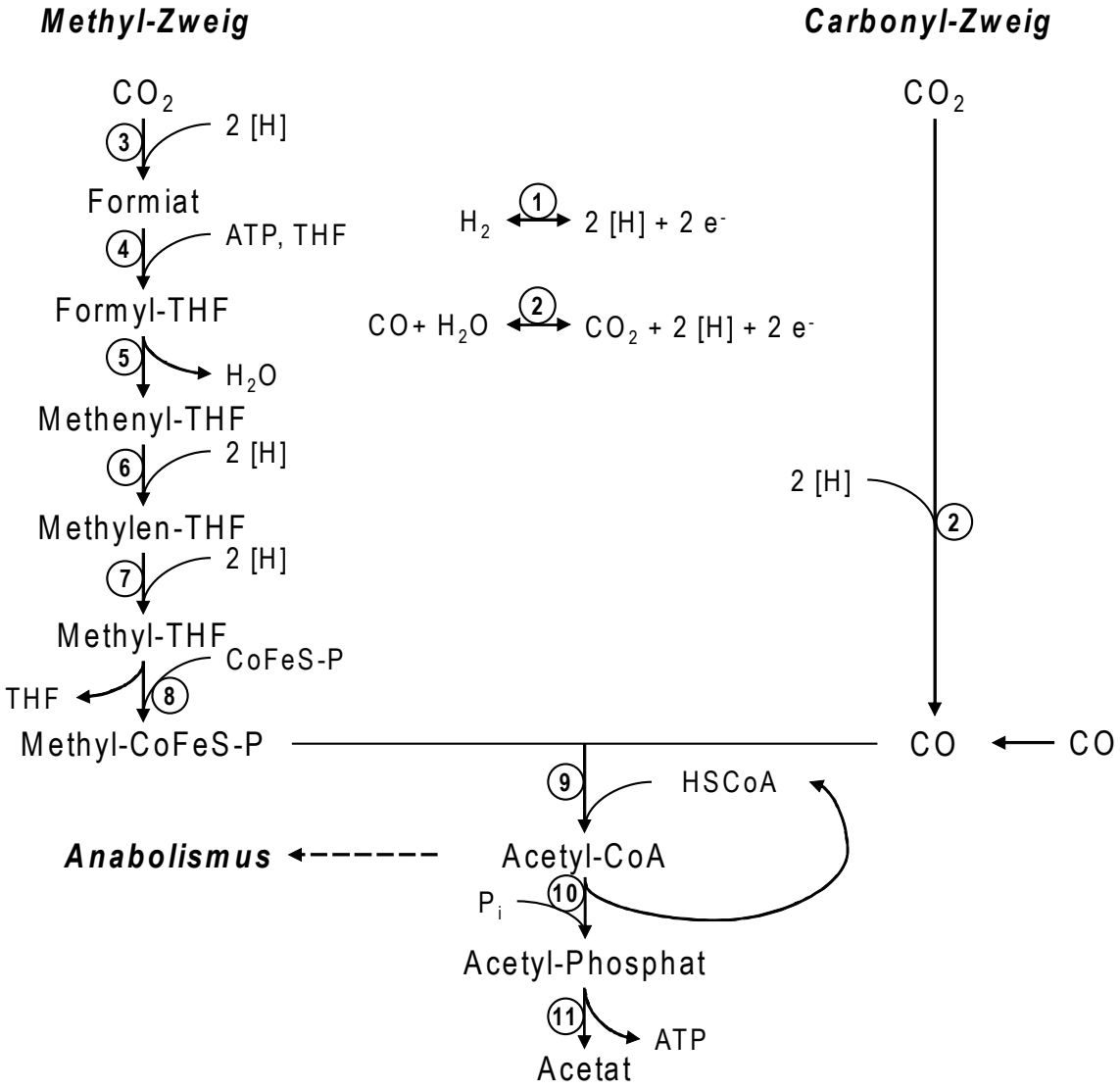

Abbildung 3.2: Vereinfachte schematische Darstellung des reduktiven Acetyl-CoA-Weges mit Methyl- und Carbonyl-Zweig sowie folgenden Enzymen: 1) Hydrogenase; 2) CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase; 3) Formiatdehydrogenase; 4) Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase; 5) Formyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase; 6) Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase; 7) Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase; 8) Methyl-Transferase; 9) CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase; 10) Phosphotransacetylase; 11) Acetatkinase. Abkürzungen: Reduktionsäquivalente [H]; Elektronen e^-; Adenosintriphosphat ATP; Tetrahydrofolat THF; Coenzym A HSCoA; Monophosphat P_i; Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein CoFeS-P. Beschreibung siehe Text, abgeändert nach Imkamp & Müller (2007).

Unter acetogenen Mikroorganismen weit verbreitet ist zudem die Entkopplung der Säurebildung von der Alkoholbildung, wobei sich die solventogene meist einer acetogenen Produktbildungsphase anschließt. Oftmals wird die Solventogenese dabei durch Änderung der Umgebungsparameter, etwa hohe Säurekonzentrationen oder sinkender pH, beeinflusst oder sogar erst induziert. Dann findet häufig keine *de novo*-Synthese der Alkohole, sondern vielmehr die Aufnahme und weitere Reduktion zuvor gebildeter Säuren zu den korrespondierenden Alkoholen statt, wie beispielsweise durch *C. carboxidivorans* oder

C. ljungdahlii (Abubackar et al., 2016; Ganigué et al., 2016; Hurst & Lewis, 2010; Richter et al., 2013; Tang et al., 1989). Längerkettige Säuren und Alkohole können dabei mittels Kettenverlängerung durch Kondensation von Acetyl-CoA gebildet werden (Daniell et al., 2012; Fernández-Naveira et al., 2017; McMurry et al., 2006).

3.1.4 Energiemetabolismus

Wie bereits verdeutlicht findet durch Fixierung von CO beziehungsweise CO_2 im reduktiven Acetyl-CoA-Weg keine Netto-ATP-Bildung über Substratkettenphosphorylierung statt. Da Acetogene dennoch rein chemolithoautotrophes Wachstum aufweisen, wurde die Hypothese des Aufbaus eines chemiosmotischen Ionengradienten und Kopplung mit membranständigen ATP-Synthasen (ATPasen) zur Energiekonservierung aufgestellt. Dies wurde durch die beobachtete Na^+-Abhängigkeit einiger Acetogene bestärkt. Dabei wird bei exergonen Reaktionen die Übertragung von Elektronen entlang eines Redoxpotentials mit dem endergonen Transport von Ionen durch die Zellmembran zum Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten $\Delta\mu_i$ gekoppelt (Fuchs, 1986; Heise et al., 1989; Thauer et al., 1977). Insbesondere *M. thermoacetica*, *A. woodii* sowie *C. ljungdahlii* wurden als Modellorganismen zur Aufklärung des Energiemetabolismus eingehend untersucht. Da einige Acetogene, wie beispielsweise *M. thermoacetica*, Cytochrome und Quinone besitzen, wurde lange Zeit angenommen, dass diese eine Elektronentransportkette zur Energiekonservierung nutzen (Pierce et al., 2008). Dies ließ sich experimentell jedoch nicht bestätigen und da auch die im Acetyl-CoA-Weg vorliegenden Reduktasen nicht membranständig vorliegen, gilt diese Hypothese zur Energiekonservierung heute als überholt. Es konnten jedoch zwei unterschiedliche membranassoziierte Ionen-translozierende Enzymkomplexe sowie membrangebundene F_1F_0-ATP-Synthasen in Acetogenen nachgewiesen werden (Das & Ljungdahl, 1997; Heise et al., 1991). Diese Enzymkomplexe wurden als Ferredoxin:NAD^+-Oxidoreduktasen (Rnf-Komplex, engl. *Rhodobacter nitrogen fixation*) sowie als Ferredoxin:H^+-Oxidoreduktasen (Ech-Komplex, engl.: *Energy converting hydrogenase*) identifiziert, wobei die translozierten Ionen jeweils entweder Protonen H^+ oder Natriumionen Na^+ sein können. Der dabei von Acetogenen genutzte zentrale Elektronenüberträger stellt Ferredoxin Fd dar (Schuchmann & Müller, 2014).

Ech-Komplex

Der Ech-Komplex gehört zu den Ni-Fe-Hydrogenasen und besteht aus sechs Untereinheiten, von denen zwei in der Membran verankert sind. Die übrigen Untereinheiten liegen im Cytoplasma, besitzen Fe-S-Zentren und oxidieren reduziertes Ferredoxin Fd^{2-}. Die Oxidationsreaktion ist dabei an die Reduktion zweier Protonen zu H_2 gekoppelt, was schematisch in Abbildung 3.3 A dargestellt ist (Bott et al., 1986; Hedderich & Forzi, 2005; Welte

et al., 2010). Da der Elektronentransfer von Fd^{2-} auf H_2 exergon ist ($\Delta G^{0'}$ = -7 kJ mol^{-1}), kann der gekoppelte endergone Ionentransport über die Zellmembran stattfinden. Der mögliche Energiegewinn ist dabei jedoch stark abhängig vom vorliegenden H_2-Partialdruck. Bislang ist bei Ech-abhängigen Acetogenen lediglich der Aufbau eines Protonengradienten $\Delta\mu_{H^+}$ experimentell belegt, wobei jedoch auch Aufbau und Nutzung von Natriumgradienten mittels Ech-Komplexen erwartet wird (Bertsch & Müller, 2015). Für einen Vertreter dieses Energiekonservierungsmechanismus, *M. thermoacetica*, lies sich ein stöchiometrisches Modell aufstellen, welches besagt, dass pro synthetisiertem Molekül ATP vier H^+ aus- beziehungsweise eingeschleust werden müssen. Dies entspräche einer ATP-Ausbeute von 0,5 ATP pro gebildetem Acetat (Schuchmann & Müller, 2014).

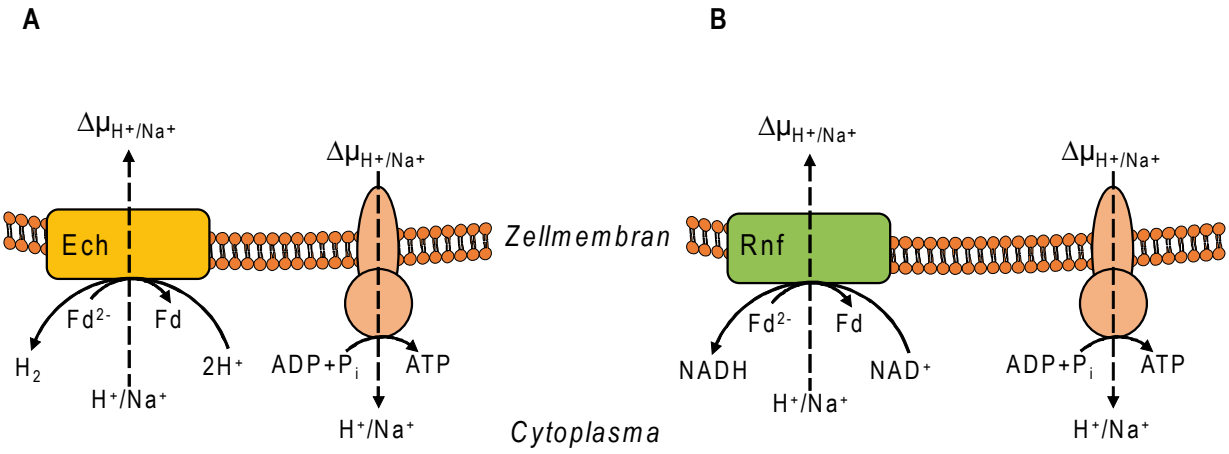

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der zur Energiekonservierung in Acetogenen verwendeten membranständigen Rnf- und Ech-Komplexe zum Aufbau chemiosmotischer Gradienten $\Delta\mu_i$ sowie ATP-Synthese an membranständigen F_1F_0-ATP-Synthasen. A: exergone Elektronenübertragung von Fd^{2-} auf H^+ am Ech-Komplex; B: exergone Elektronenübertragung von Fd^{2-} auf NAD^+ am Rnf-Komplex, gekoppelt mit endergonem H^+/Na^+-Transport über die Zellmembran. Abgeändert nach Biegel et al. (2011).

Rnf-Komplex

Der Rnf-Komplex stellt eine membrangebundene Ferredoxin:NAD^+-Oxidoreduktase dar, welche zuerst in *Rhodobacter capsulatus* identifiziert wurde (Schmehl et al., 1993). Der zumeist aus sechs Untereinheiten bestehende Rnf-Komplex überträgt zwei Elektronen von Fd^{2-} auf NAD^+, sodass oxidiertes Ferredoxin Fd sowie reduziertes NADH vorliegen (Biegel et al., 2011). Dabei ist dieser exergone Elektronentransfer ($\Delta G^{0'}$ = -25 kJ mol^{-1}) an den endergonen Aufbau eines chemiosmotischen Transmembrangradienten $\Delta\mu_i$ gekoppelt und ermöglicht theoretisch den Transfer von zwei Na^+ oder einem H^+ (siehe Abbildung 3.3 B) (Bertsch & Müller, 2015). Aufgeklärt wurde dieser Energiekonservierungsmechanismus vor

allem an *A. woodii*, welcher einen Natriumgradienten $\Delta\mu_{Na^+}$ aufweist (Biegel et al., 2009; Hess et al., 2013; Poehlein et al., 2012), während beispielsweise *C. ljungdahlii* einen Vertreter der Acetogene darstellt, welche einen Protonengradienten $\Delta\mu_{H^+}$ nutzen (Tremblay et al., 2012). Sofern die im Acetyl-CoA-Weg zur Reduktion verwendeten Enzyme und deren Cofaktoren bekannt sind, lassen sich Stoffwechselmodelle zur Energiekonservierung aufstellen. So wurde für *A. woodii* berechnet, dass 3,3 Na^+ zur Synthese eines Moleküls ATP nötig sind oder pro synthetisiertem Molekül Acetat 0,3 ATP gewonnen werden (Schuchmann & Müller, 2014).

3.2 *Clostridium aceticum*

Bereits 1936 wurde von dem niederländischen Wissenschaftler Wieringa erstmals die biologische Umsetzung eines Gemisches aus CO_2/H_2 durch eine aus Kanalschlamm isolierte Reinkultur beschrieben. Der erste isolierte acetogene Mikroorganismus, *Clostridium aceticum* (DSM 1496), wurde von ihm als obligat anaerober, stäbchenförmiger Organismus beschrieben, der terminale Endosporen ausbildet (Wieringa, 1936, 1940). In einer weiteren Untersuchung bezüglich seiner Nährstoffbedürfnisse zeigte sich, dass Hefeextrakt sowie grundlegende Vitamine und Spurenelemente, wie Biotin oder Pantothensäure, zur Entwicklung eines Basalmediums nötig sind (Karlsson et al., 1948). Anschließend ging der Stamm verloren und Reisolierungsversuche blieben über 30 Jahre lange erfolglos. Weitere aufklärende Untersuchungen konnten daher erst wieder nach seiner Reisolierung ab 1980 durchgeführt werden (Adamse, 1980). Von Braun et al. (1981) wird eine peritriche Begeißelung, ein mesophiles Temperaturoptimum von ~30 °C sowie ein pH-Optimum zwischen pH 8,0 und pH 8,3 beschrieben. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. aceticum* ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Abbildung 3.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Clostridium aceticum* mit peritricher Begeißelung (Braun et al., 1981).

Dabei erfolgte auch eine taxonomische Einordnung des Stammes *Clostridium aceticum* zu den *Firmicutes* und der Klasse der *Clostridien* (Braun et al., 1981). Weitere Untersuchungen zum metabolischen Potential des Stammes zeigten, dass *C. aceticum* beispielsweise auch CO sowie aromatische Verbindungen, wie beispielsweise Vanillin oder Ferulasäure, als Substrate nutzen kann (Braun & Gottschalk, 1981; Lux & Drake, 1992; Matthies et al., 1993). Sim et al. intensivierten zudem die Untersuchung der Kohlenstoffmonoxidverwertung in autotrophen Parallelansätzen in Anaerobflaschen (Sim et al., 2007; Sim et al., 2008; Sim & Kamaruddin, 2008). 79 Jahre nach seiner Erstisolierung liegt inzwischen das vollständig sequenzierte Genom des Stammes vor (Poehlein et al., 2015). Das Einbringen heterologer Gene von *C. acetobutylicum* befähigte den rekombinanten *C. aceticum*-Stamm zur Bildung geringer Mengen von Aceton (Becker et al., 2012). Reaktionstechnische Studien in kontinuierlich begasten kontrollierten Rührkesselreaktoren mit *C. aceticum* sind bisher nicht beschrieben.

3.3 Gasfermentation

Ein Großteil der chemischen Produktionsverfahren für Basischemikalien sowie für Kraftstoffe basiert derzeit auf der Nutzung fossiler Rohstoffe, wie Erdöl, Erdgas oder Kohle. Die Endlichkeit dieser fossilen Rohstoffe sowie die bei Ihrer Verarbeitung und Verbrennung freigesetzten Mengen des Treibhausgases CO_2 erfordern die Nutzung grundlegend alternativer Prozesse unter Verwendung erneuerbarer Rohstoffe zur Produktion kohlenstoffbasierter Basischemikalien und Kraftstoffe (Mondal et al., 2011; Verma et al., 2016).

Alternativ kann durch Vergasung von lignocellulosehaltiger Biomasse Synthesegas erzeugt werden, welches vorwiegend aus Kohlenstoffmonoxid CO, Wasserstoff H_2 und Kohlenstoffdioxid CO_2 besteht (Perlack et al., 2005). Das Synthesegas kann dann entweder thermochemisch im sogenannten Fischer-Tropsch-Prozess oder biotechnologisch als Substrat in Gasfermentationsprozessen genutzt werden. Andererseits können auch industrielle Ab- oder Prozessgase, beispielsweise aus Stahlwerken, sowie aus Kohlevergasung gewonnenes Synthesegas als Substrate genutzt werden (Phillips et al., 1994). Während beim Fischer-Tropsch-Prozess das Synthesegas mittels chemischer Katalysatoren, beispielsweise Eisen- oder Cobalt-Katalysatoren, zur Synthese von Kohlenwasserstoffen genutzt wird, werden in Gasfermentationsprozessen acetogene Mikroorganismen als biologische Katalysatoren zur Produktion von Basischemikalien und Biokraftstoffen eingesetzt (Davis, 2009). Gegenüber chemischen Katalysatoren besitzen diese Vorteile, was die Gasfermentation zur flexibleren Plattform macht (Griffin & Schultz, 2012). So wirken potentielle Synthesegasbestandteile, wie etwa Schwefelwasserstoff oder Ammoniak, gegenüber chemischen Katalysatoren reversibel oder sogar irreversibel inhibierend, was

wiederum eine teure Synthesegasreinigung voraussetzt (Dry, 2002; Rytter & Holmen, 2015; van Steen & Claeys, 2008). Viele acetogene Mikroorganismen zeigen hingegen deutlich höhere Toleranzen gegenüber Synthesegasverunreinigungen (Acharya et al., 2015; Ahmed et al., 2006; Ahmed & Lewis, 2007). Weiterhin benötigt die thermochemische Umsetzung von Synthesegas im Fischer-Tropsch-Prozess Betriebstemperaturen von 150 - 300 °C sowie Prozessdrücke bis zu 70 bar. Im Vergleich zur Gasfermentation (30 - 60 °C) stellt der Fischer-Tropsch-Prozess somit den deutlich energieintensiveren Prozess dar (Daniell et al., 2012). Gegenüber Fischer-Tropsch-Katalysatoren, welche eine spezifische Synthesegas-zusammensetzung zur Umsetzung benötigen, sind acetogene Mikroorganismen zudem flexibler gegenüber Schwankungen in der Synthesegaszusammensetzung und weisen darüber hinaus höhere Produktselektivitäten mit geringerer Nebenproduktbildung auf (Dry, 2002; Köpke, Mihalcea, Liew et al., 2011; Liew et al., 2016; Maitlis & Klerk, 2013). Aufgrund der genannten Vorteile wächst das Interesse an Gasfermentationsprozessen trotz des engeren Produktspektrums stetig, weshalb neben bestehenden Pilot- und Demonstrations-anlagen derzeit auch die ersten kommerziellen Anlagen errichtet werden. Dabei sollen sowohl Synthesegase aus Biomasse- und Abfallvergasung (INEOS Bio) als auch industrielle Ab- und Prozessgase (LanzaTech) als Substrate zur weiteren Umsetzung zur Biokraftstoff- und Basischemikalienproduktion durch proprietäre Produktionsstämme genutzt werden. Die häufigsten natürlichen Stoffwechselprodukte Acetat und Ethanol sind vergleichsweise niedrigpreisig, weshalb die kommerzielle Wertschöpfung von Gasfermentationsprozessen mit Wildtyp-Stämmen gering ist. Zudem ergibt sich bei hohen Produktkonzentrationen die Gefahr von Produktinhibierungen. Organische Säuren liegen in wässrigen Lösungen abhängig von pH und Temperatur in definierten Konzentrationsverhältnissen als Säure und dissoziierte Spezies vor, wobei bei einem Anstieg der intrazellulären Anionen- und Protonenkonzentrationen der zellinterne Protonenhaushalt und damit der zellinterne pH gestört wird, was zur Schädigung der Zelle führt (Booth, 1985; Roe et al., 1998). In Abbildung 3.5 ist beispielhaft das Dissoziationsgleichgewicht des Hauptstoffwechselprodukts Acetat/Essigsäure dargestellt. Daher wird mit Hilfe molekularbiologischer Methoden das Verschieben des Kohlenstoffflusses hin zu höherwertigen Produkten, wie etwa Butanol oder 2,3-Butandiol, sowie durch das Einbringen heterologer Gene die Erweiterung des Produktspektrums angestrebt, beispielsweise zur Bildung von Aceton (Hoffmeister et al., 2016; Köpke, Mihalcea, Liew et al., 2011; Köpke & Liew, 2011; Peralta-Yahya et al., 2012; Ueki et al., 2014).

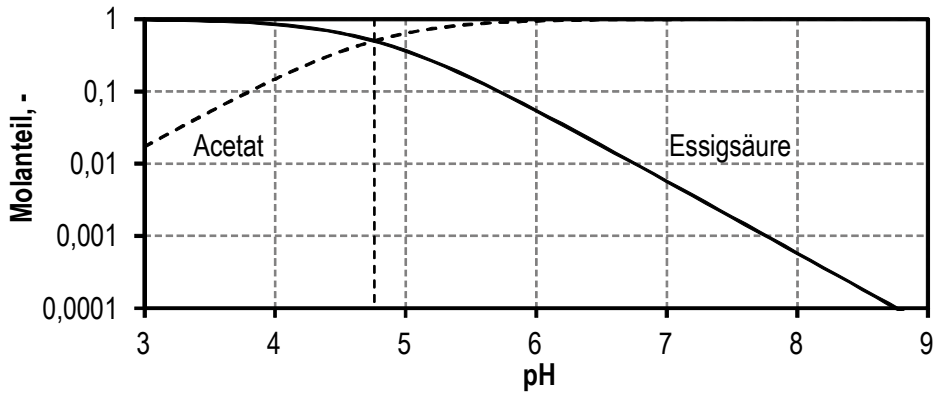

Abbildung 3.5: Dissoziationsgleichgewicht für Essigsäure/Acetat in Wasser. Die gestrichelte Vertikale zeigt den pK_S = 4,76 für T = 25 °C und reines Wasser (Ionenstärke 0 mol L^{-1}) an. pK_S nach Atkins & Paula (2012).

3.3.1 Synthesegas

Synthesegas, welches durch die Vergasung von Biomasse, biologischen Abfällen und Kohle sowie aus industriellen Ab- und Prozessgasen gewonnen werden kann, setzt sich vor allem aus Kohlenstoffmonoxid (CO), Wasserstoff (H_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) zusammen. Neben Wasser stellen Methan (CH_4), Ethen (C_2H_4), Ethan (C_2H_6), Benzen (C_6H_6), Naphthalin ($C_{10}H_8$), Ammoniak (NH_3), Cyanwasserstoff (HCN), Stickoxide (NO_X), Schwefeldioxid (SO_2) sowie Schwefelwasserstoff (H_2S) weitere Bestandteile von Synthesegas dar. Die Zusammensetzung des Synthesegases und das Vorhandensein von Verunreinigungen, wie beispielsweise Teere, sind einerseits stark abhängig von der Synthesegasquelle sowie andererseits vom Vergasungsprozess und den hierbei gewählten Prozessbedingungen, wie Temperatur, Druck oder Sauerstoffanteil. Dies erfordert gegebenenfalls die Reinigung des Synthesegases durch unterschiedliche Reinigungsschritte vor dessen Nutzung (Xu et al., 2011). Wie stark die Synthesegasquelle die Synthesegaszusammensetzung beeinflusst, wird aus Tabelle 3.2 ersichtlich. In dieser ist die Zusammensetzung von Synthesegas, welches entweder durch Kohle- oder Biomassevergasung (Rutenhirse) gewonnen wurde, sowie industriellem Prozessgas aus Stahlwerkabgasen gegenübergestellt. Da die zur Synthesegas-gewinnung eingesetzten Vergasungstechnologien, die dabei auftretenden Reaktionen (Trocknung, Pyrolyse, Oxidation, Reduktion), welche zu den Haupt- und Nebenbestandteilen führen, sowie die Synthesegasreinigung nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, wird an dieser Stelle auf die ausführliche Literatur verwiesen (Dahmen et al., 2012; McKendry, 2002; Mohammadi et al., 2011; Mondal et al., 2011; Richardson et al., 2012).

Tabelle 3.2: Verschiedene fossile und regenerative Synthesegasquellen und deren typische Zusammensetzung.

Synthesegasquelle / **Gaskomponente**	**Kohle** (Mondal et al., 2011; Phillips et al., 1993)	**Rutenhirse** (Ahmed et al., 2006; Datar et al., 2004)	**Stahlwerkabgas** (Köpke, Mihalcea, Liew et al., 2011)
CO, mol%	40 - 65	14 - 20	44
H_2, mol%	25 - 35	3 - 5	2
CO_2, mol%	1 - 20	15 - 18	22
N_2, mol%	5,7 - 8,4	50 - 60	32
CH_4, mol%	7	5	0
H_2S, ppm	20	n. a.	n. a.

In Tabelle 3.3 sind weiterhin die Diffusions- und Henrykoeffizienten der Hauptbestandteile CO, H_2 und CO_2 bei 298 K und 101,325 kPa in Wasser aufgelistet. Die Betrachtung der Diffusionskoeffizienten $D_{i,j}$ der drei Gase zeigt, dass diese in derselben Größenordnung liegen. Andererseits ist der Henrykoeffizient He_i für CO_2 im Vergleich zu CO beziehungsweise H_2 um den Faktor 36 beziehungsweise 44 größer. Da der Henrykoeffizient ein stoffspezifischer, temperaturabhängiger Proportionalitätsfaktor ist, mit dem unter Gleichgewichtsbedingungen gemäß dem Henry-Gesetz die Gelöstkonzentration einer Komponente i abhängig von ihrem Partialdruck p_i berechnet werden kann, wird ersichtlich, dass die maximale Gelöst-konzentration von CO_2 im Vergleich zu H_2 und CO erheblich größer ist. Da die in Gasfermentationsprozessen verwendeten acetogenen Mikroorganismen meist in flüssigem Reaktionsmedium suspendiert sind, stellt dies für die Substratversorgung und somit für die Prozessleistung und die Wertschöpfung einen nicht zu vernachlässigenden Faktor dar (Daniell et al., 2012; Liew et al., 2016).

Tabelle 3.3: Diffusions- und Henrykoeffizienten der Synthesegashauptbestandteile CO, H_2 und CO_2 bei 298 K und 101,325 kPa in Wasser.

Gas	**Diffusionskoeffizient $D_{i,j}$**, $m^2\ s^{-1}$ (Xu et al., 2011)	**Henrykoeffizient He_i**, $mol\ m^{-3}\ Pa^{-1}$ (Xu et al., 2011)
CO	$2{,}16 \cdot 10^9$	$9{,}38 \cdot 10^{-6}$
H_2	$3{,}42 \cdot 10^9$	$7{,}7 \cdot 10^{-6}$
CO_2	$2{,}04 \cdot 10^9$	$3{,}36 \cdot 10^{-4}$

Für das Substrat CO_2 gilt weiterhin zu beachten, dass aufgrund von Dissoziation die Zusammensetzung der gelöst vorliegenden CO_2-Spezies stark vom pH des Reaktionsmediums abhängig ist (siehe Abbildung 3.6). So steht gelöstes CO_2 im Gleichgewicht zu Kohlensäure H_2CO_3, wobei das Gleichgewicht stark auf der Seite des physikalisch gelösten CO_2 liegt. Kohlensäure wiederum dissoziiert in Lösung zunächst zu Hydrogencarbonat HCO_3^- und weiter zu Carbonat CO_3^{2-}.

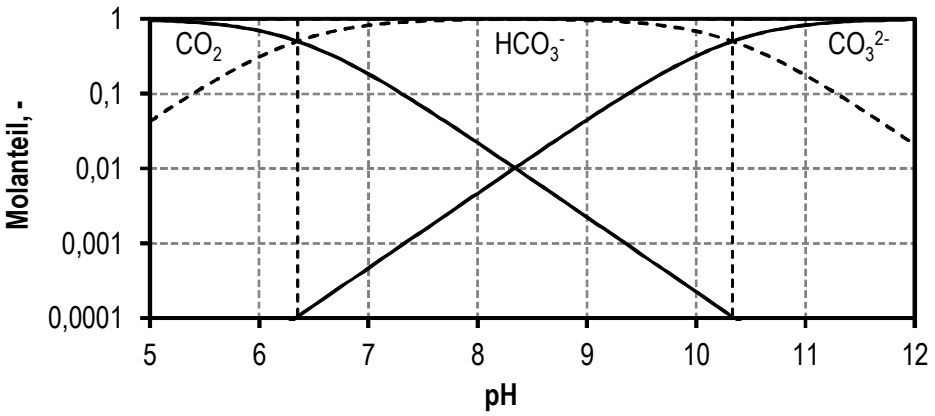

Abbildung 3.6: Dissoziationsgleichgewicht für CO_2-Spezies in Wasser. Gestrichelte Vertikale zeigen $pK_{S,1}$ = 6,35 sowie $pK_{S,2}$ = 10,33 für T = 25 °C und reines Wasser (Ionenstärke 0 mol L^{-1}) an. pK_S nach Atkins & Paula (2012).

3.3.2 Reaktorkonfigurationen

Rührkesselreaktor

Der Rührkesselreaktor ist mit einem Anteil von über 95 % der industriell eingesetzten Bioreaktoren der wichtigste Reaktortyp in der Bioverfahrenstechnik. In diesem Reaktor, schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt, werden mittels mechanischem Leistungseintrag durch das Rührorgan Homogenisieren, Suspendieren, Dispergieren und Wärmeübertragung in flüssigen Reaktionsmedien gewährleistet (Chmiel, 2011; Kadic & Heindel, 2014; Saxena, 2015). Bei Gasfermentationsprozessen werden die gasförmigen Substrate für gewöhnlich kontinuierlich zugeführt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Substrate (siehe Tabelle 3.3) ist zur unlimitierten Substratversorgung der Mikroorganismen in der wässrigen Phase ein hoher Massentransfer der Substrate aus der Gas- in die Flüssigphase nötig. Der Massentransfer ist vom Oberflächen/Volumen-Verhältnis der dispergierten Gasblasen im Reaktionsmedium (a), von der Stoffübergangszahl (k_L) sowie dem treibenden Konzentrationsgefälle des Substrats (Δc_S) abhängig. Durch den Leistungseintrag werden

dabei sowohl große Gasblasen zerkleinert als auch deren Verweilzeit im Reaktionsmedium erhöht. Eine Erhöhung des Leistungseintrags wiederum verbessert die Gasblasenzerkleinerung und erhöht somit das Oberflächen/Volumen-Verhältnis, was allerdings sehr zu Lasten des Energieverbrauchs geht (Bouaifi et al., 2001; Bredwell & Worden, 1998; Worden & Bredwell, 1998). Mikroorganismen sind bei hohem Leistungseintrag und stark ausgeprägten lokalen Energiedissipationsraten verstärkt fluidmechanischem Stress durch Kavitation sowie direktem Scherstress durch die Rührorgane ausgesetzt. Scherempfindliche Mikroorganismen, zu denen auch einige anaerobe und acetogene Mikroorganismen zählen, werden bei hohem Leistungseintrag geschädigt und zeigen verringertes Wachstum (Duddridge et al., 1982; Garcia-Briones & Chalmers, 1992; Jonczyk et al., 2013; Silvester & Sleigh, 1985; Suresh et al., 2009). Darüber hinaus stellen Rührkesselreaktoren aufgrund der geringen Wertschöpfung der Produkte sowie der hohen Energiekosten für die kommerzielle industrielle Anwendung in der Gasfermentation kein geeignetes Reaktorkonzept dar (Abubackar et al., 2011; Bredwell et al., 1999). Untersuchungen zur Begasung von Rührkesselreaktoren mit Mikrobläschen (engl.: *microbubbles*), welche einen Durchmesser von unter 1 mm besitzen, zeigten jedoch eine deutliche Steigerung des Massentransfers bei gleichzeitiger Reduktion des Energieverbrauchs durch verringerten Leistungseintrag (Bredwell & Worden, 1998; Kundiyana et al., 2010). Dennoch sind viele Charakterisierungsstudien von Acetogenen im Labormaßstab in Rührkesselreaktoren durchgeführt worden, wobei neben dem klassischen Satzprozess mit kontinuierlicher Begasung auch kontinuierliche Prozesse betrieben wurden.

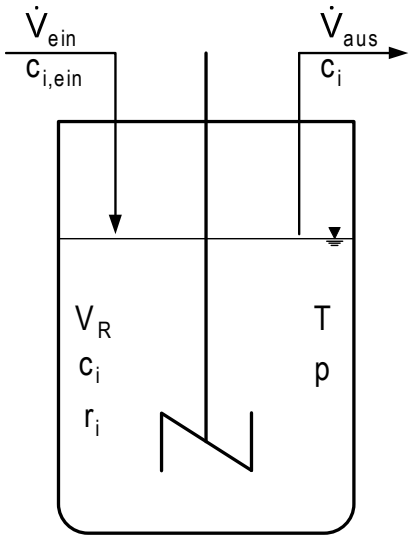

Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau des idealen Rührkesselreaktors. Zu- und Ablaufvolumenströme $\dot{V}_{ein}$ und $\dot{V}_{aus}$; Reaktionsvolumen V_R; Prozesstemperatur T; Prozessdruck p; Konzentration c_i und Reaktionsgeschwindigkeit r_i der Komponente i. Abgeändert nach Chmiel (2011).

In einem kontrollierten Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung konnten Demler & Weuster-Botz (2011) durch Steigerung des H_2-Partialdrucks auf bis zu 1700 mbar bei kontrolliertem pH die volumetrischen und die zellspezifischen Acetatbildungsraten von *Acetobacterium woodii* auf 7,4 g L^{-1} d^{-1} und 6,9 g g^{-1} d^{-1} steigern.

Kantzow & Weuster-Botz (2016) beobachteten im kontrollierten Rührkesselreaktor bei weiter erhöhtem H_2-Partialdruck auf 2100 mbar eine, im Vergleich zu einem H_2-Partialdruck von 400 mbar, ausgedehnte Verzögerungsphase, eine um 50 % reduzierte Acetatbildung und eine um den Faktor 18 verstärkte Formiatbildung. Rekombinante *A. woodii*-Stämme, bei denen Gene für Enzyme des Methylzweigs im reduktiven Acetyl-CoA-Weg oder für die Phosphotransacetylase und Acetatkinase überexprimiert waren, zeigten bei einem H_2-Partialdruck von 1400 mbar im Vergleich zum Wildtyp eine um 40 % reduzierte Formiatbildung sowie gesteigerte Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen.

Groher & Weuster-Botz (2016b) untersuchten in Vergleichsprozessen unterschiedliche Acetogene, wie beispielsweise *Acetobacterium woodii*, *Clostridium magnum* oder *Sporomusa ovata*, im kontrollierten Rührkesselreaktor in standardisierten Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung mit CO_2/H_2 (1:4), wobei *S. ovata* im Vergleich zu den übrigen untersuchten Stämmen bei den gewählten Standardbedingungen die höchsten Acetat- und Ethanolbildungsraten aufwies.

Kundiyana et al. (2011) untersuchten in Rührkesselreaktoren die Effekte der Prozesstemperatur, des pH sowie des verwendeten Puffers auf die Ethanolbildung aus Synthesegas ($H_2/CO_2/CO/N_2$, 1:3:4:12) mit *Clostridium ragsdalei* und erzielten dabei maximale optische Dichten von 1,3 sowie maximale Acetat- und Ethanolkonzentrationen von 7,88 g L^{-1} und 1,89 g L^{-1} nach 15 Tagen im Satzbetrieb unter kontrollierten Prozessbedingungen.

In einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor wurde von Mohammadi et al. (2012) mit einem Synthesegasgemisch ($CO/H_2/CO_2/Ar$, 11:4:2:3) der Einfluss der Verdünnungsrate bei der Kultivierung von *Clostridium ljungdahlii* auf die Biomasse- sowie die Acetat- und Ethanolkonzentrationen untersucht, wobei maximale Gleichgewichtskonzentrationen von 2,34 g L^{-1} Biomasse, 5,43 g L^{-1} Acetat und 6,5 g L^{-1} Ethanol erzielt wurden.

Blasensäule

Diese Reaktorkonfiguration besitzt kein mechanisches Rührwerk, sodass der gesamte Leistungseintrag in den meist zylinderförmigen Reaktor durch Dispergieren der Gasphase am Reaktorboden stattfindet (Díaz et al., 2008; Saxena, 2015). Zur verbesserten Durchmischung und Strömungsführung des Reaktionsmediums können in Blasensäulen Leitrohre eingebracht werden (Gasliftreaktor). Durch partielle Begasung ist der Reaktor dann in begaste (Aufstrom)

und unbegaste (Abstrom) Bereiche unterteilt, was zur Ausbildung eines Umlaufstroms führt (Antranikian, 2006; Chmiel, 2011). Zur Gewährleistung möglichst kleiner Gasblasen mit großem Oberflächen/Volumen-Verhältnis werden für den Gaseintrag meist Sinterfritten, Sinterplatten oder Membranen eingesetzt. Um eine hohe Verweilzeit der Gasblasen im Reaktor zu ermöglichen sind hohe Reaktoren oder Säulen nötig. Aufgrund des hydrostatischen Druckes sorgen hohe Wassersäulen für hohe Partialdrücke der Substratgase, was wiederum zu höheren Gelöstkonzentrationen im Reaktionsmedium führt (Bouaifi et al., 2001). Durch das Fehlen eines mechanischen Leistungseintrages ist dieser Reaktortyp insbesondere für scherempfindliche Organismen geeignet, da der volumetrische Leistungseintrag homogen über das Flüssigkeitsvolumen verteilt und daher im Gegensatz zum Rührkesselreaktor die lokale Energiedissipation gering ist (Kresta & Wood, 1993; Nogueira et al., 2012). Aufgrund geringer Energie- und Betriebskosten sowie hoher Gasverweilzeiten stellt er für Gasfermentationen einen geeigneten Reaktortyp dar, welcher auch in den ersten kommerziellen Anwendungen (LanzaTech) zum Einsatz kommt (Abubackar et al., 2011; LanzaTech, 2018; Liew et al., 2016, 2016; Ribeiro, 2008). Wie im Rührkesselreaktor kann die Flüssigphase als Satz- oder als kontinuierlicher Prozess betrieben werden (Kadic & Heindel, 2014). Auch Gasfermentationsstudien im Labor- und Pilotmaßstab sind mit Blasensäulen und Gasliftreaktoren publiziert:

Datar et al. (2004) nutzten beispielsweise eine 4 L-Blasensäule zur vergleichenden Kultivierung von *Clostridium carboxidivorans* sowohl mit Reinstgasen als auch mit aus Biomassevergasung gewonnenem Synthesegas zur Produktion von Ethanol.

Munasinghe & Khanal (2010a) hingegen untersuchten den Einfluss verschiedener Begasungsvorrichtungen zum Eintrag von reinem CO in einen 3 L-Gasliftreaktor und ermittelten für einen 20 µm-Diffusor die höchsten Massentransferkoeffizienten (k_La), welche vergleichbar mit Literaturwerten von Rührkesselreaktoren waren.

Festbettreaktor

In Festbettreaktoren befindet sich neben der Gas- und der Flüssigphase noch eine dritte, feste Phase. Hierbei handelt es sich um feste Packungen, auf denen die Mikroorganismen immobilisiert sind. Stellt die Gasphase die kontinuierliche Phase dar, so spricht man von Rieselbettreaktoren. Diese werden von oben gleichmäßig mit Reaktionsmedium berieselt, während die Gasphase den Reaktor und die feste Packung entweder von unten nach oben oder umgekehrt durchströmt (Doran, 2004; Kadic & Heindel, 2014; Saxena, 2015). Ähnlich wie auch bei Blasensäulen und Gasliftreaktoren sind die Energie- und Betriebskosten im Vergleich

zum Rührkesselreaktor gering, was sie zu einer interessanten Alternative für Gasfermentationsprozesse macht (Bredwell et al., 1999). Bei falscher Betriebsweise können jedoch nachteilige inhomogene Strömungen mit Kanalbildung, ungleichmäßige Flüssigkeitsverteilungen sowie Hohlraumverblockungen auftreten (Doan et al., 2008; Maiti & Nigam, 2007). Das wesentliche Problem dieses Reaktortyps ist jedoch die dauerhafte stabile Immobilisierung der Mikroorganismen auf der festen Packung. Auch für Festbett- und Rieselbettreaktoren sind Studien zum Gaseintrag für die Gasfermentation publiziert (Bredwell et al., 1999).

Devarapalli et al. (2017) untersuchten beispielsweise die Acetat- und Ethanol-Syntheseleistung von *Clostridium ragsdalei* mit CO/H_2 bei verschiedenen Verdünnungsraten sowohl im gleich- als auch im gegenstromgeführten Prozess in einem Rieselbettreaktor.

Membranverfahren

Aufgrund der geringen Energieausbeute des chemolithoautotrophen Metabolismus und der daraus resultierenden niedrigen Wachstumsraten acetogener Mikroorganismen sind die Verdünnungsraten und somit die Raum-Zeit-Ausbeuten in kontinuierlichen Prozessen beschränkt. Zur Überwindung der Beschränkung können Membranverfahren zur Verweilzeitentkopplung der Biomasse von der Flüssigphase eingesetzt werden. Die hierzu eingesetzten Mikrofiltrationsmembranmodule werden zur Minimierung der Biofilmbildung (engl: *fouling*) mit hohen Überströmungsgeschwindigkeiten überwiegend als Querstromfiltrationsmodule im Bypass betrieben (siehe Abbildung 3.8 A). Dabei wird das zellfreie Permeat mit den gelösten Produkten abgetrennt und das Retentat als konzentrierte Zellsuspension zurück in den Reaktor geführt. Durch Abfuhr eines Bleedstroms kann die Biotrockenmassekonzentration im Reaktionsvolumen kontrolliert werden. Aufgrund hoher Überströmungsgeschwindigkeiten sowie erschwerter Prozesskontrolle, etwa die kontinuierliche Substratversorgung oder das Aufrechterhalten anaerober Bedingungen, sind Filtrationsmodule im Bypass für Gasfermentationen nur eingeschränkt nutzbar (Munasinghe & Khanal, 2010b). Im Gegensatz hierzu ermöglicht die vollständige Integration des Filtrationsmoduls bei vollständig in das Reaktionsvolumen getauchten Mikrofiltrationsmembranmodulen (siehe Abbildung 3.8 B), auch als submerse Membranbioreaktoren bezeichnet, eine *in-situ*-Sterilisation, die vollständige Kontrolle der Prozessbedingungen sowie das Aufrechterhalten anaerober Bedingungen. Aufgrund der Betriebsweise im „*Dead-End*"-Modus sowie totaler Zellrückhaltung kann durch geringe Umströmungsgeschwindigkeiten Biofilmbildung auftreten, was bei hohen Biomassekonzentrationen zur Verblockung des Filtrationsmoduls führen kann (Carstensen et al., 2012). Ein alternativer Ansatz der Nutzung von Membranen stellen Biofilmreaktoren dar, bei denen hydrophobe Hohlfasermembranen zur

kontinuierlichen Substratzufuhr mit Synthese- oder Prozessgas durchströmt sind und auf deren Oberfläche sich folglich ein Biofilm ausbildet (Munasinghe & Khanal, 2010a).

In einem Biofilmreaktor erreichten Shen et al. (2014) mit *Clostridium carboxidivorans* in einem im Bypass betriebenen, kontinuierlich mit Synthesegas begasten und mit Reaktionsmedium durchströmten Hohlfasermembranmodul die Ausbildung eines Biofilms, wodurch bei einer Begasungsrate von 200 mL min^{-1} und bei einer Rezirkulationsrate des Reaktionsmediums von 200 mL min^{-1} eine maximale Ethanolkonzentration von 23,9 g L^{-1} erzielt wurden.

Durch den Einsatz eines getauchten Hohlfasermembranmoduls in einem Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung mit CO_2/H_2 (1:4) konnten Kantzow et al. (2015) einen kontinuierlich betriebenen submersen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung für die Gasfermentation etablieren. Dabei wurden mit *A. woodii* Biotrockenmassekonzentrationen bis zu 14 g L^{-1} sowie Raum-Zeit-Ausbeuten bis zu 147,8 g L^{-1} d^{-1} erzielt.

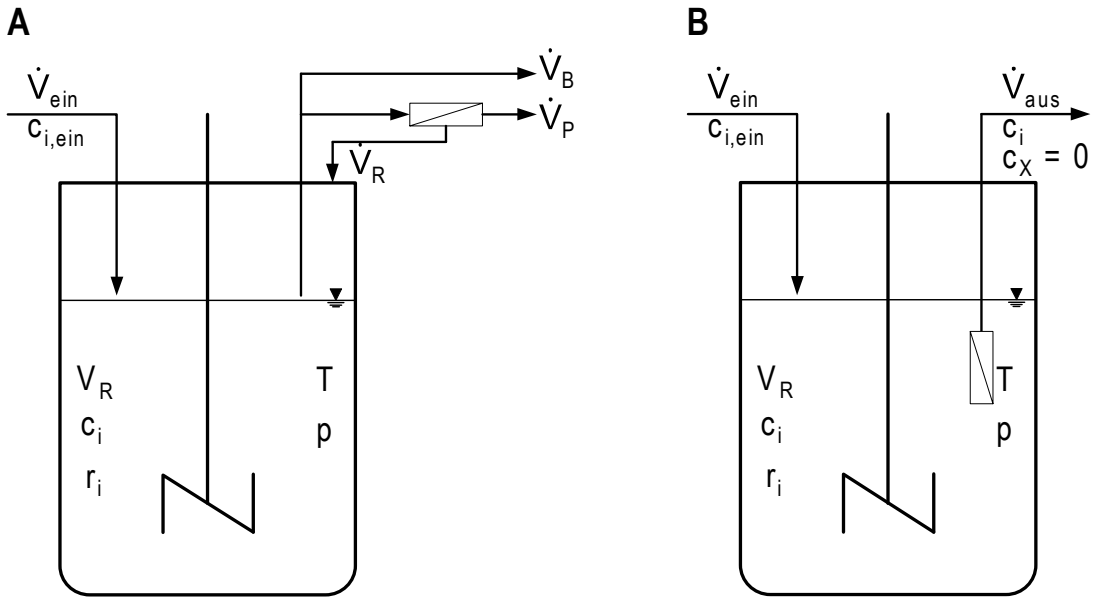

Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau kontinuierlicher Membranbioreaktoren A) mit Mikrofiltrationsmodul im Bypass und B) mit getauchtem Mikrofiltrationsmodul (submerser Membranbioreaktor). Zu- und Ablaufvolumenströme $\dot{V}_{ein}$ und $\dot{V}_{aus}$; Retentatvolumenstrom $\dot{V}_R$; Permeatvolumenstrom $\dot{V}_P$; Bleedstrom $\dot{V}_B$; Reaktionsvolumen V_R; Prozesstemperatur T; Prozessdruck p; Konzentrationen c_i und Reaktionsgeschwindigkeiten r_i der Komponente i; Biotrockenmassekonzentration c_X. Abgeändert nach Chmiel (2011).

3.4 Bioprozesstechnik

Die mathematische Beschreibung kontrollierter mikrobieller Prozesse ist durch Kopplung von formalkinetischen Ansätzen, die das Wachstums- und Produktbildungsverhalten der Mikroorganismen beschreiben, mit der Stoffbilanz des Reaktionssystems möglich.

3.4.1 Mikrobielles Wachstum

Wachstum und Produktbildung von Mikroorganismen wird durch die adäquate Versorgung mit Substraten, Vitaminen und Spurenelementen über das wässrige Reaktionsmedium ermöglicht. Sofern sich die Mikroorganismen durch Zellteilung vermehren und eine konstante mittlere Zellgröße angenommen wird können die Begriffe Wachstum (Zunahme der Biomasse) und Vermehrung (Zunahme der Zellzahl) gleichgesetzt werden.

Wachstumsphasen

Mikrobielles Wachstum zeigt im Satzprozess bei anfänglich unlimitierten aber endlichen Substratkonzentrationen ein charakteristisches Profil mit sechs Phasen, die schematisch in Abbildung 3.9 dargestellt sind (Monod, 1949).

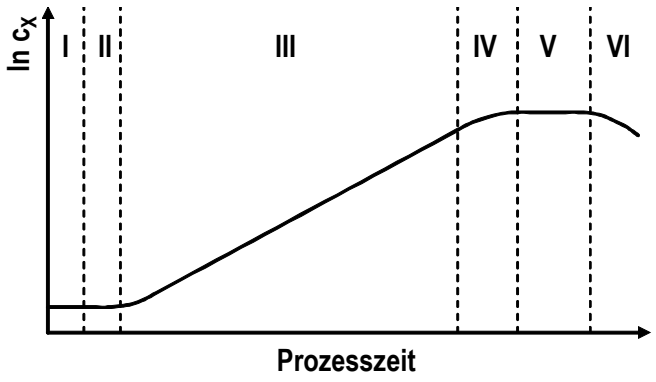

Abbildung 3.9: Idealisierte mikrobielle Wachstumskurve im Satzprozess, semilogarithmische Auftragung der Biotrockenmassekonzentration über der Prozesszeit. I) Adaptionsphase; II) Übergangsphase I; III) Exponentielle Wachstumsphase; IV) Übergangsphase II; V) stationäre Phase; VI) Absterbephase. Beschreibung siehe Text, abgeändert nach Monod (1949).

Nach der Inokulation der Zellen und Anpassung an die Prozessbedingungen in der Adaptionsphase (Phase I) beginnt die Population in der Übergangsphase (Phase II) mit ansteigender Rate zu wachsen. Dem schließt sich die exponentielle Wachstumsphase (Phase III) mit der bei unlimitierten Bedingungen und unter den vorliegenden Prozessbedingungen

maximalen Wachstumsrate μ_{max} an. Diese kann solange aufrechterhalten werden, bis sich die Prozessbedingungen, beispielsweise durch Verbrauch eines limitierenden Substrates oder Akkumulation eines inhibierenden Produktes, verschlechtern. In diesem Fall folgt eine weitere Übergangsphase (Phase IV), bei der sich die Wachstumsrate immer weiter reduziert, bis die Population schließlich die stationäre Phase (Phase V) erreicht hat. Durch den Verbrauch von Speicherstoffen oder durch Metabolisierung bereits abgestorbener Zellen stehen in dieser Phase Wachstums- und Absterberate im Gleichgewicht, sodass sich eine konstante Biomassekonzentration einstellt. In der Absterbephase (Phase VI) übersteigt die Absterbe- die Wachstumsrate, was zur Abnahme der Biomassekonzentration führt.

Die mathematische Beschreibung einer mikrobiellen Population in einem Bioreaktor geht von einem unstrukturierten und unsegregierten Modell aus, welches keine Subpopulationen oder Individuen berücksichtigt und die gesamte Biomasse als einheitliche Komponente X mit mittleren Zelleigenschaften ansieht (Chmiel, 2011; Sahm et al., 2013). Bei Wachstum durch Zellteilung lässt sich die Biotrockenmassekonzentration c_X in der exponentiellen Phase und der darauffolgenden Übergangsphase nach Gleichung 3.7 bestimmen.

$$c_X = c_{X,0} \cdot 2^n \qquad 3.7$$

c_X	Biotrockenmassekonzentration, g L^{-1}
$c_{X,0}$	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t_0 = 0 h, g L^{-1}
n	Generationenzahl, -

Die Reaktionsgeschwindigkeit r_i einer Komponente i stellt deren Bildungs- oder Abnahmerate im Reaktor bezogen auf das Reaktionsvolumen V_R dar. Zellspezifische Reaktionsgeschwindigkeiten q_i sind auf die vorliegende Biotrockenmassekonzentration bezogen. Dabei gilt für r_i und q_i der in Gleichung 3.8 dargestellte allgemeingültige Zusammenhang. Für die Biomasse X ergibt sich daher die Definition der spezifischen Wachstumsrate μ gemäß Gleichung 3.9.

$$r_i = c_X \cdot q_i \qquad 3.8$$

$$\mu \equiv q_X = c_X^{-1} \cdot dc_X \cdot dt^{-1} \qquad 3.9$$

r_i	volumetrische Reaktionsrate der Komponente i, g L^{-1} h^{-1}
q_i	zellspezifische Reaktionsrate der Komponente i, g g^{-1} h^{-1}
$\mu \equiv q_X$	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}

Für Substrate S und Produkte P ergeben sich dementsprechend volumetrische sowie zellspezifische Aufnahme- und Bildungsraten (r_S, r_P, q_S, q_P), wobei die volumetrische Produktbildungsrate r_P auch als Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) definiert ist. Durch Integration von Gleichung 3.9 wird die Biotrockenmassekonzentration als Funktion der Prozesszeit t beschreibbar (Gleichung 3.10).

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \qquad 3.10$$

Neben den volumetrischen und zellspezifischen Reaktionsraten können in Bioprozessen allgemein Ausbeutekoeffizienten $Y_{i,j}$ einer Komponente i bezogen auf eine Komponente j ermittelt werden. Dazu werden gemäß Gleichung 3.11 die jeweiligen Raten ins Verhältnis gesetzt um Zusammenhänge zwischen diesen darzustellen.

$$Y_{i,j} = r_i \cdot r_j^{-1} = q_i \cdot q_j^{-1} \qquad 3.11$$

$Y_{i,j}$ Ertragskoeffizient der Komponente i bezogen auf Komponente j, g g^{-1}

Wachstums- und Produktbildungskinetik

Ist unter definierten Bedingungen das Wachstum der Mikroorganismen lediglich von einem limitierenden Substrat S abhängig – üblicherweise handelt es sich hierbei um die Kohlenstoffquelle – lässt sich die spezifische Wachstumsrate μ abhängig von dieser Substratkonzentration c_S beispielsweise nach dem Modell von Monod beschreiben (Monod, 1949). Diese Formalkinetik, welche in Gleichung 3.12 dargestellt ist, beschreibt eine Sättigungsfunktion mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} und mit einer Halbsättigungskonstanten K_S.

$$\mu = \mu_{max} \cdot c_S \cdot (c_S + K_S)^{-1} \qquad 3.12$$

μ_{max} maximale Wachstumsrate, h^{-1}

K_S Halbsättigungskonstante, g L^{-1}

Dabei wird die maximale Wachstumsrate μ_{max} erreicht, wenn die Substratkonzentration sehr viel größer ist als die Halbsättigungskonstante ($c_S >> K_S$). Entspricht jedoch die Substratkonzentration gerade der Halbsättigungskonzentration ($c_S = K_S$), so stellt sich die halbmaximale Wachstumsrate $\mu = 0{,}5 \cdot \mu_{max}$ ein.

Der formalkinetische Ansatz des Monod-Modells macht lediglich eine Aussage bezüglich der zu erwartenden Wachstumsrate und berücksichtigt nicht die Produktbildung. Bei wachstumsassoziierter Produktbildung ist es mit Hilfe des produktspezifischen Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X,P}$ möglich, die zellspezifische Produktbildungsrate q_P aus der spezifischen Wachstumsrate μ gemäß Gleichung 3.13 zu ermitteln. Die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate anhand der zellspezifischen Substrataufnahmerate q_S erfolgt analog über den substratspezifischen Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X,S}$ (Gleichung 3.14).

$$\mu = q_P \cdot Y_{X,P} \qquad 3.13$$

$$\mu = q_S \cdot Y_{X,S} \qquad 3.14$$

Neben dem limitierenden Einfluss durch das Substrat kann auch die inhibierende Wirkung von Medienkomponenten auf die Wachstumsrate formalkinetisch beschrieben werden. Inhibierend können dabei beispielsweise Stoffwechselprodukte sein, welche sich während des Prozesses im Reaktionsmedium anreichern. Andererseits kann das limitierende Substrat bei hohen Konzentrationen selbst eine inhibierende Wirkung haben. Ein Modell, welches diese Substratüberschussinhibierung als kompetitive Hemmung berücksichtigt, wurde von Andrews aufgestellt und erweitert die Monod-Kinetik gemäß Gleichung 3.15 um die Inhibierungskonstante K_I (Andrews, 1968). Weiterhin lässt sich mit den Modellparametern K_S und K_I die optimale Substratkonzentration $c_{S,opt}$ ermitteln, bei der die optimale Wachstumsrate μ_{opt} erreicht wird (Gleichung 3.16). Bei geringen Substratkonzentrationen tritt durch nicht optimale Substratversorgung eine Limitierung von Wachstum und wachstumsassoziierter Produktbildung auf. Da die zellspezifischen Raten bei Unterschreiten der optimalen Substratkonzentration $c_{S,opt}$ abnehmen liegen limitierende Substratkonzentrationen $c_{S,lim}$ bei $c_{S,lim} < c_{S,opt}$ vor. Die Auswirkungen der Inhibierung im Vergleich zur klassischen Monod-Kinetik sind schematisch in Abbildung 3.10 dargestellt.

$$\mu = \mu_{max} \cdot c_S \cdot (c_S + K_S + c_S^2 \cdot K_I^{-1})^{-1} \qquad 3.15$$

$$c_{S,opt} = (K_S \cdot K_I)^{0,5} \qquad 3.16$$

K_I Inhibierungskonstante, g L^{-1}

$c_{S,opt}$ optimale Substratkonzentration, g L^{-1}

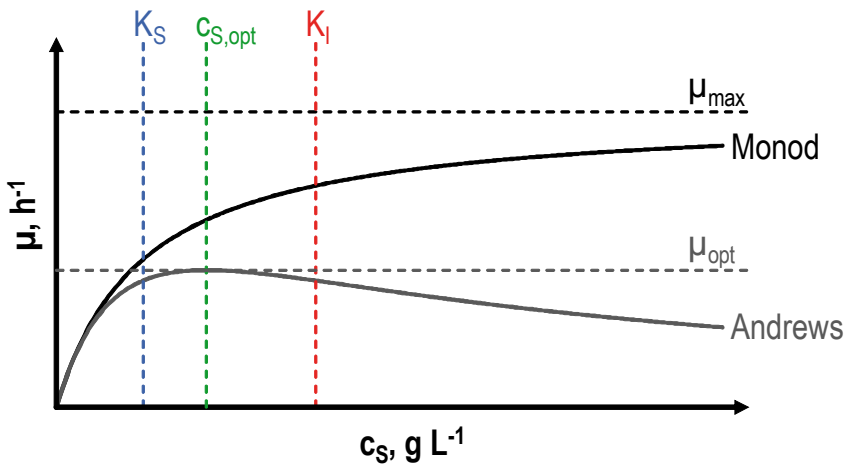

Abbildung 3.10: Spezifische Wachstumsraten μ nach den formalkinetischen Modellen nach Monod (1949) sowie bei Substratüberschussinhibierung nach Andrews (1968) als Funktion der Substratkonzentration c_S mit den Modellparametern maximale Wachstumsrate μ_{max}, Halbsättigungskonstante K_S, Inhibierungskonstante K_I und den abgeleiteten Zustandsgrößen optimale Substratkonzentration $c_{S,opt}$ und optimale Wachstumsrate μ_{opt}. Beschreibung siehe Text.

3.4.2 Stoffbilanz

Ausgehend von der allgemeinen Stoffbilanz kann unter Annahme einer idealen Rückvermischung, isothermer und isobarer Bedingungen sowie volumenbeständiger singulärer Reaktionen im idealen, isotropen Rührkesselreaktor die allgemeine vereinfachte Stoffbilanz gemäß Gleichung 3.17 ausgedrückt werden (Chmiel, 2011; Nielsen et al., 2003).

$$dm_i \cdot dt^{-1} = d(c_i \cdot V_R) \cdot dt^{-1} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_i + r_i \cdot V_R \qquad 3.17$$

m_i	Masse der Komponente i, g
t	Prozesszeit, h
$\dot{V}_{ein}$	Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_{aus}$	Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
c_i	Konzentration der Komponente i im Reaktionsvolumen, g L^{-1}
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
r_i	volumetrische Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, g L^{-1} h^{-1}
V_R	Reaktionsvolumen, L

Stoffbilanz im Satzprozess

Satzprozesse stellen bezüglich der Flüssigphase geschlossene Systeme dar ($\dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} = 0\ L\ h^{-1}$). Unter Vernachlässigung zugeführten Titrationsmittels und der Volumenzunahme durch Verwertung gasförmiger Substrate, welche bei der Gasfermentation kontinuierlich zugeführt werden, kann somit das Reaktionsvolumen V_R als konstant angenommen werden, alle für das Wachstum benötigten gelösten Supplemente sind im Reaktionsvolumen vorgelegt und werden im Laufe des Prozesses verbraucht. Hierdurch vereinfacht sich die Stoffbilanz für Satzprozesse gemäß Gleichung 3.18.

$$r_i = dc_i \cdot dt^{-1} \qquad 3.18$$

Stoffbilanz im kontinuierlichen Prozess

Der kontinuierliche Prozess stellt bezüglich der Flüssigphase ein offenes System dar, bei dem mit konstanten Volumenströmen kontinuierlich Reaktionsmedium zu- und abgeführt wird. Sofern die Volumenströme des Zu- und Ablaufs gleich sind ($\dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} = \dot{V}$), wird das Reaktionsvolumen konstant gehalten ($dV_R \cdot dt^{-1} = 0$) Weiterhin ist das Verhältnis des Volumenstroms zum Reaktionsvolumen als Verdünnungsrate D (engl.: *dilution rate*) beziehungsweise das reziproke Verhältnis als mittlere hydraulische Verweilzeit τ gemäß Gleichung 3.19 definiert, wodurch sich die allgemeine Stoffbilanz zu Gleichung 3.20 vereinfacht. Im Chemostaten stellen sich bei konstanten Prozessbedingungen und nicht zu hoch gewählter Verdünnungsrate ($D < \mu_{max}$) Fließgleichgewichtszustände mit zeitlich konstanten Konzentrationen ein ($dc_i \cdot dt^{-1} = 0$). Hierdurch ergibt sich die Stoffbilanz für Fließgleichgewichtszustände gemäß Gleichung 3.21.

$$D \equiv \tau^{-1} = \dot{V} \cdot V_R^{-1} \qquad 3.19$$

$$r_i = dc_i \cdot dt^{-1} + D \cdot (c_i - c_{i,ein}) \qquad 3.20$$

$$r_i = D \cdot (c_i - c_{i,ein}) \qquad 3.21$$

D	Verdünnungsrate, h^{-1}
τ	mittlere hydraulische Verweilzeit, h
$\dot{V}$	Volumenstrom, $L\ h^{-1}$

Die effektiven Verweilzeiten einzelner Volumenelemente sind über ein Verweilzeitspektrum F(t) verteilt. Die hydraulische Voraussetzung, welche zur Ausbildung von Fließgleichgewichten erfüllt sein muss, ist der einmalige vollständige Austausch des Reaktionsvolumens (F(t) = 1). Gemäß Gleichung 3.22 ist die mittlere hydraulische Verweilzeit τ eine Funktion der Verweilzeitsummenkurve F(t), wobei für ideale Rührkesselreaktoren der in Gleichung 3.23 dargestellte Zusammenhang gilt (Müller-Erlwein, 2007). Durch F(t) > 0,99 resultiert t > 5 τ als hydraulische Voraussetzung.

$$\tau = \int_0^1 t \cdot dF(t) \qquad 3.22$$

$$F(t) = 1 - e^{-t \cdot \tau^{-1}} \qquad 3.23$$

3.4.3 Substratüberschussinhibierung im Chemostaten

Durch Kopplung der Formalkinetik mit der Stoffbilanz im Chemostaten ergibt sich für Fließgleichgewichtszustände unter der Annahme eines sterilen Zulaufs ($c_{X,ein} = 0$) der in Gleichung 3.24 dargestellte Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und der Verdünnungsrate D.

$$\mu = D \qquad 3.24$$

Unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels kann durch Einsetzen von Gleichung 3.14 in Gleichung 3.21 der Zusammenhang für die Substratkonzentration im Fließgleichgewicht gemäß Gleichung 3.25 dargestellt werden.

$$r_S = \mu \cdot Y_{X,S}^{-1} \cdot c_X = D \cdot (c_{S,ein} - c_S) \qquad 3.25$$

Zur Darstellung der Bedingungen eines Fließgleichgewichts für das inhibierende und limitierende Substrat S wird in Gleichung 3.25 zur Berücksichtigung des formalkinetischen Modells der Substratüberschussinhibierung Gleichung 3.15 eingesetzt (Gleichung 3.26).

$$\mu_{max} \cdot c_S \cdot (c_S + K_S + c_S^2 \cdot K_I^{-1})^{-1} \cdot Y_{X,S}^{-1} \cdot c_X = D \cdot (c_{S,ein} - c_S) \qquad 3.26$$

Durch Auftragen der beiden Bedingungen als Funktion der Substratkonzentration in Abbildung 3.11 werden die möglichen Betriebszustände für das Ausbilden des Fließgleichgewichts dargestellt, wodurch das Problem instabiler Betriebszustände bei einer Substratüberschuss-inhibierung im Chemostaten verdeutlicht wird: Betriebspunkt γ stellt zwar einen stabilen

Betriebszustand dar, aufgrund der hohen Substratkonzentration ist die Substrataufnahmerate r_S jedoch 0. Somit findet kein Wachstum mehr statt und es kommt zum Auswaschen der Biomasse aus dem System ($c_X = 0$). Ausgehend von Betriebszustand β führen geringfügige Auslenkungen der Substratkonzentration zu starken Änderungen der Substrataufnahmeraten, wodurch sich entweder Betriebspunkt α oder γ einstellen. Betriebspunkt β stellt demnach keinen stabilen Prozesszustand dar. Der einzig sinnvolle stabile Betriebspunkt ist α, da hier auch bei geringfügigen Auslenkungen von c_S immer wieder α erreicht wird. Erst das Überschreiten der kritischen Substratkonzentration $c_{S,krit}$ führt zur Instabilität des Systems.

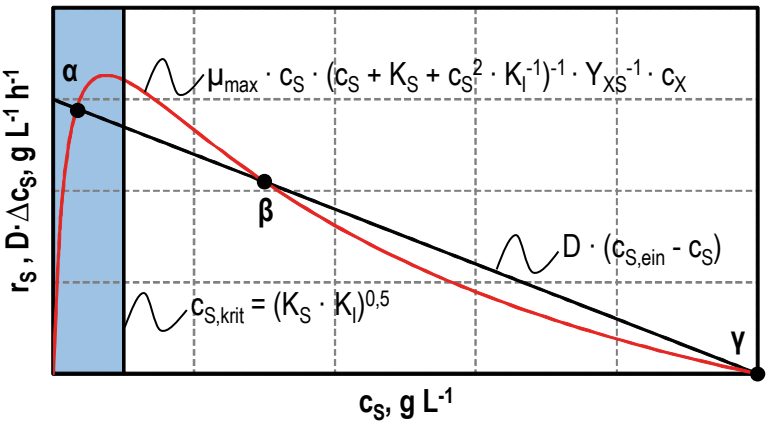

Abbildung 3.11: Fließgleichgewichtsbedingungen für das inhibierende Substrat S im Chemostaten mit gekoppelter Substratüberschussinhibierung zur Identifikation möglicher Betriebszustände. α: stabiler Betriebspunkt; β: instabiler Betriebspunkt; γ: stabiler Betriebspunkt. Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max}; Substratkonzentration c_S; Halbsättigungskonstante K_S; Inhibierungskonstante K_I, substratspezifischer Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,S}$; Biotrockenmassekonzentration c_X; Verdünnungsrate D; kritische Substratkonzentration $c_{S,krit}$. Beschreibung siehe Text. Abgeändert nach Weuster-Botz (2011).

3.4.4 Massentransfer im idealen Rührkesselreaktor

Da die Gelöstkonzentrationen der gasförmigen Substrate in Wasser und wässrigen Medien niedrig sind ist die kontinuierliche Zufuhr der Substrate über die Gasphase nötig. Daher stellt der Massentransfer in Gasfermentationsprozessen aus der Gasphase über die Flüssigphase bis schließlich zu den Zellen für die Substratversorgung einen wichtigen Faktor dar. Dieser Massentransfer ist schematisch in Abbildung 3.12 A dargestellt. Innerhalb der Gasphase diffundieren Gasmoleküle zunächst aus dem Kern der Gasblase zur Phasengrenze *gas-flüssig* (1). Es folgt der Stoffübergang über die Phasengrenze (2) und die Diffusion durch die laminare Grenzschicht (3), wobei der die Gasblase umgebende Flüssigkeitsfilm überwunden wird. Durch Konvektion in der flüssigen Kernströmung wird das gelöste Gas an die laminare

Grenzschicht *flüssig-fest* transportiert (4), was zum Stoffübergang in die feste Phase (5), den Mikroorganismen, führt. Zuletzt diffundiert das Gas durch die Zellmembran ins Zellinnere, wo es dann als Substrat zur Verfügung steht (6).

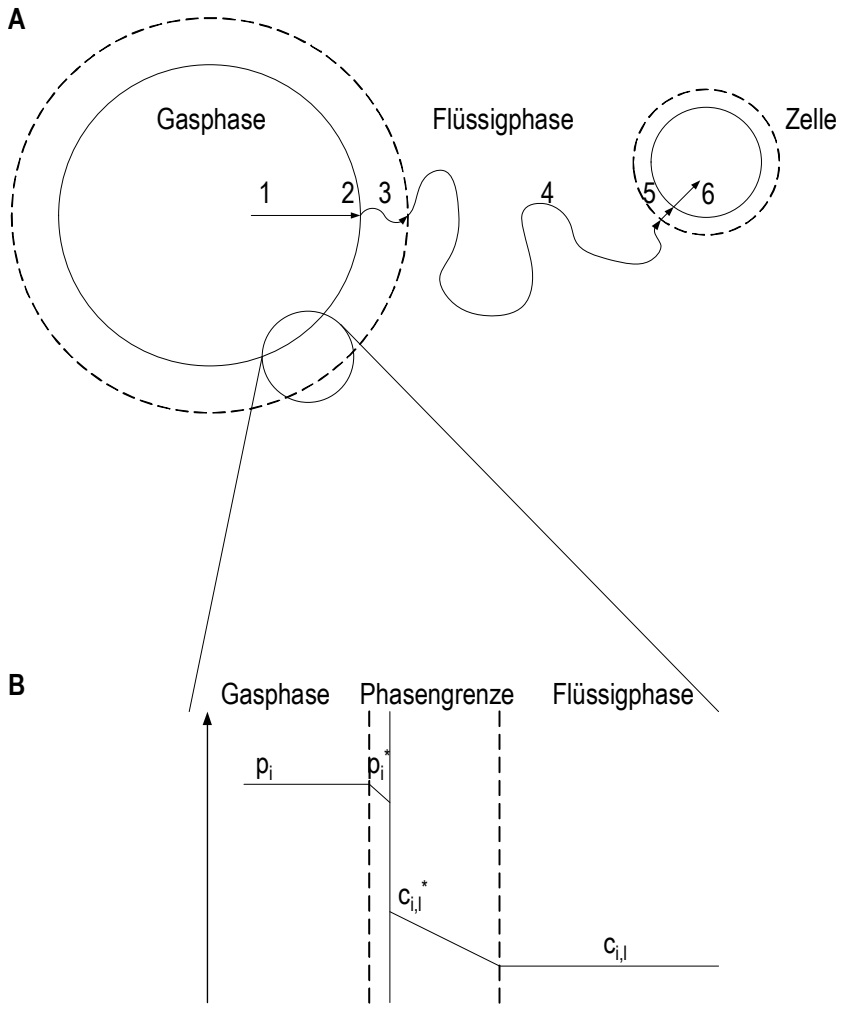

Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Massentransfers gemäß Zweifilmtheorie. A: Schematische Darstellung des Massentransfers aus der Gasphase durch die Flüssigphase in eine Bakterienzelle (Beschreibung im Text) B: Betrachtung des Massentransfers der Komponente i an der Phasengrenze *gas-flüssig* mit laminaren Grenzfilmen (gestrichelte Vertikalen) gemäß der Zweifilmtheorie. Partialdruck in der Gasphase p_i; gasseitiger Gleichgewichtspartialdruck p_i^*: flüssigkeitsseitige Gleichgewichtskonzentration $c_{i,l}^*$; Gelöstkonzentration in der flüssigen Kernströmung $c_{i,l}$. Beschreibung im Text, abgeändert nach Chmiel (2011) und Sahm et al. (2013).

Ein Modell des Stofftransfers stellt die Zweifilmtheorie dar, welche besagt, dass zwei Fluide an ihrer gemeinsamen Phasengrenze *gas-flüssig* laminare Grenzschichten mit Phasengleichgewichten ausbilden, in denen der Stofftransport senkrecht zur Flussrichtung entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgt. Im Kern sind die jeweiligen Phasen hingegen homogen durchmischt (siehe Abbildung 3.12 B) (Chmiel, 2011; Doran, 2004).

Der Diffusionsvorgang durch die laminare Grenzschicht kann durch das 1. Ficksche Gesetz (Gleichung 3.27) beschrieben werden.

$$\dot{n} = - D_{ij} \cdot A \cdot dc_i \cdot dz^{-1} \qquad 3.27$$

$\dot{n}$	Stofftransferrate, mol s^{-1}
D_{ij}	binärer Diffusionskoeffizient der Komponente i in j, m^2 s^{-1}
A	Phasengrenzfläche, m^2
$dc_i \cdot dz^{-1}$	treibendes Konzentrationsgefälle senkrecht zur Stoffaustauschfläche, mol m^{-4}

Aufgrund schneller Diffusion in der Gasphase im Vergleich zur Flüssigphase sowie geringerer gasseitiger Grenzschicht wird der Transportwiderstand durch die gasseitige Grenzschicht vernachlässigt. Für die flüssigkeitsseitige Darstellung lässt sich dann die Beziehung für die Massentransferrate (MTR) nach Gleichung 3.28 herleiten. Dabei ist der k_La_i der volumenbezogene Stofftransportkoeffizient der Komponente i. Dieser stellt ein Maß für die Effizienz des Stofftransportes aus der Gasphase in die Flüssigphase dar und ist von den gegebenen Prozessbedingungen, v.a. vom Leistungseintrag, der Leerrohrgeschwindigkeit sowie dem Oberflächen/Volumen-Verhältnis der Gasblasen, abhängig. Das treibende Konzentrationsgefälle über die laminare Grenzschicht ist die Differenz der Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche $c_{i,l}^*$ und der Gelöstkonzentration in der flüssigen Kernströmung $c_{i,l}$ (Christen, 2005).

$$MTR = \dot{n} \cdot V_R^{-1} = k_La_i \cdot (c_{i,l}^* - c_{i,l}) \qquad 3.28$$

MTR	Massentransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
k_La_i	volumenbezogener Stofftransportkoeffizient der Komponente i, h^{-1}
$c_{i,l}^*$	gasseitige Gleichgewichtskonzentration der Komponente i, mol L^{-1}
$c_{i,l}$	Gelöstkonzentration der Komponente i in der Kernströmung, mol L^{-1}

Die flüssigkeitsseitige Gleichgewichtskonzentration $c_{i,l}^*$ steht wiederum im thermodynamischen Gleichgewicht zum gasseitigen Gleichgewichtspartialdruck p_i^*. Aufgrund des vernachlässigbaren Transportwiderstandes der gasseitigen Grenzschicht kann dieser jedoch näherungsweise dem Partialdruck p_i im Kern der Gasphase gleichgesetzt werden, wodurch sich die flüssigkeitsseitige Gleichgewichtskonzentration $c_{i,l}^*$ anhand des gasseitigen

Partialdrucks p_i mit dem temperaturabhängigen Henry-Koeffizienten He_i für die Komponente i über das Henrysche Gesetz (Gleichung 3.29) bestimmen lässt.

$$c_{i,l}^{*} = He_i \cdot p_i \qquad 3.29$$

He_i	Henry-Koeffizient der Komponente i, mol L^{-1} $mbar^{-1}$
p_i	Partialdruck der Komponente i in der Gasphase, mbar

In dieser Arbeit werden die Gase H_2, CO_2 sowie CO verwendet. Für diese Gase sind die Transferraten analog der allgemeinen Massentransferrate definiert (Gleichungen 3.30 bis 3.32).

$$HTR = k_L a_{H_2} \cdot (c_{H_2,l}^{*} - c_{H_2,l}) \qquad 3.30$$

$$CTR = k_L a_{CO_2} \cdot (c_{CO_2,l}^{*} - c_{CO_2,l}) \qquad 3.31$$

$$COTR = k_L a_{CO} \cdot (c_{CO,l}^{*} - c_{CO,l}) \qquad 3.32$$

HTR	Wasserstofftransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
CTR	Kohlenstoffdioxidtransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
COTR	Kohlenstoffmonoxidtransferrate, mol L^{-1} h^{-1}

4 Material und Methoden

4.1 Anaerobtechnik

Für die sauerstoffsensitiven Enzyme strikt anaerober Mikroorganismen können bereits Spuren von Sauerstoff toxisch wirken. Da auch *Clostridium aceticum* zu den strikt anaeroben Mikroorganismen zählt musste darauf geachtet werden, dass alle Arbeiten möglichst unter Sauerstoffausschluss stattfanden und lediglich anaerobe Flüssigmedien, welche keinen Gelöstsauerstoff enthielten, verwendet wurden (Hungate, 1976; Willis, 1976).

Alle offenen Arbeiten, welche unter sauerstofffreier Atmosphäre stattfinden mussten, wurden in einer flexiblen Anaerobwerkbank aus Polyvinylchlorid-Folie (Typ A, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) mit interner Umwälzung einer Formiergas-Atmosphäre (N_2/H_2, 19:1) durchgeführt. Das sauerstofffreie Einbringen von Geräten und Material wurde durch zwei Materialschleusen ermöglicht, welche nach dem Befüllen von außen luftdicht verschlossen und mit einer Vakuumpumpe (G608NGX, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) auf 0,3 bar gebracht wurden. Der anschließende Druckausgleich wurde mit Formiergas durchgeführt. Das nahezu vollständige Entfernen von Sauerstoff wurde durch dreimaliges Wiederholen dieses Vorgangs gewährleistet. Etwaiger in die Anaerobwerkbank eingedrungener Sauerstoff wurde mit Hilfe eines Palladium-Katalysators und dem im Formiergas enthaltenen H_2 reduziert. Das Aufrechterhalten eines Wasserstoffgehalts von mindestens 5 % wurde mittels H_2-Analyzer (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) gewährleistet. Um möglichst die Keimfreiheit der Atmosphäre aufrechtzuerhalten war eine HEPA-Filtereinheit in die Anaerobwerkbank integriert. In Abbildung 4.1 ist die verwendete Anaerobwerkbank dargestellt.

Zur Herstellung anaerober Flüssigmedien, Wasser und Stammlösungen wurden diese nach Ansetzen zunächst für 20 min gekocht (Heizpilz U2, Labexchange) um die Gaslöslichkeit herabzusetzen und somit den Gelöstsauerstoffgehalt zu reduzieren. Restlicher Gelöstsauerstoff wurde anschließend durch Begasung der Flüssigkeiten mit Stickstoffgas N_2 in einem Eiswasserbad für mindestens 20 min ausgegast. Anaerobe Flüssigkeiten wurden in beschichteten Anaerobflaschen (Duran protect, Duran Group GmbH, Mainz, Germany) gelagert, welche zur späteren sterilen Entnahme mit Butylgummisepten und Lochkappen (Glasgerätebau Ochs, Laborfachhandel e.K., Bovenden/Lenglern, Deutschland) gasdicht verschlossen und autoklaviert wurden.

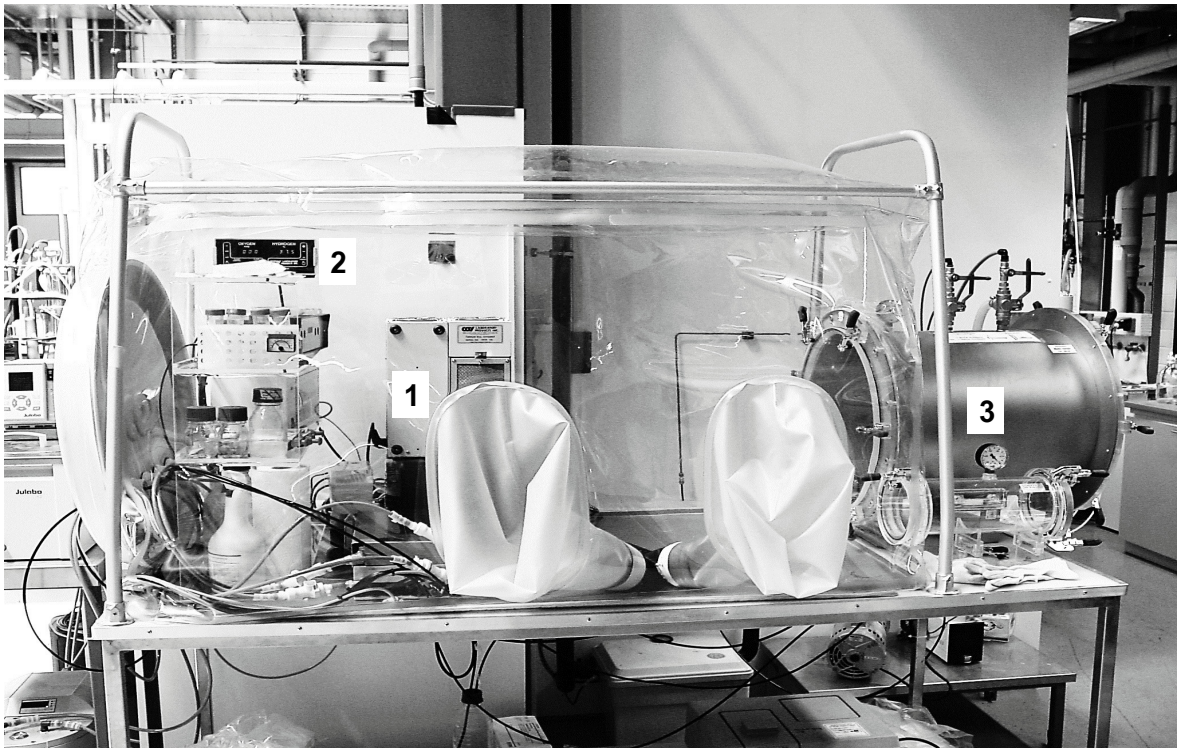

Abbildung 4.1: Anaerobwerkbank mit Polyvinylchlorid-Folie (Typ A, Coy Laboratories Products Inc.). 1) Integrierte Umwälzung mit Palladium-Katalysatoren und HEPA-Filtereinheit; 2) H_2-Analyzer; 3) Materialschleusen.

4.2 Reaktionsmedien

4.2.1 Vitamin-, Spurenelement- und Stammlösungen

Vitaminlösung

Zur Herstellung der verwendeten Vitaminlösung wurde gemäß der Empfehlung der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) die im Anhang in Tabelle A. 1 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Hierzu wurden alle verwendeten Vitamine eingewogen und in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst. Vitaminlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Spurenelementlösung

Zur Herstellung der verwendeten Spurenelementlösung wurde gemäß der Empfehlung der DSMZ die im Anhang in Tabelle A. 2 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Zunächst wurde Nitrilotriessigsäure in VE-Wasser gelöst und der pH mittels KOH auf pH 6,5 eingestellt.

Anschließend wurden alle übrigen Mineralien gelöst, der pH mit KOH final auf pH 7,0 eingestellt und die Spurenelementlösung bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Anaerobe Stammlösungen

Zur Stammhaltung, Zellernte sowie zur Durchführung autotropher reaktionstechnischer Charakterisierungsprozesse wurde anaerobe L-Cys-HCl-Stammlösung (50 g L^{-1}) als Reduktionsmittel, phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *Phosphate buffered saline*, PBS), 80 % Glycerin-Stammlösung sowie D-Fructose-Stammlösung (250 g L^{-1}) benötigt. Die Zusammensetzung für die PBS-Lösung ist im Anhang in Tabelle A. 3 aufgelistet. Für die Herstellung der Stammlösungen wurden die jeweiligen Chemikalien trocken in eine beschichtete Anaerobflasche eingewogen, in die Anaerobwerkbank eingeschleust und in anaerobem VE-Wasser gelöst. Für die 80 % Glycerin-Stammlösung wurde Glycerin abgemessen, in die Anaerobwerkbank eingeschleust und mittels anaerobem VE-Wasser die Endkonzentration eingestellt. Die mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossenen Flaschen wurden anschließend bei 121 °C für 20 min im Standautoklaven (VX-150, Systec GmbH, Linden, Deutschland) sterilisiert und anschließend bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

4.2.2 Vorkulturmedium

Zur Herstellung des Vorkulturmediums wurde gemäß der Empfehlung der DSMZ (Medium 135, *Acetobacterium* Medium) die im Anhang in Tabelle A. 4 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Zunächst wurden alle Komponenten bis auf $NaHCO_3$ und L-Cystein-HCl in VE-Wasser gelöst und wie zuvor beschrieben anaerobisiert. $NaHCO_3$ und L-Cystein-HCl wurden trocken eingewogen, unter anaerober Atmosphäre in der Anaerobwerkbank in dem anaerobisierten Vorkulturmedium gelöst und die entsprechenden Endkonzentrationen durch Auffüllen mit anaerobem VE-Wasser eingestellt. Das Vorkulturmedium wurde in beschichtete, mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossene Anaerobflaschen (250 mL, 1000 mL) zu 50 mL, 100 mL sowie 500 mL aufgeteilt, bei 121 °C für 20 min im Standautoklaven sterilisiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

4.2.3 Prozessmedium

Die Zusammensetzung des vom Vorkulturmedium abgeleiteten und angepassten Prozessmediums, welches für autotrophe reaktionstechnische Charakterisierungsprozesse verwendet wurde, ist im Anhang in Tabelle A. 5 aufgelistet. Im Vergleich zum Vorkulturmedium

wurde die Hefeextraktkonzentration halbiert sowie die Vitamin- und Spurenelement-konzentrationen verdoppelt. Bei Gasfermentationsprozessen mit CO_2 als Kohlenstoffquelle wurde Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) wie angegeben verwendet, während dieses bei Prozessen mit CO, sofern nicht ausdrücklich vermerkt, äquimolar durch Natriumchlorid (NaCl) ersetzt wurde. Weiterhin wurde in einigen Untersuchungen die Natriumkonzentration des Mediums durch Anpassung der NaCl-Konzentration wie angegeben variiert. Alle Komponenten bis auf die Vitaminlösung und L-Cystein-HCl wurden aerob gelöst, in einer beschichteten Anaerobflasche mit Butylgummiseptum und Lochkappe bei 121 °C für 20 min im Standautoklaven sterilisiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Die Vitaminlösung wurde erst vor der Nutzung des Prozessmediums mit Hilfe von sterilen Einmalspritzen (BD Discardit II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) und sterilen Einmalkanülen (Sterican 0.8 x 120 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland) sowie sterilen Spritzenvorsatzfiltern (Minisart-Plus, 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) über das Butylgummiseptum sterilfiltriert zugegeben. Die Anaerobisierung des sterilen Mediums fand erst bei Nutzung im Bioreaktor statt. Die Zugabe des L-Cystein-HCl erfolgte als sterile anaerobe Stammlösung (siehe Abschnitt 4.2.1) erst kurz vor Versuchsstart direkt in den Bioreaktor.

4.2.4 Zulaufmedium

Das für die kontinuierliche Prozessführung benötigte Zulaufmedium hatte dieselbe Zusammensetzung wie das beschriebene Prozessmedium (siehe Tabelle A. 5). Hierbei wurde ebenfalls unterschieden, ob ein Prozess mit CO_2 oder CO betrieben und dementsprechend $NaHCO_3$ oder äquimolar NaCl verwendet wurde. Alle Komponenten wurden aerob gelöst und in einer Laborflasche (5000 mL, GL45, Borosilikatglas, B. Braun, Melsungen, Deutschland) bei 121 °C für 20 min im Standautoklaven sterilisiert. Nach dem Autoklaviervorgang wurde der Flaschendeckel sofort verschlossen. Das sterile Zulaufmedium wurde über eine selbstschließende Schnellverschlusskupplung im Deckel bei gleichzeitiger Kühlung auf Eiswasser für mindestens 4 h mit N_2 anaerobisiert. Zur Vermeidung von Überdruck in der Zulaufmedienflasche war eine weitere Schnellverschlusskupplung im Flaschendeckel geöffnet. Nach Erkalten des Zulaufmediums nach 2 h wurde über eine dritte Schnellverschlusskupplung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Prozesspumpe 501, Watson-Marlow Fluid Technology Group, Falmouth, UK) sterilfiltrierte Vitaminlösung zugepumpt. Nach weiteren 2 h wurde die N_2-Begasung gestoppt, die Abgasleitung der zweiten Schnellverschlusskupplung entfernt und zuletzt das L-Cystein-HCl als anaerobe Stammlösung zugepumpt. Bis zur Nutzung wurde das anaerobe und sterile Zulaufmedium bei 4 °C gelagert.

4.3 Stamm und Stammhaltung

Clostridium aceticum DSM 1496 wurde als gefriergetrockneter Wildtypstamm von der DSMZ bezogen und heterotroph mit dem in Abschnitt 4.2.2 beschriebenem Vorkulturmedium reaktiviert. Hierzu wurde die Ampulle mit Lyophilisat in der Anaerobwerkbank geöffnet, mit anaerobem heterotrophem Vorkulturmedium mit 10 % D-Fructose gelöst und in zuvor sterilisierten und anaerobisierten Hungate-Kulturröhrchen (Hungate Anaerobic, Chemglass Life Sciences, Vineland, USA) bei 30 °C im Brutschrank (INB200, Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert.

Die Identifikation und Vorhersage von Enzymen und Proteinen basierte auf der vollständigen Genomsequenzierung von *C. aceticum* sowie den Annotationen der KEGG-Datenbank* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa et al., 2016; Poehlein et al., 2015).

4.3.1 Heterotrophe Stammhaltung

Nach der heterotrophen Reaktivierung des Stammes *C. aceticum* DSM1496 wurde eine Charge Master-Kryokultur angefertigt, welche für alle Untersuchungen verwendet wurde um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Hierzu wurden 5 mL der reaktivierten *C. aceticum*-Suspension mittels Einmalspritze und -Kanüle steril in 500 mL heterotrophes Vorkulturmedium mit 10 % anaerober D-Fructose-Stammlösung überführt und bei 30 °C bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase ungeschüttelt im Brutschrank inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von etwa 0,4, gemessen im Einstrahlphotospektrometer (Spectronic Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm, wurde die Vorkultur in die Anaerobwerkbank eingeschleust und die Zellsuspension mit 80 % Glycerinstammlösung versetzt, sodass die Glycerinkonzentration der Suspension 10 % betrug. Diese Suspension wurde anschließend zu je 5 mL auf zuvor sterilisierte und anaerobisierte Hungate-Kulturröhrchen verteilt, welche mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossen bei -80 °C gelagert wurden.

4.3.2 Vorkulturherstellung und Zellernte

Zur Herstellung der heterotrophen Vorkultur wurde ein Hungate-Kulturröhrchen mit Kryokultur bei Raumtemperatur aufgetaut. Je 1 mL der aufgetauten Kryo-Zellsuspension wurde im Dreifachansatz mittels Einmalspritze und -Kanüle steril über das Butylgummiseptum in 50 mL steriles, anaerobes Vorkulturmedium mit 10 % D-Fructose überführt und bei 30 °C im

* http://www.genome.jp/kegg/, letzter Stand: 12.04.2018

Brutschrank für 70 h inkubiert. Um vitale, exponentiell wachsende Zellen für reaktionstechnische Untersuchungen zu erhalten, wurden im Fünffachansatz je 5 mL aus dem ersten Vorkulturschritt in sterile, anaerobe Kultivierungsflaschen mit je 500 mL Vorkulturmedium mit 10 % D-Fructose überführt und für weitere 18 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Für die zweistufige Zellernte wurde die Zellsuspension in der Anaerobwerkbank unter anaerober Atmosphäre zu je 625 mL in zuvor sterilisierte und anaerobisierte Zentrifugenbecher (Centrifuge Bottle 1000 mL, Nalge Company, Rochester, USA) aufgeteilt und in einer Standzentrifuge (Rotixa 50 RS, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) bei 4500 rpm (3620 rcf) für 30 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Unter der anaeroben Atmosphäre der Anaerobwerkbank wurden etwa 60 % des Flüssigkeitsüberstands verworfen. Die verbliebene Zellsuspension wurde zunächst resuspendiert, zu je 45 mL in anaerobe, sterile Zentrifugationsröhrchen (50 mL Falcon, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bei 4500 rpm (3620 rcf) für 20 min bei Raumtemperatur in der Standzentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurde der komplette Flüssigkeitsüberstand in der Anaerobwerkbank verworfen, die Zellpellets mit sterilem, anaerobem PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Die gewonnene konzentrierte Zellsuspension wurde in eine zuvor sterilisierte, anaerobe Laborflasche (100 mL, GL45, Borosilikatglas, Schott AG, Mainz, Deutschland) überführt, mit Butylgummiseptum und Lochkappe luftdicht verschlossen, aus der Anaerobwerkbank ausgeschleust und deren optische Dichte bei 600 nm im Photospektrometer bestimmt. Mit dieser ließ sich das Inokulationsvolumen für reaktionstechnische Untersuchungen berechnen, welches für die reproduzierbare Inokulation mit derselben optischen Dichte benötigt wurde.

4.4 Reaktionstechnische Untersuchungen

Die reaktionstechnischen Untersuchungen fanden sowohl im Parallelansatz als auch im anaeroben, kontrollierten Rührkesselreaktor statt.

4.4.1 Parallelansatz

Für die heterotrophen sowie autotrophen Untersuchungen im Parallelansatz wurden beschichtete Anaerobflaschen verwendet. Diese wurden mit einem Reaktionsvolumen von 100 mL mit sterilem, anaerobem Vorkulturmedium befüllt und waren mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossen. Für heterotrophe Versuche wurde 10 % anaerobe D-Fructose ergänzt. Für autotrophe Untersuchungen wurden die Anaerobflaschen mit der jeweils angegebenen gewünschten Gaszusammensetzung begast, wobei zunächst der Kopfraum der Flaschen für 3 min gespült wurde. Anschließend wurde dreimal ein Druck von 2500 mbar

aufgebaut und wieder auf Umgebungsdruck reduziert. Final wurde, abhängig vom jeweiligen Parallelversuch, ein Druck von 2500 mbar oder 2000 mbar eingestellt. Zur Einstellung des *gas-flüssig*-Gleichgewichtes wurden die begasten Anaerobflaschen für mindestens 10 h bei 30 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator (WiseCube WIS Schüttelinkubator, witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde der pH mittels KOH und HCl eingestellt. Mit Hilfe von sterilen Einmalspritzen und -Kanülen wurden die Anaerobflaschen mit konzentrierter Zellsuspension auf eine Start-Biomassekonzentration von etwa 0,05 g L^{-1} inokuliert. Alle Parallelansätze wurden im Dreifachansatz durchgeführt, bei 30 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und in regelmäßigen Intervallen beprobt.

4.4.2 Satzprozesse im Rührkesselreaktor

Alle reaktionstechnischen Untersuchungen im Satzbetrieb wurden in einem Laborrührkesselreaktor unter chemolithoautotrophen Bedingungen durchgeführt. Der verwendete gasdicht verschlossene Laborrührkesselreaktor aus Glas (Labfors 3, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) hatte ein Nominalvolumen von 2 L und ein Reaktionsvolumen V_R von 1 L. Zur Durchmischung und Gasdispersion wurden zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen) im Abstand von 1,5 cm und 7,0 cm vom unteren Ende der Rührwelle angebracht sowie zur Verbesserung der Strömungseigenschaften drei Strömungsbrecher verwendet. Die Regelung der Medientemperatur und des pH waren über einen Temperaturfühler und einen wassergespeisten Doppelmantel sowie über eine pH-Sonde (405-DPAS-SC-K8S/120, Mettler-Toledo, Columbus, USA) und geregelte Titrationsmittelpumpen möglich. Die Ansteuerung und Regelung aller Parameter des Reaktors sowie die Aufzeichnung aller Daten über die Steuereinheit fand mit der Software IrisNT Pro Balance 5.3 (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) statt. Die kontinuierliche Begasung über eine Sinterfritte unterhalb der Rührwelle wurde über vier unabhängige Massendurchflussregler (F-201CV-500_RGD-33-V, Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) für N_2, H_2, CO_2 und CO zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen ermöglicht. Die Partialdrücke der gasförmigen Substrate CO, CO_2 und H_2 wurden dabei mittels dem Inertgas N_2 wie angegeben eingestellt, wobei stets bei Umgebungsdruck gearbeitet wurde. Zur Vermeidung von Verdunstungseffekten wurde das Abgas nach Durchströmen des Reaktors am Reaktordeckel über einen gekühlten Rückflusskondensator geleitet. Anschließend wurde der Abgasvolumenstrom über eine Flasche mit Trockenmittel (MultiDry, ThoMar OHG, Lütau, Deutschland) sowie einen Abgasfilter (Acro50, Pall Corporation, Port Washington, USA) geleitet. Zur Erfassung des Abgasvolumenstroms wurde das Abgas über einen Massendurchflussmesser (F-111B-1K0-RGD-33-E, Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) geleitet. Die Analyse der Abgaszusammensetzung fand mit einem Micro-Gaschromatographen (490 Micro GC, Agilent

Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland) statt. Eine Fotografie des Versuchsaufbaus sowie der schematische Prozessaufbau sind in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.5 A dargestellt.

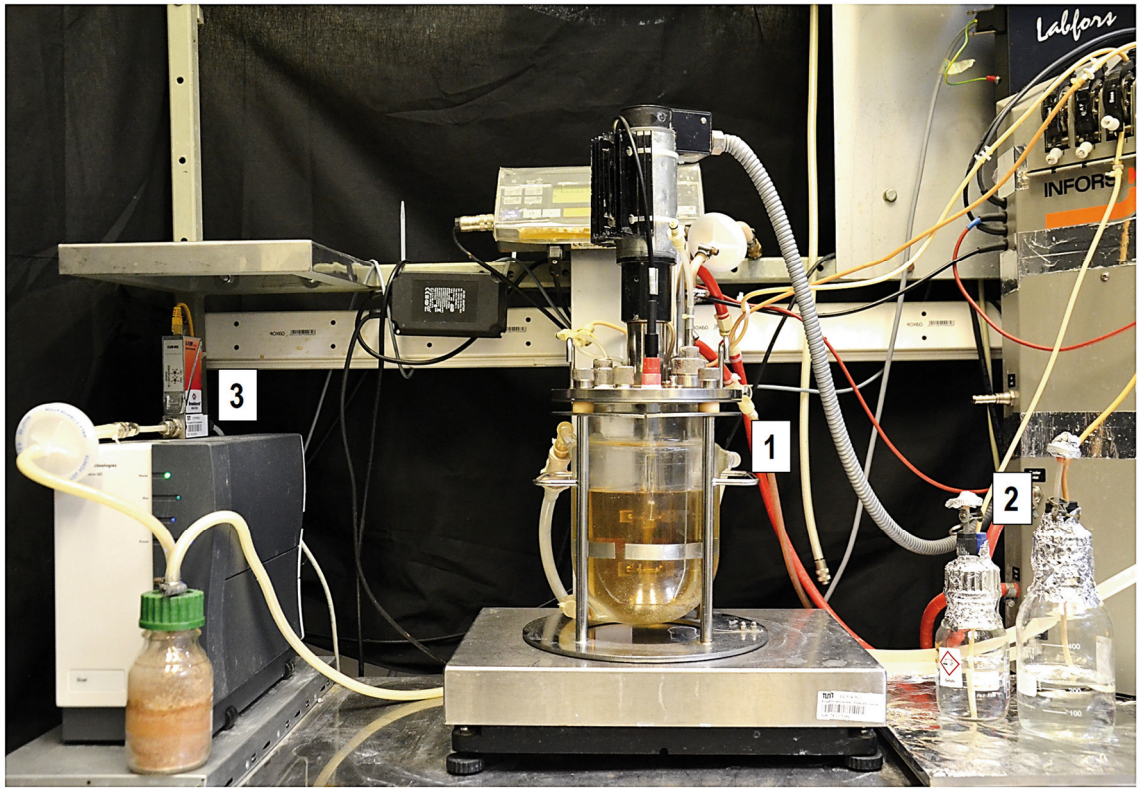

Abbildung 4.2: Allgemeiner Prozessaufbau für reaktionstechnische Charakterisierungsprozesse im autotrophen kontrollierten Rührkesselreaktor im Satzprozess. 1) Laborrührkesselreaktor mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern, Strömungsbrechern, Begasungsfritte zur kontinuierlichen Gaszufuhr, Rückflusskondensator, Temperatur- und pH-Sonde; 2) Steuereinheit mit Titrationsmittelpumpen; 3) Abgasanalytik bestehend aus Schaumfalle mit Trockenmittel, Massendurchflussmesser und Micro-Gaschromatographen.

Rührkesselreaktor und Reaktionsmedium wurden separat im Standautoklaven (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Abkühlung wurde das Reaktionsmedium mit Hilfe einer Peristaltikpumpe steril in den Reaktor überführt und die Vitaminlösung über einen Sterilfilter zugegeben. Zusätzlich wurden 100 µL L^{-1} Antischaummittel Polypropylenglycol (PPG) zugeführt. Zur Sicherstellung anaerober Bedingungen sowie zur Ausbildung des *gas-flüssig*-Gleichgewichtes wurde der Rührkesselreaktor bei einem Gasvolumenstrom von 10 L h^{-1}, entsprechend einer Leerrohrgeschwindigkeit von u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}, und einer Rührerdrehzahl von 1000 rpm beziehungsweise ~6,8 W L^{-1} für mindestens 12 h mit der gewünschten Gaszusammensetzung begast. Der gewünschte pH wurde über die pH-Regelung des

Reaktorsystems durch Titration mit KOH (7 M) und HCl (1 M) final eingestellt. Direkt vor der Inokulation des Reaktors wurden zur Entfernung restlichen Gelöstsauerstoffs 0,5 g L^{-1} des Reduktionsmittels L-Cys-HCl als sterile anaerobe Stammlösung über das Septum im Reaktordeckel zugegeben. Die regelmäßige Probenahme wurde mittels steriler Einmalspritzen und -Kanülen über ein Silikonseptum im Reaktordeckel durchgeführt. Der Reaktor wurde mit der konzentrierten Zellsuspension aus der Vorkultur (siehe Abschnitt 4.3.2) zu einer Biotrockenmassekonzentration von 0,1 g L^{-1} inokuliert. Alle Untersuchungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, geregelt bei 30 °C und pH 8,0 durchgeführt. Der mechanische Leistungseintrag durch Rühren sowie die Gaszusammensetzung wurden für verschiedene Experimente variiert.

Energiemetabolische Untersuchungen

Die Durchführung energiemetabolischer Untersuchungen fand analog des beschriebenen allgemeinen Prozessaufbaus mit einem volumetrischen Leistungseintrag von ~6,8 W L^{-1} (1000 rpm) sowie bei Begasung mit CO als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit einem Eingangspartialdruck $p_{CO,ein}$ von 100 mbar statt. Weiterhin wurden für Entkopplungsexperimente das Na^+-Ionophor *N,N,N,N'*-tetracyclohexyl-1,2-phenylendioxydiacetamid (ETH2120, 60 µM) sowie die Protonophore Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP, 300 µM) und Monensin A (300 µM) jeweils am Ende der exponentiellen Wachstumsphasen nach 22 h sterilfiltriert über das Silikonseptum im Reaktordeckel als ethanolische Lösungen zugeführt. Diese Ionophore, auch Entkoppler genannt, transportieren selektiv Ionen über die Zellmembran und lösen somit ionenspezifisch Konzentrationsgefälle auf.

Inhibierungskinetische Untersuchungen

Alle Untersuchungen zur Ermittlung der inhibitorischen Einflüsse der Substrate CO und H_2 wurden bei einem volumetrischen Leistungseintrag von ~6,8 W L^{-1} (1000 rpm), 30 °C und geregeltem pH 8,0 mit variierenden Partialdrücken für CO $p_{CO,ein}$ sowie H_2 $p_{H2,ein}$ durchgeführt. Zur Bestimmung der korrespondierenden Partialdrücke wurden jeweils die mittleren Partialdrücke $\bar{p}_S$ während der exponentiellen Wachstumsphasen bestimmt.

4.4.3 Kontinuierliche Prozessführung

Chemostat

In kontinuierlichen Prozessen ohne Zellrückhaltung, im sogenannten Chemostaten, wurde der Versuchsaufbau des Satzprozesses um einen Medienzulauf sowie einen Medienablauf erweitert. Über den Medienzulauf wurde mittels einer peristaltischen Pumpe steriles

anaerobes Zulaufmedium (siehe Abschnitt 4.2.4) mit konstanter Verdünnungsrate D zugeführt. Über ein flexibles N_2-Reservoir (Plastigas, Linde AG, Pullach, Deutschland) wurde dabei der Aufbau eines Unterdrucks in der Zulaufmedienflasche verhindert. Weiterhin wurde ein Tauchrohr mit Schnellkupplung zur sterilen kontinuierlichen Förderung des Reaktionsmediums aus dem Reaktor mittels einer Peristaltikpumpe (Reglo Digital, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) verwendet. Die Peristaltikpumpe wurde gravimetrisch geregelt, sodass im Rührkesselreaktor die Volumenkonstanz (± 0,5 %) sichergestellt werden konnte. Eine Fotografie des Versuchsaufbaus sowie der schematische Prozessaufbau sind in Abbildung 4.3 und Abbildung 4.5 B dargestellt.

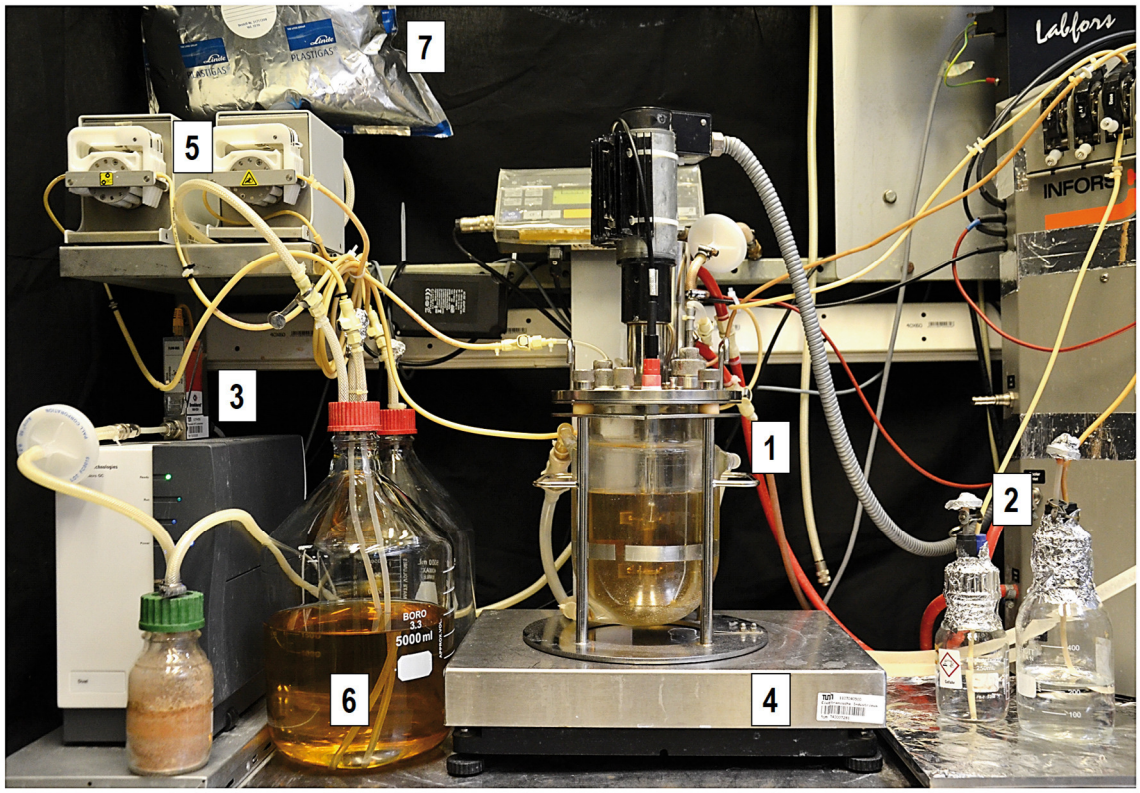

Abbildung 4.3: Allgemeiner Prozessaufbau für reaktionstechnische Charakterisierungsprozesse im autotrophen kontrollierten Rührkesselreaktor für kontinuierliche Prozesse. 1) Laborrührkesselreaktor mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern, Strömungsbrechern, Begasungsfritte zur kontinuierlichen Gaszufuhr, Rückflusskondensator, Temperatur- und pH-Sonde; 2) Steuereinheit mit Titrationsmittelpumpen; 3) Abgasanalytik bestehend aus Schaumfalle mit Trockenmittel, Massendurchflussmesser und Micro-Gaschromatographen; 4) Waage zur gravimetrischen Füllstandsregelung; 5) Peristaltikpumpen zur Medienzu- und -abfuhr; 6) Medienzu- und -ablauf; 7) flexibles N_2-Reservoir zum Druckausgleich des Medienzulaufs.

Membranbioreaktor

Zur kontinuierlichen Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung wurde ein Membranbioreaktor verwendet. Für diesen wurde der Aufbau des kontinuierlichen Betriebs um ein getauchtes Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul erweitert (Kantzow et al., 2015). Dieses Hohlfaser-membranmodul, bestehend aus sechs Polysulfonhohlfasern mit einer Länge von 30 cm, einer durchschnittlichen Porengröße von 0,45 µm und einer spezifischen Membranoberfläche von 75 cm^2 L^{-1} (Start AXM Microfiltration Cross Flow Cartridge CFP-4-E-2U, GE Healthcare, Chalfont St Giles Großbritannien), wurde in einem perforierten Silikonschlauch befestigt und einseitig mittels Zwei-Komponenten-Silikon (TFC Silikon Kautschuk Typ6, Troll Factory, Riede, Deutschland) vollständig abgedichtet. Mittels *Luer-Lock*-Anschluss am anderen Ende des Moduls wurde dieses am Reaktordeckel befestigt und konnte so zur kontinuierlichen Förderung des Reaktionsmediums bei gleichzeitiger Verweilzeitentkopplung der Mikroorganismen über eine gravimetrisch geregelte peristaltische Pumpe im „*Dead-End*"-Modus betrieben werden. Zur Gewährleistung der Sterilität wurde das Membranmodul *in-situ* mit dem Reaktor sterilisiert (121 °C, 20 min). Vor der erneuten Nutzung des Membranmoduls wurde dieses bei 50 °C mit VE-Wasser sowie 0,5 M NaOH bei 1000 rpm für jeweils 1 h gereinigt (Kantzow et al., 2015). Eine Fotografie des Membranbioreaktors sowie der schematische Prozessaufbau sind in Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 C dargestellt.

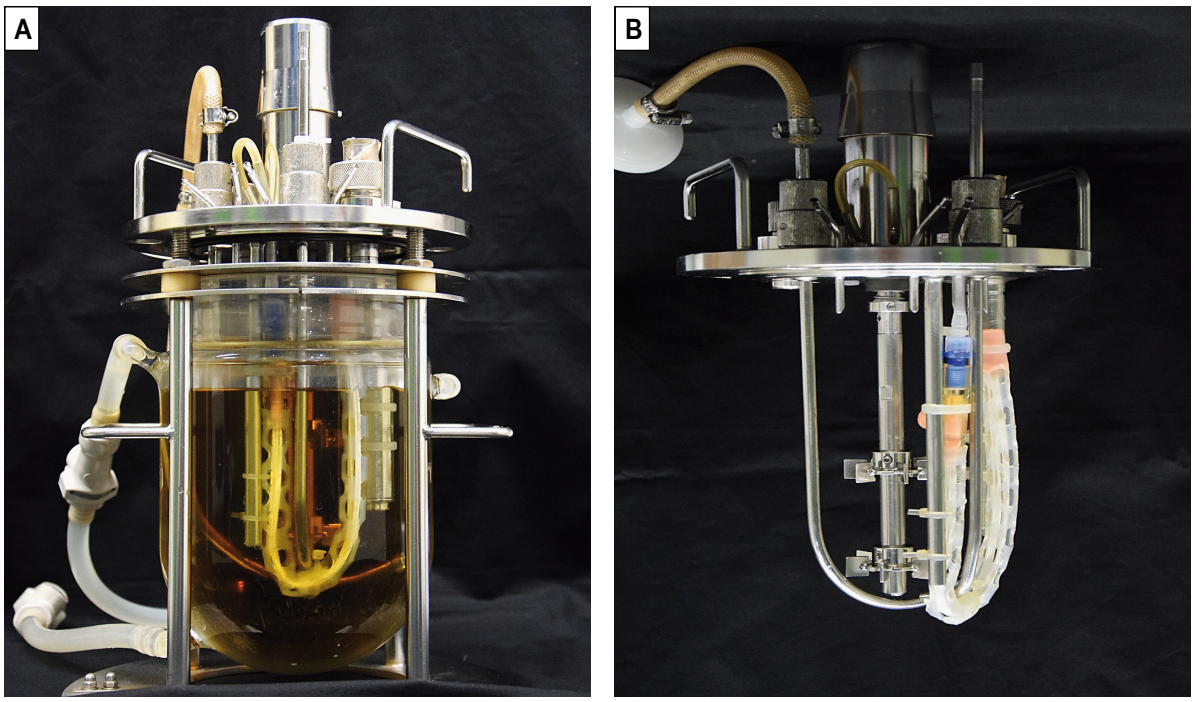

Abbildung 4.4: Membranbioreaktor A) mit getauchtem Mikrofiltrationshohlfasermembranmodul zur totalen Zellrückhaltung im „*Dead-End*"-Modus. B) Befestigung des Hohlfasermembranmoduls am Reaktordeckel mittels *Luer-Lock*-Anschluss. Abbildung nach Kantzow (2015).

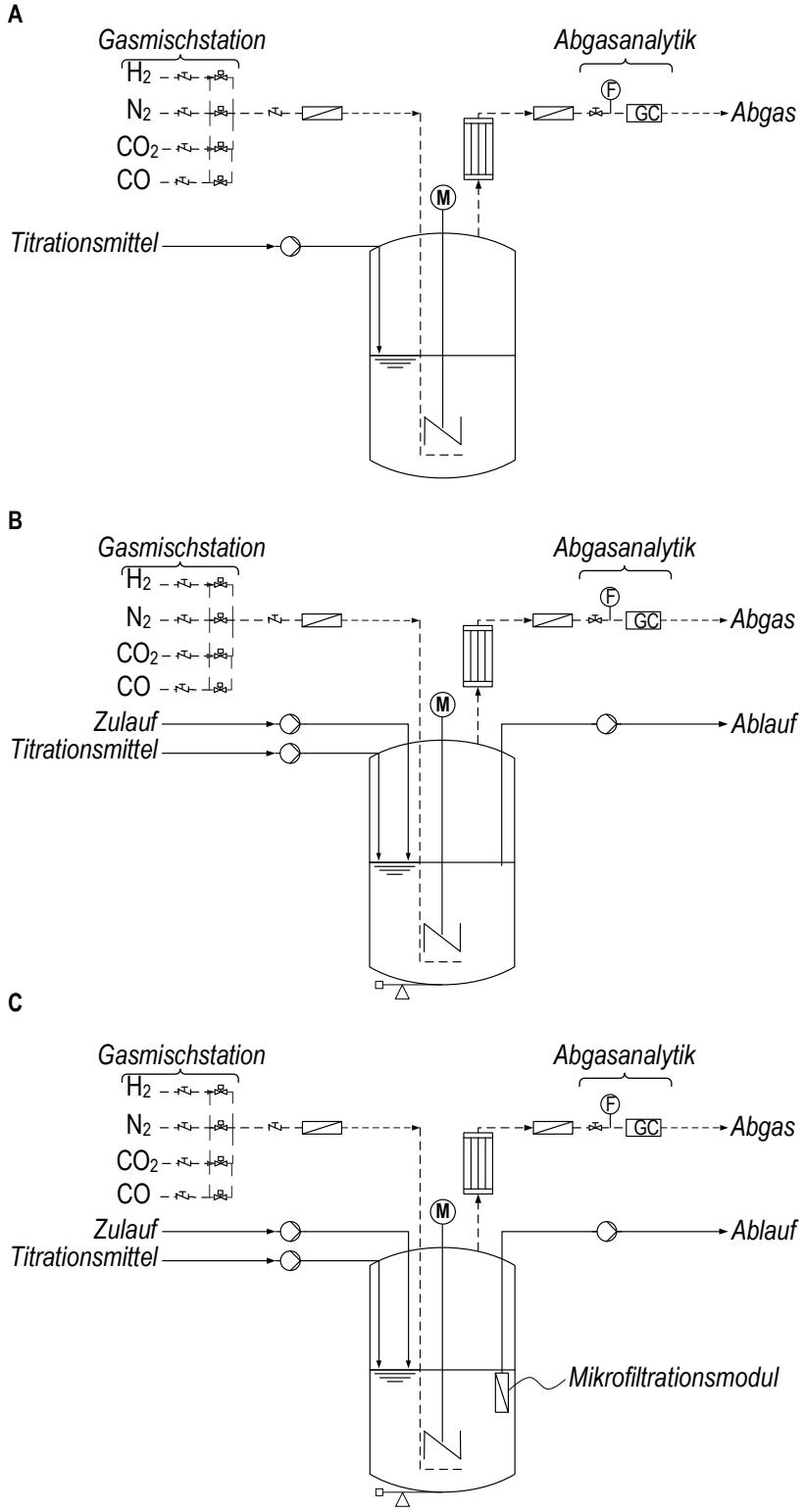

Abbildung 4.5: Schematische Darstellungen der in dieser Arbeit verwendeten Prozesskonfigurationen des kontrollierten autotrophen Rührkesselreaktors für den A: Satzprozess; B: Chemostat, kontinuierlicher Prozess ohne Zellrückhaltung; C: Membranbioreaktor, kontinuierlicher Prozess mit totaler Zellrückhaltung mit getauchtem Mikrofiltrationsmodul. Die Gaszufuhr wurde über vier individuelle Massendurchflussregler für die Gase N_2, H_2, CO_2 und CO ermöglicht. Die Abgasanalytik bestand aus einem Massendurchflussmesser (F) sowie einem Micro-Gaschromatographen (GC). Die Ablaufpumpen in B und C wurden gravimetrisch geregelt. Gasvolumenströme sind durch gestrichelte, Flüssigkeitsvolumenströme durch durchgezogene Linien dargestellt.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Optische Dichte und Biotrockenmassekonzentration

Die optische Dichte OD_{600} von Zellsuspensionen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Einstrahlphotospektrometer (Spectronic Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Durch Verdünnen mit PBS-Puffer wurden die erhaltenen Messwerte im linearen Bereich des Photometers gehalten ($OD_{600} \leq 0{,}3$).

Optische Dichte und Biotrockenmassekonzentrationen c_X (BTM) korrelieren im linearen Bereich, weshalb die Biotrockenmassekonzentration mittels bestimmtem Korrelationsfaktor f_X aus den gemessenen optischen Dichten gemäß Gleichung 4.1 berechnet werden konnte. Zur Bestimmung des OD_{600}-BTM-Korrelationsfaktors f_X wurde eine heterotrophe Vorkultur der späten exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation und Verwerfen des flüssigen Überstandes auf eine optische Dichte von 12 konzentriert. Von dieser Zellsuspension wurde durch Verdünnen mit PBS eine zwölfstufige Verdünnungsreihe erstellt, wobei von jeder Verdünnungsstufe die optische Dichte und die Biotrockenmassekonzentration im Dreifachansatz vermessen wurden. Die Biotrockenmassekonzentrationsbestimmung erfolgte dabei gravimetrisch durch Zentrifugation von je 2 mL Zellsuspension in zuvor getrockneten und gewogenen Reaktionsgefäßen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Mikro 20, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) wurde der flüssige Überstand verworfen, das Reaktionsgefäß bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C für 48 h im Trockenschrank getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt. Durch lineare Korrelation der optischen Dichten mit den bestimmten Trockenkonzentrationen ergab sich für *Clostridium aceticum* ein OD_{600}-BTM-Korrelationsfaktor von 0,57 g L^{-1} OD_{600}^{-1}.

$$c_X = f_X \cdot OD_{600} \qquad 4.1$$

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

4.5.2 Produktanalytik

Die Quantifizierung der im Reaktionsmedium akkumulierten Metabolite Acetat, Formiat und Ethanol wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Um die Zellen der Zellsuspension zu entfernen wurde die zu analysierende Probe zunächst über

einen Sterilfilter (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, Chromafil RC-20/15 MS, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland) in eine Rollrandflasche überführt, welche mit einer Bördelkappe verschlossen und bis zur Quantifizierung bei 4 °C gelagert wurde.

Zur Quantifizierung wurde ein Finnigan Surveyor HPLC-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet, welches mit einem Brechungsindexdetektor (RI-Detektor) ausgestattet war. Die Probenauftrennung erfolgte mit einer Aminex-HPX-87H Ionenaustauschsäule mit vorgeschalteter Micro-Guard CationH Cartridge Vorsäule (Biorad, München, Deutschland) bei 60 °C. Das Laufmittel Schwefelsäure (5 mM) wurde dabei mit einer Flussrate von 0,6 mL min^{-1} als mobile Phase eingesetzt. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 10 µL. Über externe Standards wurden die integrierten Peakflächen den jeweiligen Metaboliten zugeordnet und die jeweiligen Produktkonzentrationen berechnet.

4.5.3 Abgasanalytik

Zur Bestimmung der Substrataufnahmeraten und zur Erstellung von Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen wurde eine Abgasanalytik durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der volumetrische Abgasvolumenstrom $\dot{V}_{g,aus}$ mittels Massendurchflussmesser (F-111B-1K0-RGD-33-E, Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) bestimmt, welcher auf das Trägergas N_2 kalibriert war. Da das Abgas jedoch neben N_2 auch H_2, CO_2 und CO enthielt, musste der vom Massendurchflussmesser MFM ausgegebene Gasvolumenstrom $\dot{V}_{MFM}$ mittels Mischgaskonversionsfaktor MGK gemäß Gleichung 4.2 korrigiert werden.

$$\dot{V}_{g,aus} = \dot{V}_{MFM} \cdot MGK \qquad 4.2$$

$\dot{V}_{g,aus}$ Abgasvolumenstrom, L h^{-1}

$\dot{V}_{MFM}$ Gasvolumenstrom des MFM, L h^{-1}

MGK Mischgaskonversionsfaktor, -

Der Mischgaskonversionsfaktor wiederum war abhängig von der jeweiligen Gaszusammensetzung und wurde gemäß Gleichung 4.3 aus dem Volumenanteil y_S eines Gases S sowie dem für jedes Gas spezifischen Gaskonversionsfaktor $G_{f,S}$ bestimmt. Der Gaskonversionsfaktor wurde für jedes Reinstgas empirisch durch Korrelation zwischen eingestelltem Gasvolumenstrom über den jeweiligen Massendurchflussregler und ausgegebenem Gasvolumenstrom mittels Massendurchflussmesser ermittelt.

$$MGK = 100 \cdot (\Sigma y_S \cdot G_{f,S})^{-1} \quad 4.3$$

y_S Volumenanteil der Gaskomponente S, %

$G_{f,S}$ Gaskonversionsfaktor der Gaskomponente S, %

Zur Ermittlung der Abgaszusammensetzung und somit der Volumenanteile y_S beziehungsweise der Partialdrücke p_S der jeweiligen Gaskomponente S wurde ein Micro-Gaschromatograph (490 Micro GC, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die quantitative Gaszusammensetzung wurde dabei mit einer 1 m Cox HI-Säule bei 80 °C sowie einer 5CB 8 m HI-Säule bei 40 °C mit Hilfe eines Thermalleitfähigkeitsdetektors bestimmt. Durch Kalibrierung mit den zu quantifizierenden Gasen H_2, CO_2 und CO bei definierten Zusammensetzungen konnten die ermittelten Peakflächen der jeweiligen Gase in Volumenanteile umgerechnet werden. Durch regelmäßige Probenahmeintervalle während des Prozesses (Δt = 5 min) wurde laufend die Gaszusammensetzung ermittelt und hiermit der aktuelle Mischgaskonversionsfaktor berechnet. Die Berechnung der volumetrischen Gasaufnahmeraten r_S des jeweiligen Gases S erfolgte dabei aus der Differenz der molaren Eingangs- und Abgasvolumenströme gemäß Gleichung 4.4. Aufgrund dieser Definition stellten positive Raten $r_S > 0$ Aufnahmeraten dar, während negative Raten $r_S < 0$ die Bildung beziehungsweise Freisetzung des jeweiligen Gases S darstellten und folglich als Bildungsraten bezeichnet wurden. Hierdurch konnten die jeweiligen volumetrischen Gasaufnahme- und Bildungsraten r_{CO}, r_{CO_2} und r_{H_2} bestimmt werden.

$$r_S = (\dot{V}_{g,ein} \cdot p_{S,ein} - \dot{V}_{g,aus} \cdot p_S)\,(V_R \cdot R \cdot T)^{-1} \quad 4.4$$

r_S volumetrische Gasaufnahmerate, mol L^{-1} h^{-1}

$\dot{V}_{g,ein}$ Gaseingangsvolumenstrom, L h^{-1}

$\dot{V}_{g,aus}$ Abgasvolumenstrom, L h^{-1}

$p_{S,ein}$ Eingangspartialdruck Gas S, mbar

p_S Partialdruck Gas S, mbar

V_R Reaktionsvolumen, L

R universelle Gaskonstante: 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T Prozesstemperatur, K

Die integralen Kohlenstoff- und Energiebilanzen wurden durch Berechnung der aufgenommenen Kohlenstoff- und Elektronenmengen aus den Gasen sowie der in Biomasse und den gebildeten Produkten Acetat, Formiat und Ethanol fixierten Kohlenstoff- und Elektronenmengen gebildet. Zur Berechnung der Wiederfindung des fixierten Kohlenstoffs sowie der fixierten Elektronen z_i in den gebildeten Produkten m_i aus den verbrauchten Substraten m_j mit ihren molaren Kohlenstoff- und Elektronenanteilen z_j gilt Gleichung 4.5. Dabei wurde durch Elementaranalyse für die Biotrockenmasse von *C. aceticum* sowie für den im Reaktionsmedium enthaltenen Hefeextrakt ein Kohlenstoffanteil von ~0,4 $mol_C\ g^{-1}$ ermittelt.

$$\text{Wiederfindung} = (\Sigma\, m_i \cdot z_i)\,(\Sigma\, m_j \cdot z_j)^{-1} \qquad 4.5$$

m_i	Menge gebildetes Produkt i, g
m_j	Menge aufgenommenes Substrat j, g
z_i	Kohlenstoff- oder Elektronenanteil des Produkts i, $mol_C\ g^{-1}$
z_j	Kohlenstoff- oder Elektronenanteil des Substrats j, $mol_C\ g^{-1}$

Der Elektronenanteil pro mol Kohlenstoff einer Komponente wurde über den Reduktionsgrad κ bestimmt. Dieser ist definiert als die Molzahl Elektronen, welche zur vollständigen Oxidation pro Mol Kohlenstoff benötigt wird und setzt sich aus den Äquivalentmolzahlen der einzelnen Elemente einer Komponente zusammen. Die Äquivalentmolzahlen für die Elemente C, H, O und N sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Äquivalentmolzahlen der Elemente C, H, O und N.

Element	**Äquivalentmolzahl**
C	+4
H	+1
O	-2
N	-3 (bei NH_3 als N-Quelle)

Der auf ein Mol Kohlenstoff mol_C normierte Reduktionsgrad einer Komponente bestehend aus diesen Elementen $\kappa_{C_1H_bO_cN_d}$ ergibt sich daher gemäß Gleichung 4.6.

$$\kappa_{C_1H_bO_cN_d} = 4 + b - 2\,c - 3\,d \qquad 4.6$$

4.5.4 Bestimmung zellspezifischer Raten

Um Auswirkungen verschiedener Prozessbedingungen auf *C. aceticum* vergleichen zu können wurden die spezifischen Wachstums- und Produktbildungsraten bestimmt. Durch exponentielle Regression der im idealen Rührkesselreaktor offline gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen c_X als Funktion der Prozesszeit t (Gleichung 4.7) wurden die spezifischen Wachstumsraten μ gemäß Gleichung 4.8 nach dem Differenzenverfahren erster Ordnung mit dem Zeitintervall $\Delta t = 360$ s ermittelt, wobei sich für Satzprozesse die Verdünnungsrate zu $D = 0$ ergab. Aufgrund der Verweilzeitentkopplung bei totaler Zellrückhaltung ergab sich im Membranbioreaktor für die Biomasse X ebenfalls $D = 0$.

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \qquad 4.7$$

$$\mu = c_X^{-1} \cdot dc_X \cdot dt^{-1} + D \qquad 4.8$$

Unter der Annahme einer wachstumsassoziierten Produktbildung wurde im Satzverfahren durch lineare Regression zwischen der Biotrockenmassekonzentration c_X und der Acetatkonzentration c_{Acetat} während der exponentiellen Wachstumsphase der produktspezifische Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,Acetat}$ nach Gleichung 3.11 als Verhältnis der volumetrischen Wachstums- und Acetatbildungsrate ($Y_{X,Acetat} = r_X \cdot r_{Acetat}^{-1}$) nach dem Differenzenverfahren bestimmt. Analog wurde über die über den Gesamtprozess integral aufgenommenen Mengen an Kohlenstoff m_C die Bestimmung der integralen substratspezifischen Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten $Y_{X,C}$ ($m_X \cdot m_C^{-1}$) und $Y_{Acetat,C}$ ($m_{Acetat} \cdot m_C^{-1}$) durchgeführt.

Durch nichtlineare Regression mittels sigmoidaler Ausgleichfunktion konnten die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen c_X und c_P als Funktion der Prozesszeit t abgeschätzt werden. Mit Hilfe dieser Regressionen wurden anschließend die volumetrischen und zellspezifischen Produktbildungsraten über Differenzenapproximation erster Ordnung mit Zeitintervallen $\Delta t = 360$ s gemäß Gleichung 4.9 und 4.10 abgeschätzt.

$$r_P = dc_P \cdot dt^{-1} + D \cdot c_P \qquad 4.9$$

$$q_P = c_X^{-1} \cdot r_P \qquad 4.10$$

4.5.5 Identifikation der Substratüberschussinhibierungskinetik

Da keine Möglichkeit zur Bestimmung der Gelöstkonzentrationen der Substrate CO und H_2 im Reaktionsmedium bestand wurden für die Bestimmung der Substratüberschussinhibierungskinetik nach dem Modell von Andrews (siehe Abschnitt 3.4.1) für die Substratkonzentrationen c_S die korrespondierenden mittleren CO- und H_2-Partialdrücke $\bar{p}_S$ und $\bar{p}_{H_2}$, welche mittels Micro-Gaschromatograph als arithmetisches Mittel während der exponentiellen Wachstumsphasen bestimmt wurden, verwendet. Die Identifikation der formalkinetischen Parameter μ_{max}, K_S und K_I erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse der Inhibierungskinetik gemäß Gleichung 4.11 mit der Curve Fitting Toolbox 3.5.5 und dem Trust-Region-Algorithmus (Matlab R2017a 9.2.0.556344, The MathWorks, Inc., Natick, USA). Für die optimale Substratkonzentration $c_{S,opt}$ ergab sich dementsprechend ein optimaler Substratpartialdruck $p_{S,opt}$ gemäß Gleichung 4.12. Mit dem optimalen Substratpartialdruck wurde ferner die optimale Wachstumsrate μ_{opt} nach Gleichung 4.13 bestimmt. Weiterhin wurden mit dem zuvor in unabhängigen Satzprozessen während der exponentiellen Wachstumsphase ermittelten produktspezifischen Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X,Acetat}$ die abgeleiteten Zustandsgrößen $q_{Acetat,max}$ und $q_{Acetat,opt}$ gemäß den Gleichungen 4.14 und 4.15 bestimmt.

$$\mu = (\mu_{max} \cdot \bar{p}_S) \cdot (\bar{p}_S + K_S + \bar{p}_S^2 \cdot K_I^{-1})^{-1} \qquad 4.11$$

$$p_{S,opt} = (K_S \cdot K_I)^{0,5} \qquad 4.12$$

$$\mu_{opt} = (\mu_{max} \cdot p_{S,opt}) \cdot (p_{S,opt} + K_S + p_{S,opt}^2 \cdot K_I^{-1})^{-1} \qquad 4.13$$

$$q_{Acetat,max} = \mu_{max} \cdot Y_{X,Acetat}^{-1} \qquad 4.14$$

$$q_{Acetat,opt} = \mu_{opt} \cdot Y_{X,Acetat}^{-1} \qquad 4.15$$

$\bar{p}_S$	mittlerer CO- oder H_2-Partialdruck, mbar
$p_{S,opt}$	optimaler CO- oder H_2-Partialdruck, mbar
μ_{opt}	optimale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
$q_{Acetat,max}$	maximale zellspezifische Acetatbildungsrate, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$
$q_{Acetat,opt}$	optimale zellspezifische Acetatbildungsrate, $g\ g^{-1}\ h^{-1}$

5 Voruntersuchungen

In anaeroben Parallelansätzen in begasten Anaerobflaschen sowie im kontrollierten Rührkesselreaktor sollten in Voruntersuchungen zunächst geeignete Prozessbedingungen (Medienzusammensetzung, Prozesstemperatur und pH) für die nachfolgenden reaktionstechnischen Untersuchungen im kontinuierlich begasten und kontrollierten Rührkesselreaktor identifiziert werden.

5.1 Medium

5.1.1 Vitamine und Spurenelemente

Zur Untersuchung des Einflusses von Vitaminen und Spurenelementen wurden im anaeroben Parallelansatz (siehe Abschnitt 4.4.1) unter autotrophen Bedingungen (CO_2/H_2, 1:2) die Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen variiert. Dabei wurde bezogen auf die Zusammensetzung des Vorkulturmediums gemäß der DSMZ mit einfach konzentrierten Spurenelement- und Vitaminkonzentrationen (SV) gearbeitet, die Vitamin- und Spurenelementkonzentration (SSVV) sowie jeweils entweder die Spurenelement- (SSV) oder die Vitaminkonzentration (SVV) verdoppelt. Alle parallelen Flaschenkultivierungen wurden bei initialen pH_0 = 8,0 bei 100 rpm im Schüttelinkubator bei 30 °C, einer anfänglichen Gaszusammensetzung von $p_{CO2,0}$ = 830 mbar und $p_{H2,0}$ = 1670 mbar sowie mit einer initialen Biotrockenmassekonzentration $c_{X,0}$ = 0,05 g L^{-1} gestartet. Die vergleichenden Verläufe der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) sind in Abbildung 5.1 und die aus den ersten 22 h ermittelten Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen in Abbildung 5.2 dargestellt.

In den ersten 22 h zeigten alle Flaschenansätze vergleichbare Biotrockenmasse-konzentrationen, wobei diese von 0,05 g L^{-1} auf ~0,26 g L^{-1} stiegen. Die Wachstumsraten während dieser exponentiellen Wachstumsphasen lagen zwischen 0,07 h^{-1} und 0,08 h^{-1}, wobei durch die Variation der Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. Im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase unterschieden sich die Biotrockenmassekonzentrationen jedoch zunehmend voneinander, wobei bei einfacher Spurenelement- und Vitaminkonzentration (SV) nach 46 h eine maximale Biotrockenmassekonzentration BTM_{max} von 0,33 g L^{-1} erreicht wurde, welche anschließend auf 0,28 g L^{-1} absank. Bei einfach konzentrierter Spurenelement- und verdoppelter Vitaminkonzentration (SVV) wurde nach 54 h eine BTM_{max} von 0,34 g L^{-1} erreicht, welche bis

Prozessende nach 76 h auf 0,30 g L^{-1} absank. Die Biotrockenmassekonzentrationen mit jeweils verdoppelter Spurenelementkonzentration SSVV und SSV verliefen nahezu identisch und zeigten maximale Biotrockenmassekonzentrationen BTM_{max} von 0,37 g L^{-1} nach 69 h, welche lediglich auf 0,36 g L^{-1} absanken.

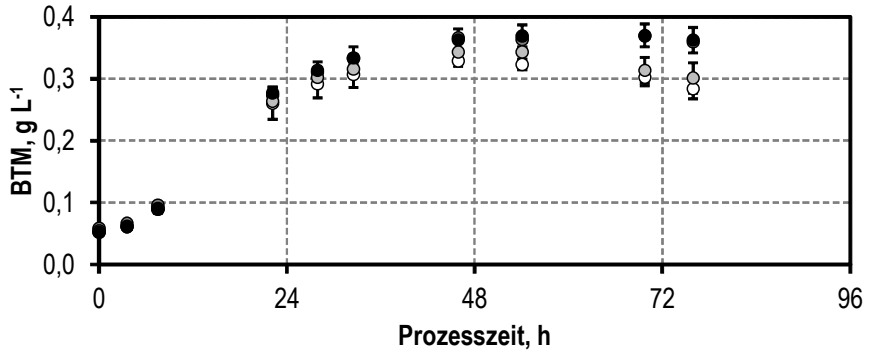

Abbildung 5.1: Vergleich der Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) in autotrophen Dreifachansätzen in begasten Anaerobflaschen mit *C. aceticum* mit variierten Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen über der Prozesszeit. Vitamin- (V) und Spurenelementkonzentrationen (S) bezogen auf die Zusammensetzung des Vorkulturmediums: Weiß (○): S: 1x, V: 1x (SV); Schwarz (●): S: 2x, V: 2x (SSVV); Hellgrau (●): S: 1x, V: 2x (SVV); Dunkelgrau (●): S: 2x, V: 1x (SSV) (T = 30 °C; 100 rpm; pH_0 = 8,0; $p_{CO_2,0}$ = 830 mbar; $p_{H_2,0}$ = 1670 mbar).

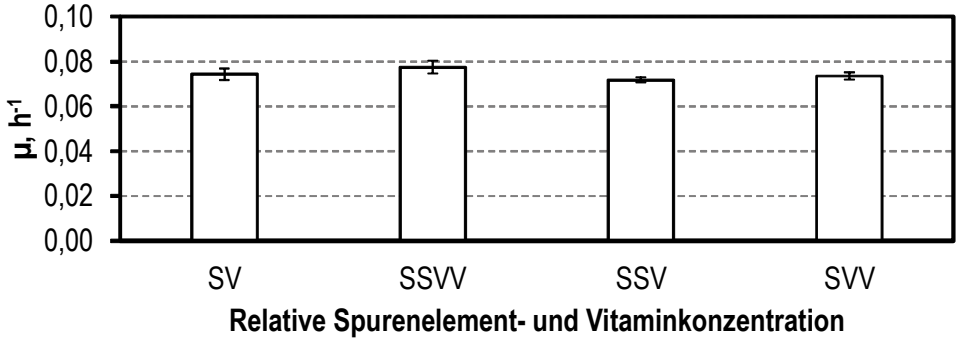

Abbildung 5.2: Vergleich der spezifischen Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen in autotrophen Dreifachansätzen in begasten Anaerobflaschen mit *C. aceticum* mit variierten Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen. Relative Vitamin- (V) und Spurenelementkonzentrationen (S) bezogen auf die Zusammensetzung des Vorkulturmediums: S: 1x, V: 1x (SV); S: 2x, V: 2x (SSVV); S: 2x, V: 1x (SSV); S: 1x, V: 2x (SVV) (T = 30 °C; 100 rpm; pH_0 8,0; $p_{CO_2,0}$ = 830 mbar; $p_{H_2,0}$ = 1670 mbar).

Diskussion

Der Zusatz von Vitaminen und Spurenelementen im Reaktionsmedium ist für viele Acetogene essentiell, da diese als Cofaktoren oder Vorläufermoleküle für zentrale Stoffwechselenzyme benötigt werden. Beispielsweise dient das B-Vitamin Pantothensäure als Vorläufermolekül beim Aufbau von Coenzym A, welches im reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg eine wichtige Rolle bei der Synthese von Acetyl-CoA einnimmt (Smith & Song, 1996). Als weiteres wichtiges Vitamin ist Cyanocobalamin für die Funktion der Cobalamin-abhängigen Methyl-Transferase essentiell, wobei für *C. aceticum* ebenso Biotin, Pantothensäure und Pyridoxin sowie dessen Derivat Pyridoxamin als essentiell beschrieben sind (Das et al., 2007; Karlsson et al., 1948; Ragsdale, 2008).

Neben den Vitaminen sind insbesondere metallische Cofaktoren für die Metalloenzyme des Acetyl-CoA-Stoffwechselweges als Spurenelemente von entscheidender Bedeutung. Konzentrationserhöhungen der essentiellen Spurenelemente, zu denen insbesondere Nickel, Eisen, Wolfram, Selen und Zink gehören, führen bei acetogenen Mikroorganismen oft zu erhöhten Biomasse- und Produktkonzentrationen (Ragsdale et al., 1983; Ragsdale & Pierce, 2008; Yamamoto et al., 1983). Andererseits ist ebenfalls bekannt, dass sich durch Elimination gewisser Spurenelemente stammspezifisch das Produktspektrum verschieben lässt, was sich jedoch meist auch negativ auf das Wachstum auswirkt (Ramió-Pujol et al., 2015; Saxena & Tanner, 2011). Die Erhöhung der Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen für *C. aceticum* im autotrophen Parallelansatz zeigte keine signifikante Steigerung der ermittelten Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen. Jedoch kann festgehalten werden, dass sich die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen durch Verdopplung der Spurenelementkonzentrationen leicht erhöhen ließen und die stationären Phasen verlängert werden konnten. Dies könnte daraus resultieren, dass essentielle Vitamine bei höheren Biotrockenmassekonzentrationen noch in größerer Menge verfügbar waren. Unter Berücksichtigung der erwarteten weitaus höheren Zelldichten werden die Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen im Reaktionsmedium für reaktionstechnische Charakterisierungsprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor folglich verdoppelt um deren Limitierung zu vermeiden.

5.1.2 Hefeextrakt

Um autotrophe Gasfermentationsprozesse reaktionstechnisch charakterisieren und Änderungen der Prozessparameter richtig interpretieren zu können, ist es wichtig zu wissen, welche Effekte die Medienbestandteile auf die Mikroorganismen ausüben. Hierbei spielen insbesondere Komplexmedienbestandteile eine bedeutende Rolle. Da ebenfalls nicht bekannt

ist, welche Supplemente aus den Komplexbestandteilen von den Mikroorganismen metabolisiert werden, wurde der Einfluss des einzigen Komplexbestandteils im Reaktionsmedium Hefeextrakt im Parallelansatz unter autotrophen Bedingungen (CO/N_2, 1:4) untersucht. Dabei wurde die Hefeextraktkonzentration im Reaktionsmedium zwischen 0 g L^{-1} und 4 g L^{-1} variiert. Alle parallelen Flaschenkultivierungen wurden bei initialen pH_0 = 8,0 und 30 °C bei 100 rpm im Schüttelinkubator, einem anfänglichen CO-Partialdruck von $p_{CO,0}$ = 400 mbar sowie mit einer initialen Biotrockenmassekonzentration $c_{X,0}$ = 0,05 g L^{-1} durchgeführt. Die spezifischen Wachstumsraten μ, welche während der exponentiellen Wachstumsphasen in den ersten 7 h bestimmt wurden, sowie die maximal erzielten Biotrockenmassekonzentrationen BTM_{max} sind vergleichend in Abbildung 5.3 dargestellt.

Weiterhin wurde in einem autotrophen CO_2/H_2-Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor bei kontrolliertem pH 8,0 und T = 30 °C, einem volumetrischen Leistungseintrag P V^{-1} = 0,4 W L^{-1} (400 rpm) und kontinuierlicher Begasung mit $p_{CO2,ein}$ = 120 mbar, $p_{H2,ein}$ = 480 mbar, $p_{N2,ein}$ = 400 mbar und einer Gasleerrohrgeschwindigkeit von u = 2,4 10^{-4} m s^{-1} der Einfluss von definiertem Reaktionsmedium ohne den Zusatz von Hefeextrakt untersucht. Die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM), der Acetatkonzentration sowie der CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO_2}, r_{H_2}) dieser Untersuchung sind in Abbildung 5.4 A und B dargestellt.

Parallelansatz

Bei definiertem Reaktionsmedium (0,0 g L^{-1} Hefeextrakt) konnte innerhalb der ersten 72 h im Parallelansatz kein Biomassewachstum festgestellt werden, weswegen sich eine spezifische Wachstumsrate von μ = 0 h^{-1} ergab. Die maximale Biotrockenmassekonzentration betrug dabei 0,05 g L^{-1} und entsprach damit der initialen Konzentration nach Inokulation. Bei Zugabe von mindestens 0,5 g L^{-1} Hefeextrakt war keine Verzögerungsphase mehr feststellbar. Bei dieser Konzentration ergab sich eine spezifische Wachstumsrate μ von 0,13 h^{-1} und eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 0,18 g L^{-1}. Die Verdopplung der Hefeextraktkonzentration auf 1,0 g L^{-1} resultierte in einer Wachstumsrate von 0,14 h^{-1} und einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von 0,23 g L^{-1}. Bei weiter gesteigerten Hefeextraktkonzentrationen von 2,0 g L^{-1} sowie 4,0 g L^{-1} wurden Wachstumsraten von 0,14 h^{-1} und 0,15 h^{-1} sowie maximale Biotrockenmassekonzentrationen von jeweils 0,32 g L^{-1} erzielt.

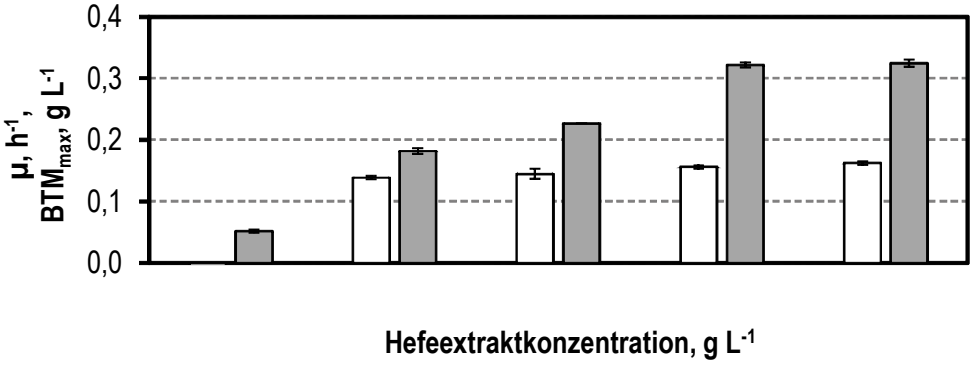

Abbildung 5.3: Autotrophe Parallelansätze in begasten Anaerobflaschen mit *C. aceticum* mit CO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle unter Variation der Hefeextraktkonzentrationen zwischen 0 g L^{-1} und 4 g L^{-1}. Ermittelte spezifische Wachstumsraten μ (weiß) während der exponentiellen Wachstumsphasen in den ersten 7 h sowie maximal erzielte Biotrockenmassekonzentrationen BTM_{max} (grau) innerhalb von 72 h (T = 30 °C; 100 rpm; pH_0 8,0; $p_{CO,0}$ = 400 mbar; $p_{N2,0}$ = 1600 mbar).

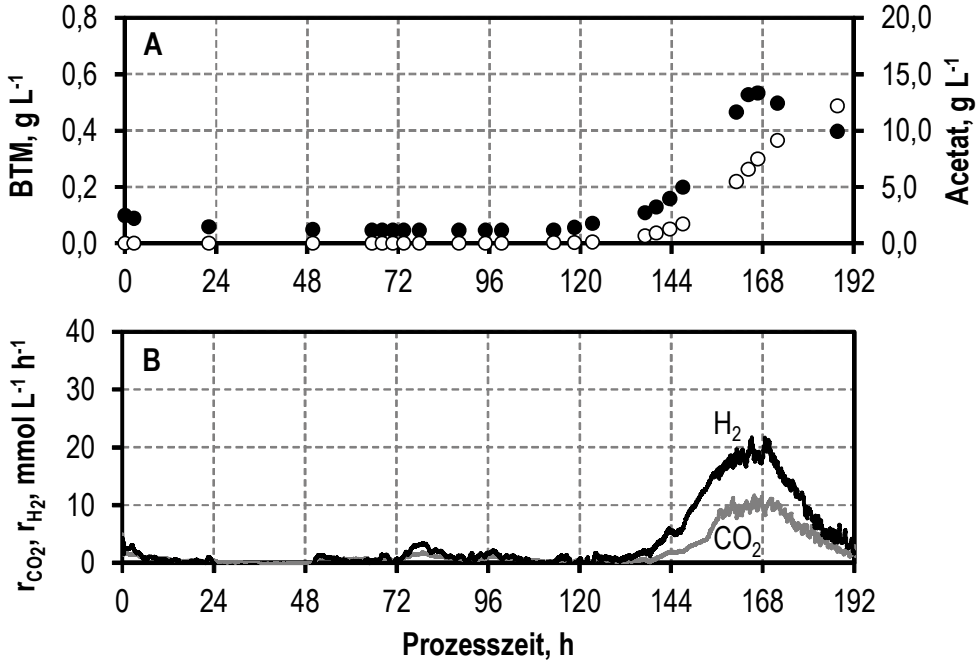

Abbildung 5.4: Autotropher Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* bei kontinuierlicher CO_2/H_2-Begasung und definiertem Reaktionsmedium ohne Hefeextrakt. Biotrockenmasse- (BTM,●) und Acetatkonzentrationen (○); CO_2- und H_2-Aufnahmeraten r_{CO2} und r_{H2} (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 0,4 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N2,ein}$ = 400 mbar).

Autotropher Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor

Die Biotrockenmassekonzentration sank nach Inokulation zunächst von 0,10 g L^{-1} auf ein Minimum von 0,05 g L^{-1} nach 96 h ab. Ab einer Prozesszeit von 118 h stieg die Biomasse auf eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 0,50 g L^{-1} nach einer Prozesszeit von 167 h an. Anschließend sank die Biotrockenmassekonzentration bis Prozessende auf 0,40 g L^{-1} ab. Die Acetatkonzentration blieb bis 118 h nach Inokulation unter 0,10 g L^{-1}. Anschließend stieg sie stetig an und erreichte zu Prozessende einen Wert von 12,2 g L^{-1}. Die Substratаufnahmeraten für CO_2 und H_2 schwankten bis ~120 h nach Inokulation um den Nullwert. Erst danach stiegen die CO_2-Aufnahmerate r_{CO2} sowie die H_2-Aufnahmerate r_{H2} auf ihre maximalen Werte von 10 mmol L^{-1} h^{-1} und 20 mmol L^{-1} h^{-1} nach ~167 h an. Anschließend fielen die Aufnahmeraten bis Prozessende wieder ab.

Diskussion

Komplexbestandteile, etwa Hefeextrakt, Casein oder Pepton, werden in der Mikrobiologie verwendet um bei Unkenntnis der genauen Substratbedürfnisse ein breites Nährstoffspektrum abzudecken und somit Wachstum und Produktbildung auch bei Mikroorganismen mit anspruchsvollen Bedürfnissen ermöglichen zu können. Nachteilig an Komplexbestandteilen ist jedoch, dass sich deren genaue Zusammensetzung chargenweise ändern kann, was im Vergleich zu definiertem Medium veränderte Prozessbedingungen und somit potentielle Prozessunsicherheiten darstellt. Weiterhin sollte in Gasfermentationsprozessen Biomassewachstum und Produktbildung rein chemolithoautotroph stattfinden, weswegen Komplexbestandteile nach Möglichkeit vermieden werden sollten. Da das genaue Nährstoffbedürfnis vieler acetogener Mikroorganismen jedoch nicht bekannt ist, wird in der Gasfermentation dennoch auf Komplexbestandteile zurückgegriffen (Kane et al., 1991; Ollivier et al., 1985). Für *A. woodii* sowie verschiedene *Clostridien*- und *Streptococcus*-Stämme konnte zudem gezeigt werden, dass der Komplexbestandteil Hefeextrakt direkt für den Aufbau von Biomasse verwendet wird, was sich jedoch nicht auf die Produktbildung ausgewirkt hatte (Kantzow et al., 2015; Leclerc et al., 1998). Für *C. aceticum* sind ebenfalls wachstumssteigernde Effekte durch Komplexbestandteile beschrieben (Karlsson et al., 1948).

Durch Variation der Hefeextraktkonzentration im autotrophen Parallelansatz konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 72 h kein autotrophes Wachstum möglich war. Bereits durch Konzentrationen von 0,5 g L^{-1} Hefeextrakt konnte jedoch autotrophes Wachstum ermöglicht werden. Durch weitere Steigerung der Hefeextraktkonzentration ließen sich die Wachstumsraten während der exponentiellen Phasen nur in geringem Maße steigern. Allerdings zeigte sich, dass, wie bereits für *A. woodii* beschrieben, eine Erhöhung der

Hefeextraktkonzentration zu höheren Biomassekonzentrationen führte. Jedoch war eine Steigerung der Biotrockenmassekonzentrationen durch erhöhte Hefeextraktkonzentration im Parallelansatz nur bis zu 2,0 g L^{-1} Hefeextrakt möglich. Die weitere Verdopplung auf 4,0 g L^{-1} Hefeextrakt zeigte dahingehend keinen Steigerungseffekt mehr.

Im autotrophen Rührkesselreaktor führte die Eliminierung des Komplexbestandteils Hefeextrakt zudem zur Ausbildung einer ausgeprägten Verzögerungsphase von ~120 h. Erst anschließend war Biomassewachstum, Acetatbildung sowie die Aufnahme der gasförmigen Substrate zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass *C. aceticum* in der Lage war, sich an die Bedingungen in definiertem Medium zu adaptieren und mögliche limitierende Komponenten wie beispielsweise Vitamine oder bestimmte Aminosäuren, welche in Hefeextrakt enthalten sind, selbst autotroph zu synthetisieren. Wurde die Vorkultur in definiertem Medium hergestellt, so zeigte diese ebenfalls ausgeprägte Verzögerungsphasen, sehr niedrige Biotrockenmassekonzentrationen sowie schlechte Reproduzierbarkeit zwischen den Ansätzen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte auch nach Vorkulturherstellung in definiertem Medium das Auftreten ausgeprägter Verzögerungsphasen und schlechte Reproduzierbarkeit im kontrollierten Rührkesselreaktor unter definierten Bedingungen nicht überwunden werden (Daten nicht gezeigt). In Gasfermentationsprozessen sollte Biomassewachstum und Produktbildung möglichst rein chemolithoautotroph stattfinden. Da im Sinne reproduzierbarer reaktionstechnischer Charakterisierungsprozesse jedoch eine Verzögerungsphase von 120 h oder länger inakzeptabel ist, wird die Hefeextraktkonzentration für das Vorkulturmedium auf 2,0 g L^{-1} und für das Reaktionsmedium auf 1,0 g L^{-1} festgelegt.

5.2 Temperatur

Neben der optimalen Medienzusammensetzung und der Versorgung mit Substrat stellt die Prozesstemperatur eine wichtige stammspezifische Zustandsgröße dar. *C. aceticum* wird als mesophiler Mikroorganismus mit einem Temperaturoptimum von ~30 °C beschrieben. Zur Überprüfung des Temperaturoptimums wurde die Temperatur in heterotrophen Parallelansätzen mit 10 g L^{-1} Fructose zwischen 25 °C und 40 °C variiert und die spezifischen Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen ermittelt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

Die ermittelte spezifische Wachstumsrate bei einer Prozesstemperatur von 25 °C betrug lediglich 0,06 h^{-1}. Durch Erhöhung auf 30 °C konnte diese auf 0,21 h^{-1} gesteigert werden. Die weitere Erhöhung der Prozesstemperatur auf 35 °C sowie 40 °C resultierte in verringerten Wachstumsraten von 0,11 h^{-1} und 0,05 h^{-1}. Dies bestätigte das in der Literatur beschriebene

Temperaturoptimum von ~30 °C, weshalb die Prozesstemperatur aller reaktionstechnischen Untersuchungen in Rührkesselreaktoren im Labormaßstab auf 30 °C geregelt wurde.

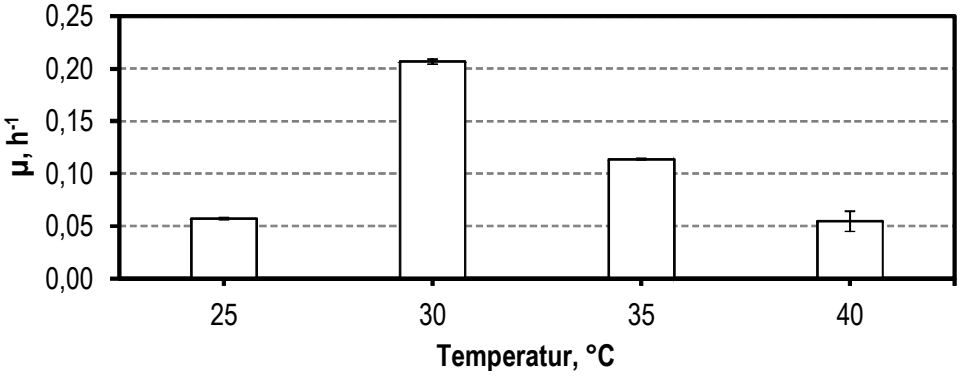

Abbildung 5.5: Heterotrophe Parallelansätze in Anaerobflaschen mit *C. aceticum* bei variierten Prozesstemperaturen. Vergleich der ermittelten spezifischen Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphase (100 rpm; pH_0 8,0).

5.3 Produktinhibierung

Von vielen Mikroorganismen ist bekannt, dass sich die Akkumulation von primären oder sekundären Stoffwechselprodukten im Reaktionsmedium negativ auf Wachstum und Produktbildung auswirkt. Dabei zeigen gerade niedermolekulare Produkte, wie beispielsweise Ethanol oder organische Säuren, welche vorwiegend bei anaeroben Fermentationsprozessen entstehen, stammspezifisch bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen inhibierende Wirkungen, was sich negativ auf die Produktivität sowie die möglichen erzielbaren Produktkonzentrationen auswirkt. Da das Primärprodukt von *C. aceticum* Essigsäure beziehungsweise Acetat ist, wurde in autotrophen Parallelansätzen in begasten Anaerobflaschen (CO/N_2, 1:4) mit initialem CO-Partialdruck $p_{CO,0}$ = 400 mbar die Toleranz gegenüber dieser organischen Säure untersucht, um die möglichen maximalen Produktkonzentrationen abschätzen zu können. Das pH-Optimum von *C. aceticum* liegt gemäß Literaturangaben und eigenen Überprüfungen (Daten nicht gezeigt) bei pH 8,0 bis pH 8,3. In diesem pH-Bereich liegt mit über 99,9 % überwiegend die dissoziierte Form Acetat vor (Dissoziationsgleichgewicht ohne Berücksichtigung von Temperatur und Ionenstärke, siehe Abbildung 3.5). Bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen wurden 0 g L^{-1} bis 28 g L^{-1} Acetat im Reaktionsmedium vorgelegt und die resultierenden spezifischen Wachstumsraten μ während der ersten 7 h bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

Mit dem Standardmedium ohne Acetatzugabe betrug die spezifische Wachstumsrate $\mu = 0{,}15\ h^{-1}$. Bei Vorlage von 10 g L^{-1} Acetat belief sich die Wachstumsrate während der ersten 7 h lediglich auf $0{,}05 \pm 0{,}04\ h^{-1}$. Bei weiterer Erhöhung auf 19 g L^{-1} Acetat im Reaktionsmedium war lediglich in einem Ansatz eine geringe Zunahme der Biomasse zu beobachten, während in den beiden anderen die Biotrockenmassekonzentrationen absanken. Bei der höchsten untersuchten Acetatkonzentration von 28 g L^{-1} fand über die gesamte Prozesszeit keine Zunahme sondern die Abnahme der Biotrockenmassekonzentration statt.

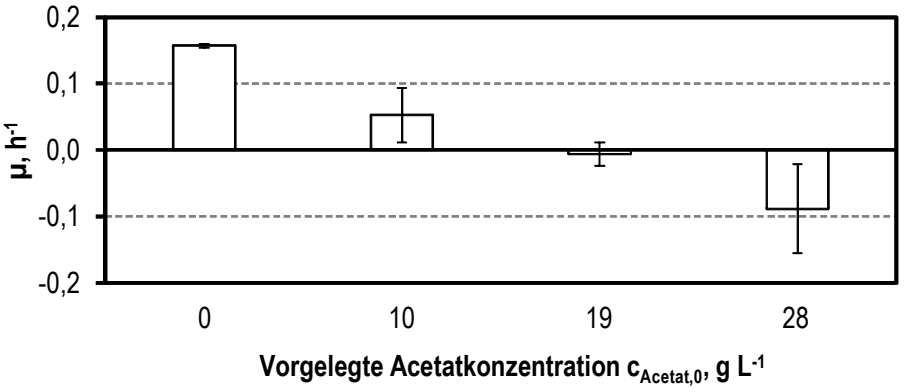

Abbildung 5.6: Vergleich der resultierenden spezifischen Wachstums- und Absterberaten in autotrophen Parallelansätzen mit *C. aceticum* mit variierten vorgelegten Acetatkonzentrationen $c_{Acetat,0}$ (T = 30 °C; 100 rpm; pH_0 8,0; $p_{CO,0}$ = 400 mbar; $p_{N2,0}$ = 1600 mbar).

Diskussion

Aus autotrophen Parallelansätzen mit Vorlage des primären Stoffwechselproduktes Acetat und Vergleich der resultierten ermittelten Wachstumsraten ging hervor, dass das Wachstum von *C. aceticum* bereits durch Acetatkonzentrationen von unter 10 g L^{-1} im Reaktionsmedium deutlich gehemmt wurde. Bei noch höheren Produktkonzentrationen fand weder Biomassewachstum noch Produktbildung statt (Daten nicht gezeigt). Es kam sogar zur Reduktion der Biomassekonzentration, was darauf hindeutete, dass bereits toxische Konzentrationen erreicht wurden. Die genaue Ursache für die stark inhibierende Wirkung des Hauptstoffwechselproduktes Acetat auf *C. aceticum* kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wird für schwache Säuren wie Essigsäure angenommen, dass diese in protonierter Form mit dem Konzentrationsgefälle durch die Zellmembran ins Cytoplasma diffundieren und dort aufgrund der Änderung des pH dissoziieren. Hierdurch würden die intrazellulären Anionen- und Protonenkonzentrationen ansteigen. Ist der

Organismus nicht mehr in der Lage diese Akkumulation durch verstärkten Anionen- oder Protonenefflux zu kompensieren, so sinkt unweigerlich der zellinterne pH, was zur Inhibierung pH-sensitiver Enzyme führen würde (Booth, 1985; Doyle & Beuchat, 2007; Lambert & Stratford, 1999). Weiterhin wird in der Literatur der zellinterne Osmolaritätsanstieg als wachstumshemmende Ursache diskutiert, wobei der Anstieg des Zelldrucks zur Zerstörung der Zelle führen könnte. Dem könnte der Mikroorganismus durch Ausschleusen von Anionen entgegenwirken, was jedoch wiederum zur weiteren Reduktion des zellinternen pH führen würde (Carpenter & Broadbent, 2009; Roe et al., 1998). Bei Mikroorganismen, deren Energiekonservierung an den Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten gekoppelt ist, würde dieser durch die beschriebene Protonenakkumulation und den notwendigen verstärkten Protonenefflux empfindlich gestört, was zusätzlich zu verringerter ATP-Synthese führen könnte (Padan et al., 2005). Von *Moorella thermoacetica* ist bekannt, dass dessen Wachstum und Produktbildung erst bei 2 - 3 % (w/v) (20 - 30 g L^{-1}) Acetat im Reaktionsmedium gehemmt wird, während bei *Clostridium carboxidivorans* bereits bei Acetatkonzentrationen von 0,2 % (w/v) (2 g L^{-1}) das Wachstums- und Produktbildungsverhalten negativ beeinflusst wird (Baronofsky et al., 1984; Herrero, 1983; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2016). Mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen würde *C. aceticum* bei Acetatkonzentrationen unter 1 % (w/v) gehemmt werden, was in der Größenordnung der bereits berichteten Acetatinhibierungen anderer Acetogene liegt.

5.4 pH-Regelung

Wie bereits beschrieben zeigen viele Acetogene die Entkopplung der solventogenen von der acetogenen Produktbildungsphase (siehe Abschnitt 3.1.3). Die Änderung des Produktspektrums wird dabei oftmals durch Unterschreiten eines kritischen pH oder durch Akkumulation kritischer Säurekonzentrationen induziert. Um zu überprüfen, inwieweit auch *C. aceticum* eine Änderung im Wachstums- und Produktbildungsverhalten bei verringertem, für das Wachstum nicht optimalen pH zeigt, wurde dieser Organismus unter autotrophen Bedingungen ($CO_2/H_2/N_2$, 1,2:4,8:4) einer Verringerung des pH während des laufenden Prozesses ausgesetzt. Zur möglichst langsamen pH-Reduktion wurde hierzu bei ungeregeltem pH im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor die natürliche Primärproduktbildung des Acetats und damit eine zunehmende Ansäuerung des Reaktionsmediums genutzt, wobei der initiale pH_0 nach Inokulation mit 0,10 g Biotrockenmasse den in der Literatur beschriebenen und durch eigene Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) bestätigten Wert von $pH_0 = 8,0$ betrug (Braun et al., 1981). Prozesstemperatur (T = 30 °C), Leistungseintrag (~0,42 W L^{-1}), Leerrohrgeschwindigkeit

(2,4 10^{-4} m s^{-1}) sowie die Substratpartialdrücke am Reaktoreingang ($p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar) blieben dabei konstant. Zu Vergleichszwecken wurde ebenfalls ein Satzprozess mit geregeltem pH 8,0 unter ansonsten gleichen Prozessbedingungen durchgeführt. Die vergleichenden Prozessverläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen sowie die pH-Verläufe der Reaktionsmedien sind in Abbildung 5.7 A und B gegenübergestellt.

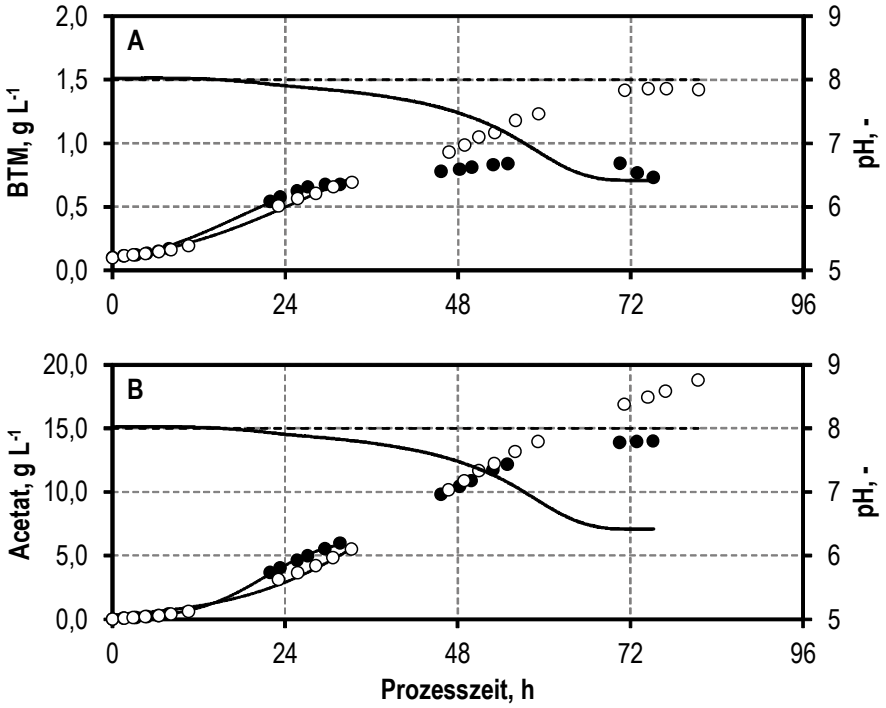

Abbildung 5.7: Vergleichende autotrophe CO_2/H_2-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* mit pH-Regelung (pH 8,0) (weiß/gestrichelt) und ungeregeltem pH (schwarz). A: Biotrockenmassekonzentrationen (BTM), pH; B: Acetatkonzentrationen, pH (T = 30 °C; P V^{-1} = 4,2 10^{-1} W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Unter pH-kontrollierten Bedingungen betrug die spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Phase 0,06 h^{-1}, wobei diese nach knapp 22 h beendet war und anschließend nahezu lineares Wachstum bis zu einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von 1,40 g L^{-1} nach 71 h beobachtet werden konnte. Acetat wurde als einziges Produkt gebildet und akkumulierte bis Prozessende nach 77 h auf 18,0 g L^{-1} im Reaktionsmedium. Aufgrund der pH-Regelung verblieb der pH des Reaktionsmediums für den gesamten Prozesszeitraum auf pH 8,0.

Unter pH-unkontrollierten Bedingungen betrug die Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase 0,07 h^{-1}. Allerdings stellte sich bereits nach ~28 h lineares

Wachstum ein. Die maximale Biotrockenmassekonzentration wurde nach 70 h erreicht und betrug 0,85 g L^{-1}. Anschließend fiel diese schnell auf 0,70 g L^{-1} bis zu einer Prozesszeit von 75 h ab. Als einziges Produkt wurde während des gesamten Prozesses Acetat gebildet. Dessen Konzentration stieg bis 70 h auf 14,0 g L^{-1} an und verblieb anschließend bis Prozessende konstant. Der ungeregelte pH sank zunächst kontinuierlich ab. So betrug der pH nach 24 h noch pH 7,9 und nach 48 h nur noch pH 7,5. Im weiteren Prozessverlauf näherte sich der pH einem Wert von pH 6,4 an, welcher nach 70 h erreicht war und für die restliche Prozesszeit konstant blieb.

Diskussion

Im pH-ungeregelten Satzprozess zeigte sich durch den Vergleich, dass durch Bildung des Primärproduktes Acetat das wässrige Reaktionsmedium im Laufe des Prozesses immer weiter ansäuerte. Zweifelsfrei wurden hierdurch Wachstum und Produktbildung beeinflusst, da bereits bei pH 7,6 die Biotrockenmassekonzentration deutlich unter der des pH-geregelten Prozesses lag. Spätestens nach Erreichen von pH 6,4 des Reaktionsmediums reduzierte sich die Biotrockenmassekonzentration sichtbar, was durch das Absterben der Zellen erklärt werden kann. Bei Betrachtung der Acetatkonzentrationen zeigte sich zudem, dass diese einen konstanten Wert von 14,0 g L^{-1} bei pH 6,4 annahm. Dies bedeutet, dass keine weitere Acetatbildung mehr stattfand. Im Vergleichsprozess hingegen akkumulierte Acetat zu deutlich höheren Konzentrationen. Als einziges Produkt wurde während des gesamten Prozesses Acetat identifiziert. Damit konnte mit *C. aceticum* durch Absenken des pH bei einer CO_2/H_2-Begasung keine solventogene Phase induziert oder das Produktspektrum verändert werden. Im Sinne einer stabilen Prozessführung wurden daher alle weiteren Charakterisierungsprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor unter pH-kontrollierten Bedingungen durchgeführt.

6 Gasfermentationen mit *Clostridium aceticum* im Satzprozess

6.1 Leistungseintrag

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 beschrieben ist der mechanische Leistungseintrag im Rührkesselreaktor für den Massentransfer aus der Gas- in die Flüssigphase und somit für die Verfügbarkeit schlecht wasserlöslicher Substrate für Mikroorganismen entscheidend. Aufgrund der geringen Löslichkeit insbesondere der Substratgase CO und H_2 in wässrigen Medien droht bei hohen Substrataufnahmeraten r_{CO} oder r_{H_2} durch die Mikroorganismen eine Substratlimitierung, weshalb durch hohen Leistungseintrag hohe volumenbezogene Massentransferkoeffizienten k_La_i und somit ausreichend hohe Massentransferraten gewährleistet sein müssen. Andererseits ist von einigen Mikroorganismen bekannt, dass sie scherempfindlich sind und daher bei hohem Leistungseintrag aufgrund von fluidmechanischem Stress durch Kavitation sowie direktem Scherstress durch die Rührorgane verringertes Wachstum zeigen oder sogar absterben können. Zur Untersuchung der Scherempfindlichkeit von *C. aceticum* wurde der Leistungseintrag zwischen 4,3 10^{-4} W L^{-1} und 11,7 W L^{-1} (50 - 1200 rpm) bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen (T = 30 °C; pH = 8,0; $p_{CO2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N2,ein}$ = 400 mbar; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}) variiert. In Abbildung 6.1 A - D sind exemplarisch die vergleichenden Prozessverläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen sowie der anhand nichtlinearer Regression der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen abgeschätzten volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) während der exponentiellen Wachstumsphasen für die Leistungseinträge 4,8 10^{-3} W L^{-1} (100 rpm), 5,0 10^{-2} W L^{-1} (200 rpm), 3,5 W L^{-1} (800 rpm) sowie 6,8 W L^{-1} (1000 rpm) dargestellt. In Tabelle 6.1 sind die wichtigsten Zustandsgrößen der vergleichenden Satzprozesse mit Leistungseintragsvariation aufgeführt.

Bei allen vier in Abbildung 6.1 A - D exemplarisch dargestellten Prozessverläufen zeigte sich, dass sich an die exponentielle Wachstumsphase, welche jeweils etwa 22 h andauerte, eine lineare Wachstumsphase mit einer maximalen Biotrockenmassekonzentration BTM_{max} bei 72 h anschloss. Die beobachteten stationären Phasen waren jeweils von kurzer Dauer, sodass zu Prozessende nach ~96 h die BTM jeweils wieder abnahm. Die niedrigste BTM_{max} von 1,1 g L^{-1} wurde dabei bei einem Leistungseintrag von 4,8 10^{-3} W L^{-1} (100 rpm) erzielt, während die höchste BTM_{max} von 1,5 g L^{-1} bei einem Leistungseintrag von 6,8 W L^{-1} (1000 rpm) erreicht wurde.

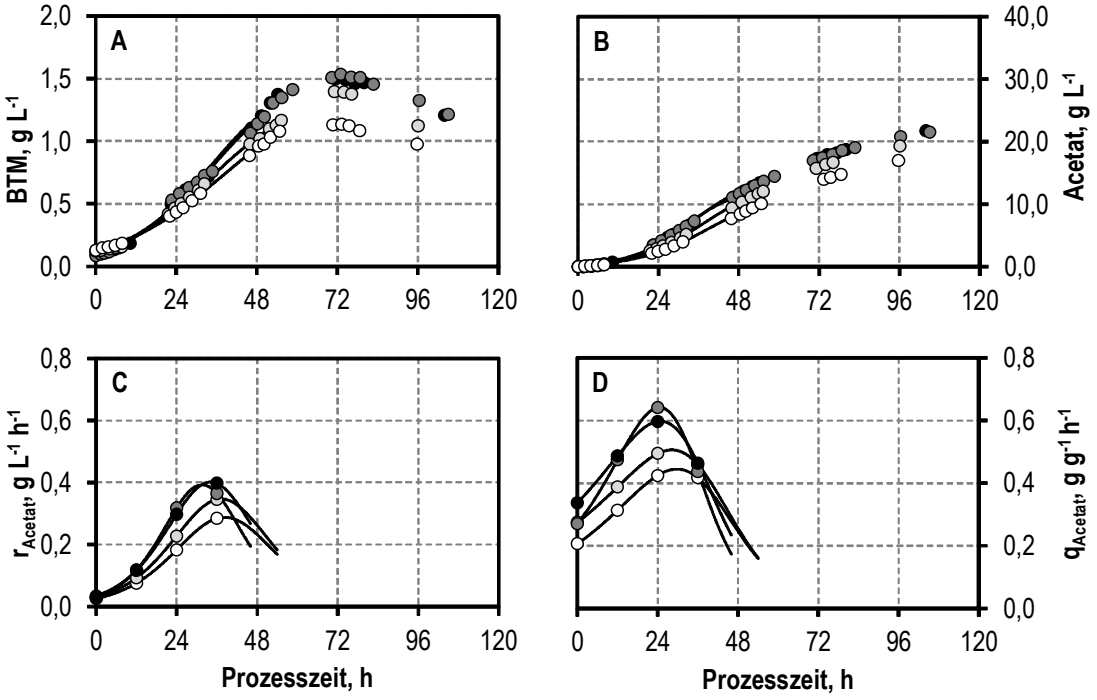

Abbildung 6.1: Vergleichende autotrophe CO_2/H_2-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* bei variiertem volumetrischem Leistungseintrag P V^{-1}. Weiß (○): 4,8 10^{-3} W L^{-1} (100 rpm); Hellgrau (◍): 4,95 10^{-2} W L^{-1} (200 rpm); Dunkelgrau (●): 3,5 W L^{-1} (800 rpm); Schwarz (●): 6,8 W L^{-1} (1000 rpm). Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in C und D dienen der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Tabelle 6.1: Zustandsgrößen der vergleichenden Satzprozesse mit variiertem Leistungseintrag im kontrollierten Rührkesselreaktor. Zellspezifische Wachstumsraten μ, maximale Biotrockenmassekonzentrationen BTM_{max}, abgeschätzte maximale zellspezifische Acetatbildungsraten q_{Acetat}, abgeschätzte maximale volumetrische Acetatbildungsraten r_{Acetat} (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,in}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Rührerdrehzahl, rpm	**Leistungseintrag P V^{-1}**, W L^{-1}	**μ**, h^{-1}	**BTM_{max}**, g L^{-1}	**$q_{Acetat,max}$**, g g^{-1} h^{-1}	**$r_{Acetat,max}$**, g L^{-1} h^{-1}
50	4,3 10^{-4}	0,06	0,8	0,52	0,27
100	4,8 10^{-3}	0,05	1,1	0,44	0,29
200	5,0 10^{-2}	0,06	1,4	0,53	0,35
400	4,2 10^{-1}	0,06	1,4	0,54	0,38
800	3,5	**0,07**	**1,5**	**0,64**	**0,39**
1000	6,8	**0,07**	**1,5**	**0,63**	**0,40**
1200	11,7	**0,07**	1,4	**0,65**	**0,41**

Die während der exponentiellen Wachstumsphasen erreichten spezifischen Wachstumsraten μ lagen zwischen 0,05 h^{-1} und 0,07 h^{-1}. Die niedrigste Acetatakkumulation von 16,9 g L^{-1} nach 96 h wurde bei einem Leistungseintrag von 4,8 10^{-3} W L^{-1} beobachtet, während die höchsten Acetatkonzentrationen nach 96 h von knapp 21,0 g L^{-1} bei 3,5 W L^{-1} (800 rpm) und 6,8 W L^{-1} (1000 rpm) erreicht wurden. Die maximalen abgeschätzten zellspezifischen und volumetrischen Acetatbildungsraten q_{Acetat} und r_{Acetat} wurden am Ende der jeweiligen exponentiellen Phasen ermittelt. Der Vergleich der Zustandsgrößen (siehe Tabelle 6.1) zeigte, dass die spezifischen Wachstumsraten μ der exponentiellen Phasen nahezu konstant blieben, während sich die maximal erzielbaren Biotrockenmassekonzentrationen durch Erhöhung des Leistungseintrages auf einen Wert von 1,5 g L^{-1} steigern ließen. Tendenziell war durch Erhöhung der Rührerdrehzahl auch die Steigerung der Acetatbildungsraten möglich, wobei bei dem niedrigsten untersuchten Leistungseintrag von 4,3 10^{-4} W L^{-1} (50 rpm) mit 0,52 g g^{-1} h^{-1} eine überraschend hohe zellspezifische Acetatbildungsrate abgeschätzt wurde. Die weitere Steigerung des Leistungseintrages zeigte zwischen 3,5 W L^{-1} und 11,7 W L^{-1} die höchsten abgeschätzten Acetatbildungsraten.

Diskussion

Die Erhöhung der Rührerdrehzahl zeigte, dass hierdurch die maximalen Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen sowie die Acetatbildungsraten während der exponentiellen Wachstumsphasen gesteigert werden konnten. Dies spricht dafür, dass *C. aceticum* bei Biotrockenmassekonzentrationen ab ~0,5 g L^{-1} bei geringem Leistungseintrag gaslimitiert sein könnte. Weiterhin zeigte sich, dass bei hohen Leistungseinträgen zwischen 3,5 W L^{-1} und 11,7 W L^{-1} keine weitere Steigerung dieser reaktionstechnischen Parameter bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen sowie bei maximalen Biotrockenmassekonzentrationen von 1,50 g L^{-1} möglich war, was darauf hindeutet, dass bei diesen Leistungseinträgen keine gaslimitierenden Bedingungen herrschten. Bei einer Scherempfindlichkeit, wie sie von Braun (1981) für *C. aceticum* berichtet ist, wären bei steigendem Leistungseintrag sinkende maximale Biomassekonzentrationen und niedrigere Produktbildungsraten zu erwarten gewesen. Da dies durch die durchgeführten Experimente nicht bestätigt wurde ist davon auszugehen, dass *C. aceticum* im untersuchten Leistungseintragsbereich keine Scherempfindlichkeit aufweist, weswegen für alle reaktionstechnischen Charakterisierungsprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor ein Leistungseintrag von 6,8 W L^{-1} beziehungsweise eine Rührerdrehzahl von 1000 rpm festgelegt wird.

6.2 Verwertung gasförmiger Substrate

Für *Clostridium aceticum* ist bekannt, dass dieser acetogene Stamm unter autotrophen Bedingungen sowohl rein mit CO als Kohlenstoff- und Energiequelle als auch mit Gasmischungen mit CO_2/H_2 wachsen kann, wobei in diesem Fall CO_2 als Kohlenstoffquelle und H_2 als Energiequelle genutzt werden. Die Menge an ATP, welche durch die Bildung des Primärprodukts Acetat theoretisch synthetisiert werden kann, hängt vom genutzten Substrat ab (siehe Abschnitt 3.1.3). Um Unterschiede im Wachstums- und Produktbildungsverhalten bei den unterschiedlichen Substraten identifizieren zu können, fanden Untersuchungen zur Substratumsetzung im kontinuierlich begasten und kontrollierten Satzprozess statt. Beim CO-Prozess (CO/N_2, 1:9) stand als Substrat lediglich CO zur Verfügung, während in einem CO_2/H_2-Prozess mit einer Gasmischung aus $CO_2/H_2/N_2$ (1,2:4,8:4) gearbeitet wurde. Da einige acetogene Mikroorganismen CO nicht als alleiniges Substrat für den autotrophen Stoffwechsel nutzen können sondern zusätzlich CO_2 benötigen wurde in einem weiteren autotrophen Prozess die Umsetzung von CO/CO_2 in einem $CO/CO_2/N_2$-Gasgemisch (1:1:8) untersucht. Abschließend wurde der Rührkesselreaktor mit einer industrielles Synthesegas simulierenden Gasmischung aus $CO_2/H_2/CO/N_2$ (1,2:4,8:1:3) begast.

6.2.1 Kohlenstoffmonoxid

Zunächst wurde in kontrollierten Satzprozessen die Umsetzung des Substrats CO bei Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein}$ = 100 mbar und $p_{N2,ein}$ = 900 mbar untersucht. Hierzu wurden Prozesstemperatur und pH auf den zuvor ermittelten Werten T = 30 °C und pH = 8,0 geregelt (siehe Kapitel 5), das Substratgas kontinuierlich mit einem Volumenstrom von 10 L h^{-1}, einer Gasleerrohrgeschwindigkeit von $u = 2{,}4\ 10^{-4}$ m s^{-1} entsprechend, zugeführt sowie ein volumetrischer Leistungseintrag von ~6,8 W L^{-1} (1000 rpm) gewählt. Da diese Bedingungen für künftige Untersuchungen als Referenzprozess dienen sollten, wurden zur Überprüfung der Reproduktionsfähigkeit unabhängige Triplikate angefertigt. Die resultierenden Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie die aus nichtlinearer Regression resultierenden Abschätzungen der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) sind in Abbildung 6.2 A - F dargestellt. Die aus der Abgasanalytik gewonnenen Daten der CO-, CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{CO2}, r_{H2}) sowie die zugehörigen Partialdruckverläufe (p_{CO}, p_{CO2}, p_{H2}) sind in Abbildung 6.3 A - F dargestellt.

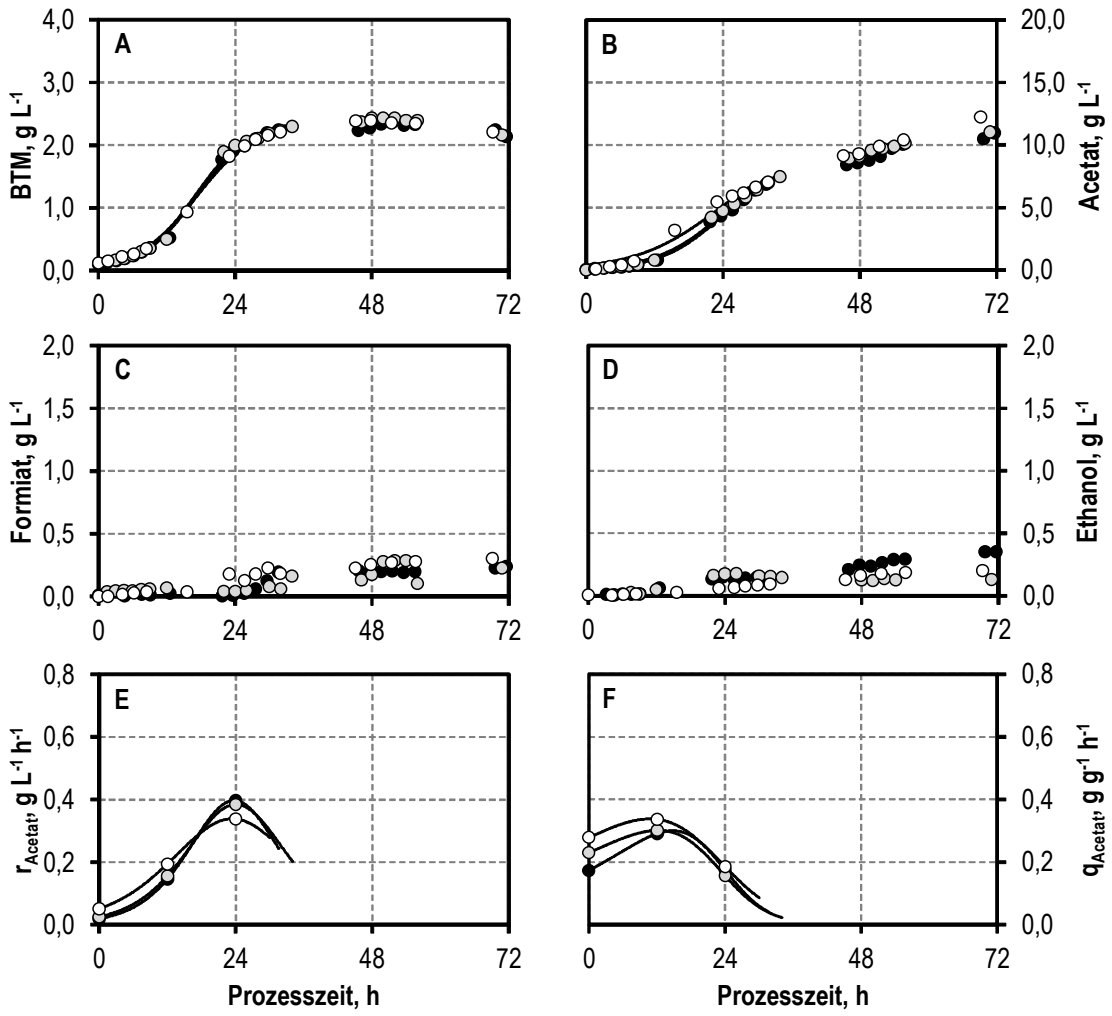

Abbildung 6.2: Autotrophe CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* als Triplikat unter Standardbedingungen. Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 900 mbar).

Direkt nach Inokulation mit 0,10 g Biotrockenmasse stieg die Biotrockenmassekonzentration in allen drei Satzprozessen. Dabei betrugen die spezifischen Wachstumsraten während der knapp 12 h andauernden exponentiellen Phasen jeweils μ = 0,13 h^{-1}. Nach etwa 48 h war jeweils die maximale Biotrockenmassekonzentration von 2,40 g ± 0,03 g L^{-1} erreicht, welche im weiteren Verlauf bis Prozessende nach 72 h auf knapp 2,20 g L^{-1} absank. Die Acetatkonzentrationen nahmen in allen drei Satzprozessen über den gesamten Versuchszeitraum zu, wobei finale Konzentrationen von 11,40 ± 0,58 g L^{-1} erzielt wurden. Die Bildung geringer Mengen Formiat (0,28 ± 0,03 g L^{-1}) und Ethanol (0,25 ± 0,07 g L^{-1}) war in allen drei Satzprozessen zu beobachten. Die abgeschätzten volumetrischen Acetatbildungsraten r_{Acetat} zeigten jeweils ein Maximum nach 22 h bis 24 h, welches zwischen

0,34 g L^{-1} h^{-1} und 0,40 g L^{-1} h^{-1} lag und aus denen eine mittlere Rate von 0,37 ± 0,03 g L^{-1} resultierte. Die Maxima der abgeschätzten zellspezifischen Acetatbildungsraten q_{Acetat} wurden bereits nach 12 h bis 16 h erreicht. Diese lagen zwischen 0,30 g g^{-1} h^{-1} und 0,34 g g^{-1} h^{-1}, woraus sich eine mittlere zellspezifische Acetatbildungsrate von 0,31 ± 0,02 g g^{-1} h^{-1} ergab. Der mittlere zellspezifische Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,X}$ betrug 2,4 ± 0,13 g g^{-1}.

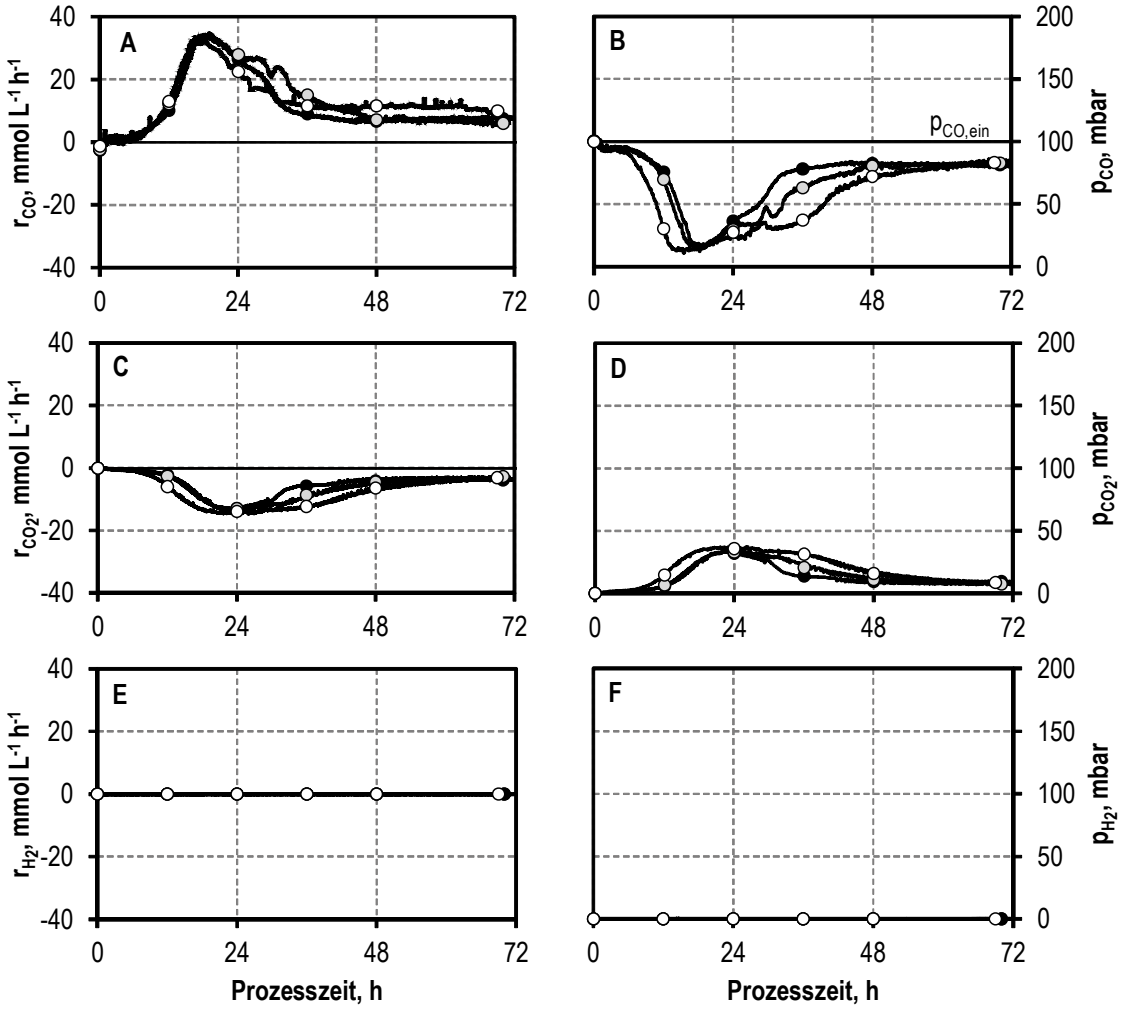

Abbildung 6.3: Abgasdaten der autotrophen CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* als Triplikat unter Standardbedingungen. Durchgezogene Linien resultieren aus den Daten der Abgasanalytik, exemplarische Symbole dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar).

Die maximalen CO-Aufnahmeraten r_{CO} von 33 mmol L^{-1} h^{-1} wurden in allen drei Ansätzen nach etwa 18 h erreicht. Anschließend sanken die Aufnahmeraten ab und erreichten konstante Werte von 6 - 10 mmol L^{-1} h^{-1}. Aufgrund der CO-Aufnahme sanken die CO-Partialdrücke p_{CO} in allen Versuchen nach 16 - 18 h auf ein Minimum von knapp 15 mbar. Anschließend nahm

der Partialdruck unterschiedlich schnell wieder zu, wobei zu Prozessende dieselben stabilen p_{CO} von 83 mbar erreicht wurden. CO_2 wurde in den Triplikaten über den gesamten Prozesszeitraum gebildet, wobei nach 24 h maximale Bildungsraten r_{CO_2} von 14 mmol L^{-1} h^{-1} erreicht wurden. Bis Prozessende nahmen die Bildungsraten auf 3 mmol L^{-1} h^{-1} ab. Die CO_2-Partialdrücke p_{CO_2} stiegen innerhalb der ersten 24 h auf Werte um 35 mbar an und sanken dann zu Prozessende auf 7 - 9 mbar ab. Für H_2 war für die gesamte Prozesszeit weder Bildung noch Aufnahme zu verzeichnen und der H_2-Partialdruck p_{H_2} lag in allen Ansätzen durchgehend bei etwa 0 mbar. Zum Zeitpunkt der höchsten CO-Aufnahme betrug der CO-Umsatz 84 ± 2 % und zu Prozessende bei konstanten Aufnahmeraten noch 18 ± 2 %.

Mit den während der jeweiligen Prozesse gebildeten Mengen an Biotrockenmasse sowie der Produkte Acetat, Ethanol und Formiat ließen sich anhand der Menge der über den Gesamtprozess aufgenommenen und gebildeten Gase sowie unter Berücksichtigung des im Reaktionsmedium enthaltenen Hefeextrakts die integralen Kohlenstoff- sowie Elektronenbilanzen erstellen. So wurden im Prozesszeitraum in den Triplikaten 0,83 - 0,93 mmol Kohlenstoff in Form von CO aufgenommen, wobei zwischen 0,37 - 0,44 mmol in Form von CO_2 freigesetzt wurden. Für die Kohlenstoffbilanzen ergab sich dadurch eine mittlere Wiederfindung von 97 ± 2 % und für die Elektronenbilanz eine Wiederfindung von 107 ± 5 %. Für den Gesamtprozess berechneten sich dabei mittlere substratspezifische Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten von $Y_{X,C}$ = 4,3 ± 0,11 g mol_C^{-1} sowie $Y_{Acetat,C}$ = 23,9 ± 0,77 g mol_C^{-1}.

6.2.2 Kohlenstoffdioxid/Wasserstoff

In diesem Prozess wurde die Umsetzung der Substrate CO_2/H_2 mit einer $CO_2/H_2/N_2$-Gasmischung mit den Eingangspartialdrücken $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar, $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar sowie $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar untersucht. Mit Ausnahme der Leerrohrgeschwindigkeit (u = 6,0 10^{-4} m s^{-1}) wurden für die übrigen Prozessparameter die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Die resultierenden Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie die aus nichtlinearer Regression resultierenden Abschätzungen der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) sind in Abbildung 6.4 A - F und die aus der Abgasanalytik gewonnenen Daten der CO-, CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{CO_2}, r_{H_2}) sowie die zugehörigen Partialdruckverläufe (p_{CO}, p_{CO_2}, p_{H_2}) sind in Abbildung 6.5 A - F dargestellt. Zu Vergleichszwecken ist jeweils auch ein Datensatz des CO-Referenzprozesses ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar, siehe Abschnitt 6.2.1) aufgeführt.

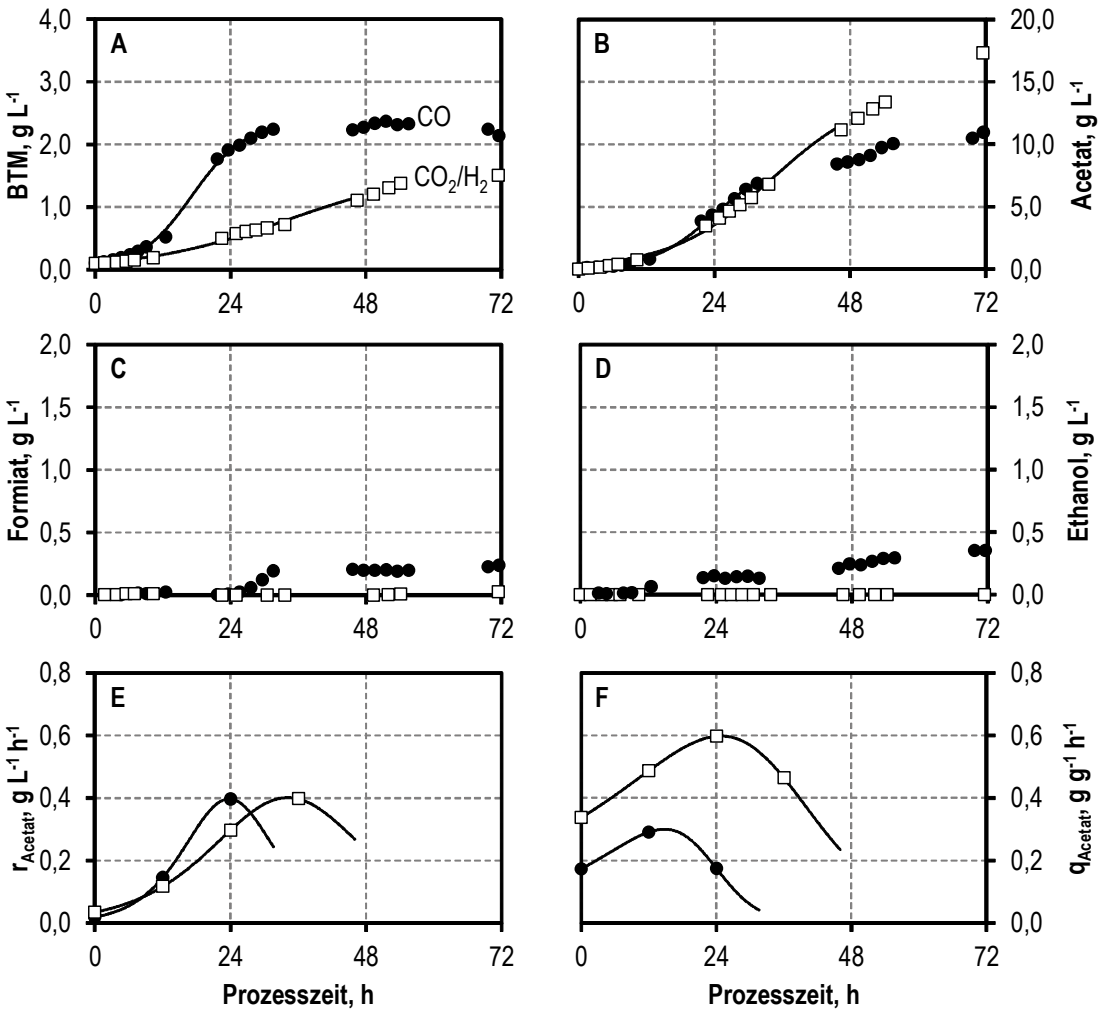

Abbildung 6.4: Autotropher CO_2/H_2-Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (weiß) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; $P\ V^{-1}$ = 6,8 W L^{-1}; u = 6,0 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Direkt nach Inokulation mit 0,10 g L^{-1} Biotrockenmasse begann das exponentielle Wachstum von *C. aceticum*, welches für mindestens 10 h andauerte. Dabei betrug die ermittelte spezifische Wachstumsrate 0,06 h^{-1}. Die höchste Biotrockenmassekonzentration von 1,50 g L^{-1} wurde nach 72 h erzielt, wobei diese im Anschluss absank (Daten nicht gezeigt). Das Primärprodukt Acetat wurde von Prozessbeginn an gebildet und akkumulierte bis Prozessende auf 17,3 g L^{-1} nach 72 h. Für die exponentielle Phase ergab sich dabei ein zellspezifischer Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,X}$ von 10 g g^{-1}. Über den gesamten Prozesszeitraum war weder die Bildung von Formiat noch Ethanol zu beobachten. Die aus der nichtlinearen Regression resultierende volumetrische Acetatbildungsrate r_{Acetat} zeigte nach

33 h ein Maximum von 0,40 g L^{-1} h^{-1}, während die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} nach 24 h einen maximalen Wert von 0,60 g g^{-1} h^{-1} aufwies.

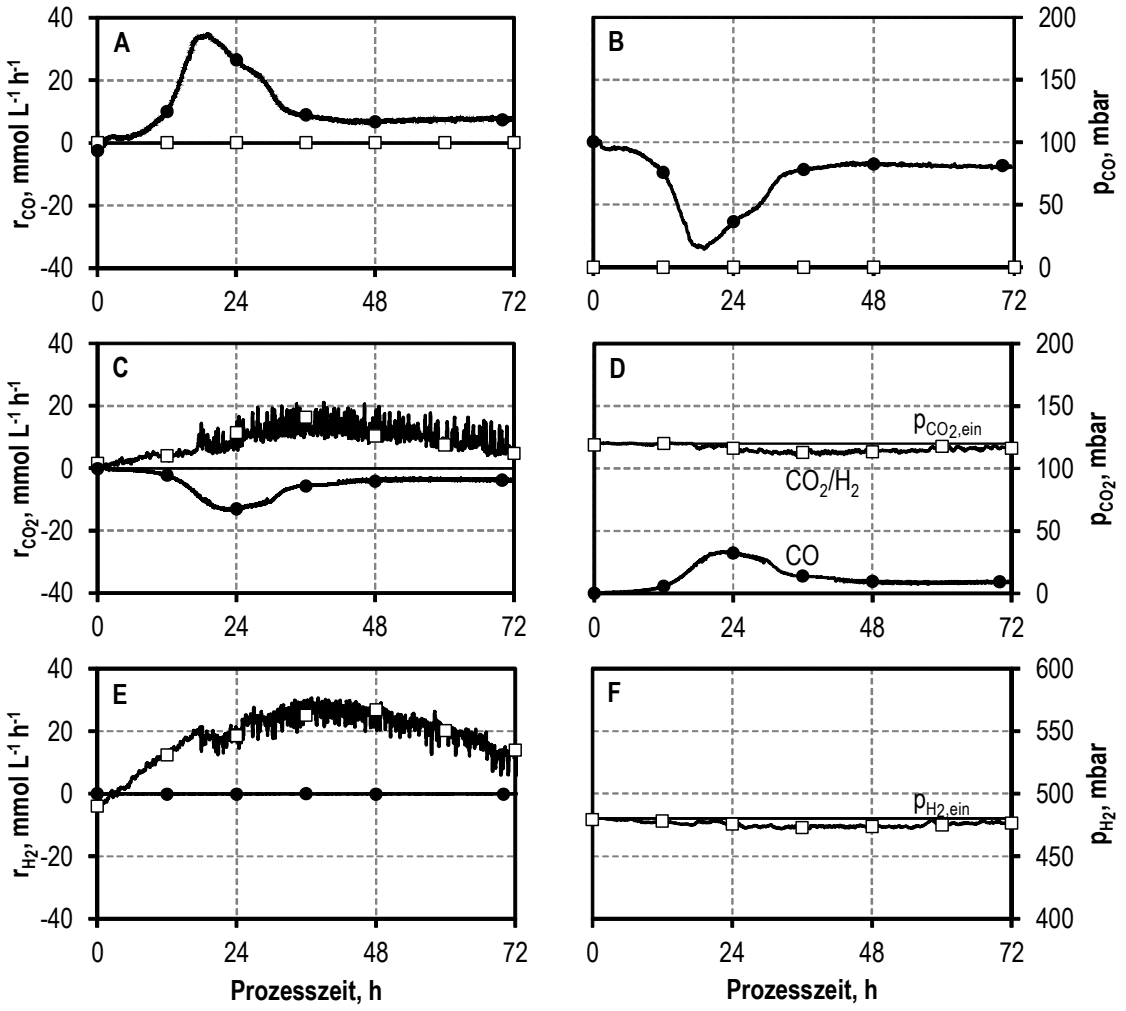

Abbildung 6.5: Abgasdaten des autotrophen CO_2/H_2-Satzprozesses im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (weiß) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus den Daten der Abgasanalytik, exemplarische Symbole dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 6,0 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Die Aufnahme oder Bildung von CO konnte in diesem Versuch erwartungsgemäß nicht beobachtet werden, der CO-Partialdruck betrug über den gesamten Prozess 0 mbar. CO_2 wurde hingegen über den gesamten Prozess hinweg aufgenommen, wobei die Raten teils starken Schwankungen unterlagen. Die maximale Aufnahmerate r_{CO_2} betrug dabei knapp 15 mmol L^{-1} h^{-1} und wurde in einem Zeitraum von 36 - 44 h nach Inokulation erzielt. Nach 24 h sank der gemessene p_{CO_2} im Abgas erstmals merklich ab, wobei hier nach 34 - 40 h ein

minimaler CO_2-Partialdruck von 110 mbar gemessen wurde. Anschließend stieg der p_{CO_2} bis Prozessende wieder auf 116 mbar an. Die maximale H_2-Aufnahmerate von knapp 29 mmol L^{-1} h^{-1} wurde nach 38 h gemessen. Bis zum Prozessende nahm die H_2-Aufnahmerate auf final 14 mmol L^{-1} h^{-1} ab. Der H_2-Partialdruck sank im Prozessverlauf von anfänglich 480 mbar auf minimal 470 mbar nach 36 h. Der maximale CO_2-Umsatz betrug 17 %, während für H_2 lediglich ein Umsatz von 6 % bestimmt werden konnte.

Mit den während des gesamten Prozesses gebildeten Mengen an Biotrockenmasse sowie der Produkte Acetat, Ethanol und Formiat ließen sich mittels Abgasanalytik die integralen Kohlenstoff- sowie Elektronenbilanzen aufstellen. Innerhalb des Prozesszeitraumes wurden 0,63 mol Kohlenstoff aus CO_2 sowie 1,30 mol H_2 aufgenommen. Unter Berücksichtigung des im Reaktionsmedium in Form von Hefeextrakt enthaltenen Kohlenstoffs ergab sich für die Kohlenstoffbilanz für den CO_2/H_2-Prozess eine Wiederfindung von 97 % sowie für die Elektronenbilanz eine Wiederfindung von 99 %. Für den Gesamtprozess ergaben sich dabei substratspezifische Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten von $Y_{X,C}$ = 2,2 g mol_C^{-1} sowie $Y_{Acetat,C}$ = 27,5 g mol_C^{-1}.

6.2.3 Kohlenstoffmonoxid/Kohlenstoffdioxid

In diesem Prozess wurde überprüft, wie *C. aceticum* die Substrate CO/CO_2 in einem $CO/CO_2/N_2$-Gasgemisch mit den Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein} = p_{CO_2,ein}$ = 100 mbar und $p_{N_2,ein}$ = 800 mbar umsetzt. Für die übrigen Prozessparameter wurden die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Die resultierenden Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie die aus nichtlinearer Regression resultierenden Abschätzungen der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) sind in Abbildung 6.6 A - F und die aus der Abgasanalytik gewonnenen Daten der CO-, CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{CO_2}, r_{H_2}) sowie die zugehörigen Partialdruckverläufe (p_{CO}, p_{CO_2}, p_{H_2}) sind in Abbildung 6.7 A - F dargestellt. Zu Vergleichszwecken ist jeweils auch ein Datensatz des CO-Referenzprozesses ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar, siehe Abschnitt 6.2.1) aufgeführt.

Die exponentielle Phase wurde mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,13 h^{-1} für mindestens 11,3 h ermittelt. Direkt nach Inokulation mit 0,10 g L^{-1} Biotrockenmasse begann das exponentielle Wachstum von *C. aceticum*, welches für mindestens 10 h andauerte. Die höchste Biotrockenmassekonzentration von 2,10 g L^{-1} wurde nach etwa 48 - 56 h erreicht. Anschließend sank die Biotrockenmassekonzentration auf final 1,70 g L^{-1} nach 69 h ab. Acetat akkumulierte kontinuierlich im Reaktionsmedium bis zu Prozessende eine Konzentration von

13,3 g L^{-1} erreicht wurde. 0,47 g L^{-1} Formiat wurden direkt nach Inokulation innerhalb von 6 h gebildet und anschließend wieder abgebaut. Die weitere Akkumulation von Formiat konnte erst nach 46 h beobachtet werden. Bis Prozessende wurde hier eine Konzentration von 1,05 g L^{-1} erreicht. Ethanol wurde ab einer Prozesszeit von knapp 30 h zu sehr geringen Mengen gebildet. Die finale Ethanolkonzentration belief sich auf 0,11 g L^{-1}. Die abgeschätzte volumetrische Acetatbildungsrate r_{Acetat} zeigte einen Maximalwert von 0,42 g L^{-1} h^{-1}, welcher nach 26 h erzielt wurde. Die abgeschätzte zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} wies hingegen bereits nach 12 h einen Maximalwert von 0,36 g g^{-1} h^{-1} auf. Während der exponentiellen Phase konnte ein zellspezifischer Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,X}$ von 2,8 g g^{-1} ermittelt werden.

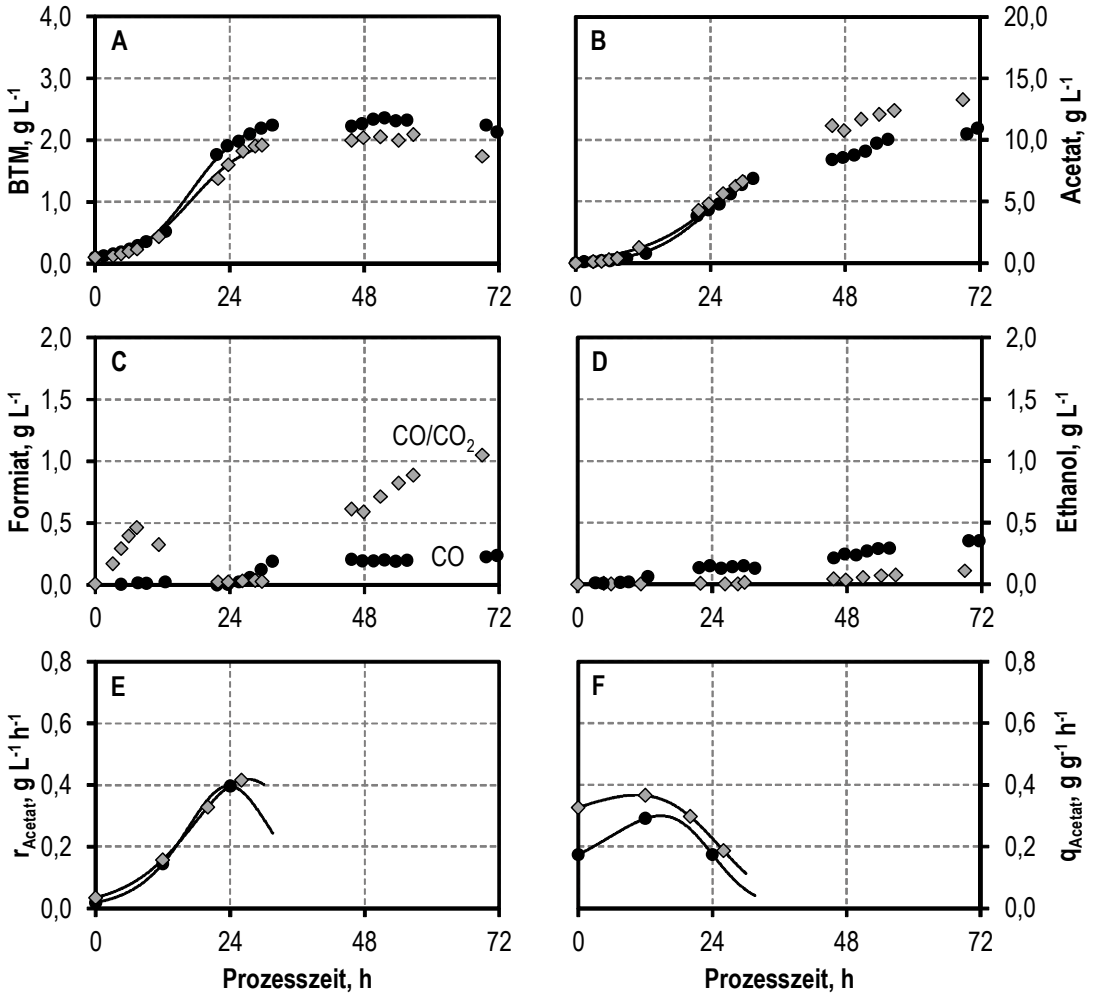

Abbildung 6.6: Autotropher CO/CO_2-Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (grau) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = $p_{CO2,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 800 mbar).

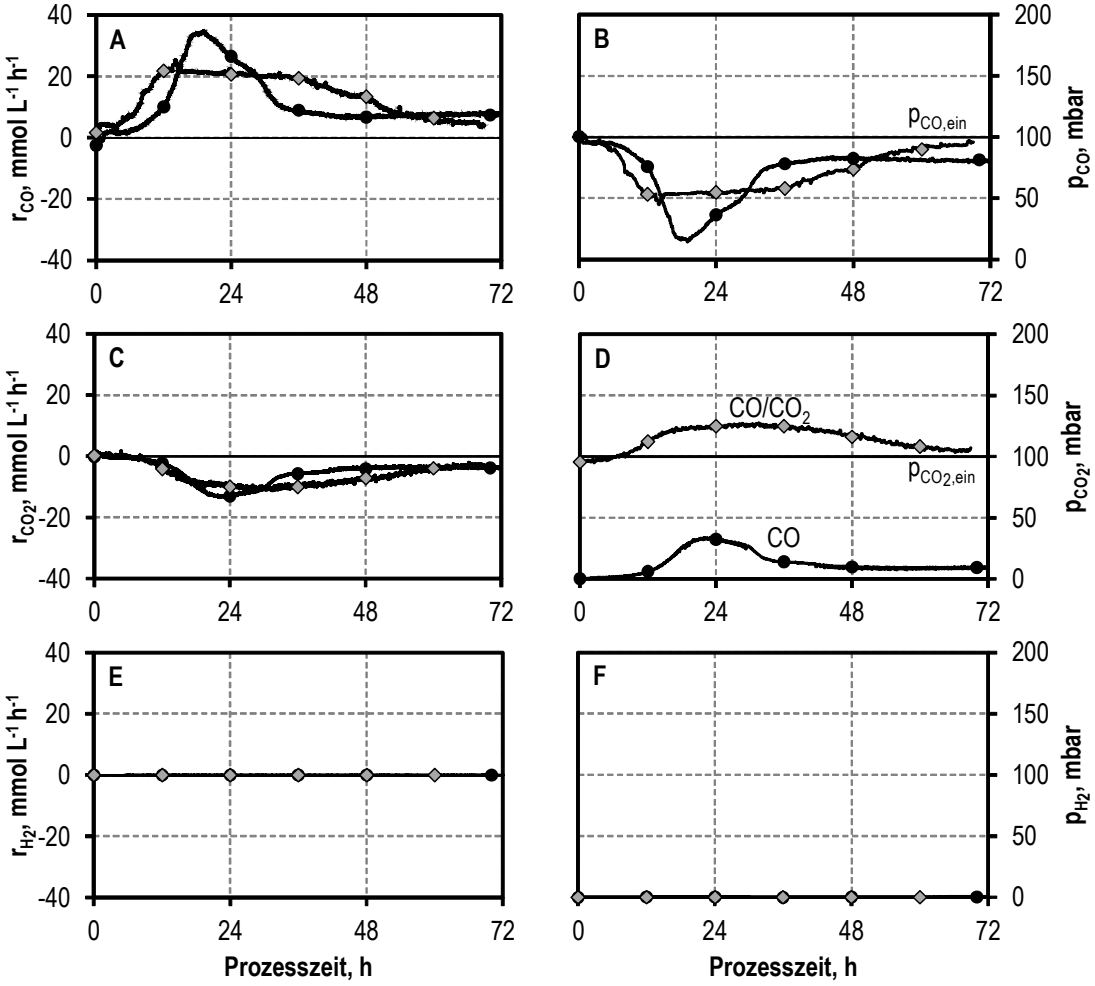

Abbildung 6.7: Abgasdaten des autotrophen CO/CO_2-Satzprozesses im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (grau) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus den Daten der Abgasanalytik, exemplarische Symbole dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = $p_{CO_2,ein}$ = 100 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 800 mbar).

CO wurde direkt nach Inokulation aufgenommen. Dabei konnte eine maximale Aufnahmerate r_{CO} von knapp 23 mmol L^{-1} h^{-1} nach etwa 12 h bestimmt werden. In der folgenden Prozesszeit sank die Aufnahmerate ab, sodass zu Prozessende eine Rate von lediglich ~3 mmol L^{-1} h^{-1} messbar war. Der CO-Partialdruck p_{CO} sank aufgrund der Substrataufnahme zunächst auf 45 mbar ab. Bis Prozessende stieg er jedoch wieder auf einen Endwert von 96 mbar an. Die Freisetzung von CO_2 konnte während des gesamten Prozessverlaufs festgestellt werden. Dabei betrug die maximale Bildungsrate etwa 10 mmol $L^{-1}h^{-1}$. Der p_{CO_2} stieg während des Prozesses von 100 mbar zu Prozessbeginn auf maximal 125 mbar nach 31 h. Zu Prozessende betrug der CO_2-Partialdruck noch 107 mbar. Weder Aufnahme noch Bildung von H_2 konnte für diesen Prozess beobachtet werden.

Über den gesamten Prozesszeitraum wurden 0,96 mol CO aufgenommen, wobei eine Bildung von 0,45 mol CO_2 berechnet wurde. Hieraus ergab sich für die integrale Kohlenstoff- sowie die Elektronenbilanz eine Wiederfindung von 95 % sowie 106 %. Die integralen substratspezifischen Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten ergaben sich zu $Y_{X,C}$ = 3,1 g mol_C^{-1} sowie $Y_{Acetat,C}$ = 25,1 g mol_C^{-1}. Zur höchsten CO-Aufnahmerate wurde ein CO-Umsatz von 56 % ermittelt.

6.2.4 Synthesegas

Als abschließende Untersuchung zur Substratumsetzung im kontrollierten Satzprozess mit kontinuierlicher Begasung wurde die Analyse der Umsetzung einer Synthesegasmischung $CO_2/H_2/CO/N_2$ mit den Eingangspartialdrücken $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar, $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar, $p_{CO,ein}$ = 100 mbar sowie $p_{N_2,ein}$ = 300 mbar durchgeführt. Für die übrigen Prozessparameter wurden die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Die resultierenden Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie die aus nichtlinearer Regression resultierenden Abschätzungen der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) sind in Abbildung 6.8 A - F und die aus der Abgasanalytik gewonnenen Daten der CO-, CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{CO_2}, r_{H_2}) sowie die zugehörigen Partialdruckverläufe (p_{CO}, p_{CO_2}, p_{H_2}) sind in Abbildung 6.9 A - F dargestellt. Zu Vergleichszwecken ist jeweils auch ein Datensatz des CO-Referenzprozesses ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar, siehe Abschnitt 6.2.1) aufgeführt.

Nach der Inokulation mit 0,10 g L^{-1} Biotrockenmasse begann die exponentielle Phase ohne Verzögerung mit einer spezifischen Wachstumsrate von μ = 0,13 h^{-1} für mindestens 6 h. Anschließend nahm die Wachstumsrate ab, sodass nach 28 h die stationäre Phase begann. Hier wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von etwa 1,50 g L^{-1} erreicht, welche nach 54 h langsam auf final 1,30 g L^{-1} zu Prozessende abnahm. Die Acetatbildung begann direkt nach Inokulation, wobei bis Prozessende 12,0 g L^{-1} akkumulierten. Hierdurch ergab sich für die exponentielle Phase ein zellspezifischer Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,X}$ von 2,7 g g^{-1}. Während der exponentiellen Phase war die Bildung von Formiat bis zu einer Konzentration von 0,43 g L^{-1} zu beobachten. Im Anschluss sank die Konzentration zunächst jedoch deutlich ab, ehe sie zu Prozessende wieder zunahm und final 0,98 g L^{-1} betrug. Ethanol wurde lediglich in Spuren gebildet, sodass zu Prozessende 0,07 g L^{-1} im Reaktionsmedium vorlagen. Die aus der nichtlinearen Regression abgeschätzte volumetrische Acetatbildungsrate r_{Acetat} wies nach 20 h ein Maximum von 0,38 g L^{-1} h^{-1} auf, während nach 14 h die abgeschätzte maximale zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} 0,35 g g^{-1} h^{-1} betrug.

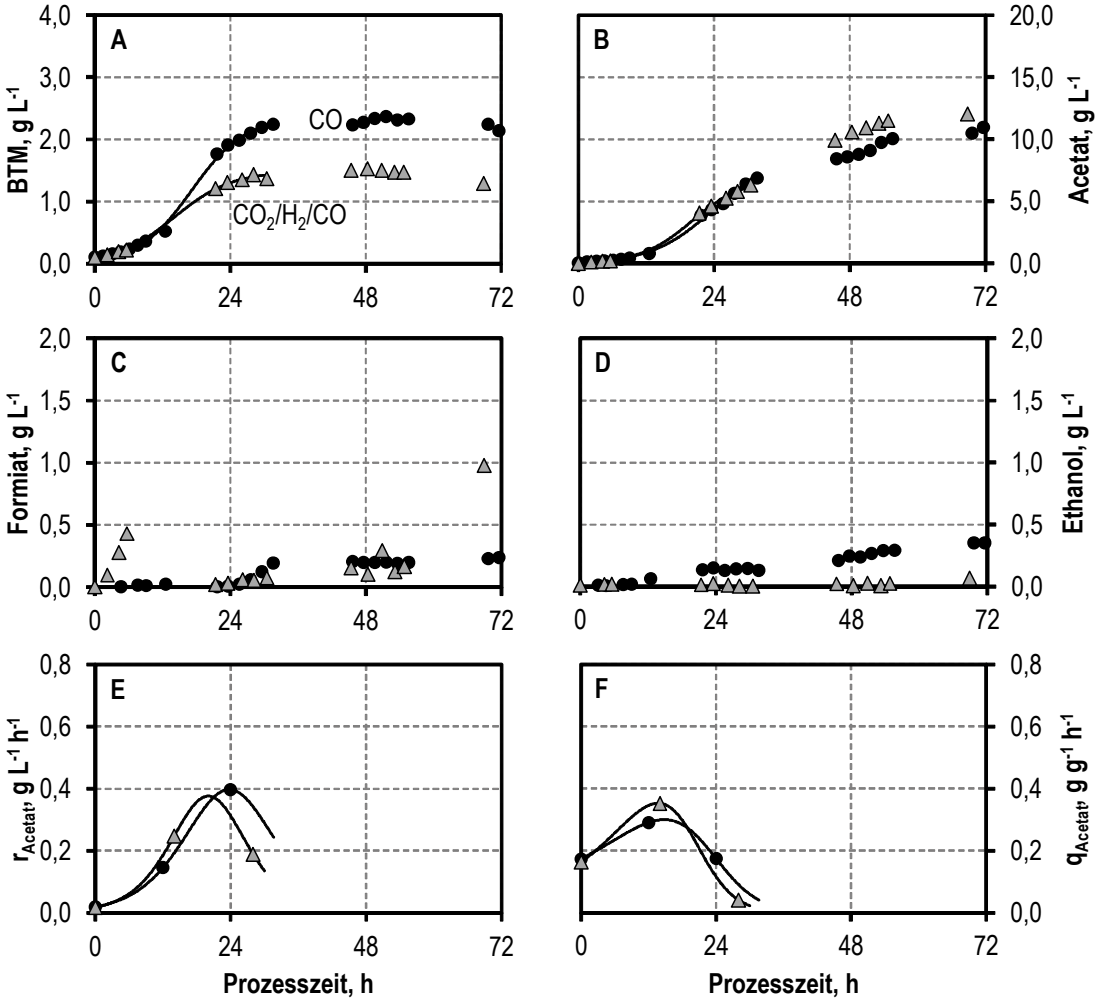

Abbildung 6.8: Autotropher $CO_2/H_2/CO$-Satzprozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (grau) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; $P\ V^{-1} = 6{,}8\ W\ L^{-1}$; $u = 2{,}4\ 10^{-4}\ m\ s^{-1}$; $p_{CO_2,ein} = 120$ mbar; $p_{H_2,ein} = 480$ mbar; $p_{CO,ein} = 100$ mbar; $p_{N_2,ein} = 300$ mbar).

Die Aufnahme von CO begann unmittelbar nach Inokulation. Die maximale Aufnahmerate von $r_{CO} = 20\ mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$ wurde dabei nach 15 h gemessen. Anschließend sank die Aufnahmerate langsam ab und erreichte zu Prozessende nur noch ~2 mmol $L^{-1}\ h^{-1}$. Der CO-Partialdruck p_{CO} sank zu Prozessbeginn schnell auf einen minimalen Wert von 50 mbar nach 15 h ab. Dieser Partialdruck blieb zunächst nahezu konstant, ehe er aufgrund verminderter Gasaufnahme wieder anstieg. CO_2 wurde im gesamten Prozessverlauf gebildet, was an negativen r_{CO_2}-Werten festgemacht werden konnte. Dabei wurde nach 15 h eine maximale Bildungsrate von 9 mmol $L^{-1}\ h^{-1}$ erreicht. Ab einer Prozesszeit von etwa 36 h sank die CO_2-Bildung merklich, sodass zu Prozessende ein r_{CO_2} von 0 mmol $L^{-1}\ h^{-1}$ ermittelt wurde.

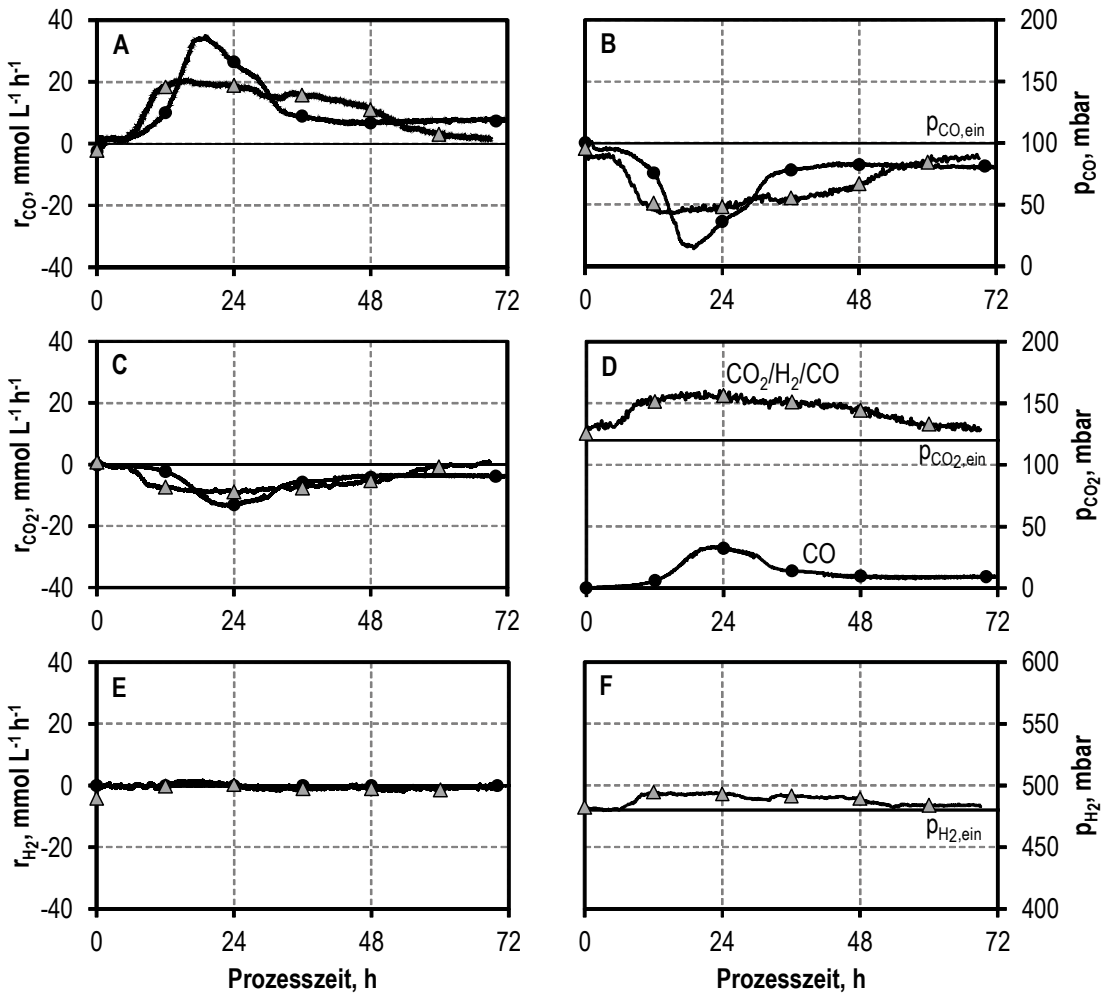

Abbildung 6.9: Abgasdaten des autotrophen $CO_2/H_2/CO$-Satzprozesses im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen (grau) im Vergleich zum CO-Referenzprozess (schwarz). Durchgezogene Linien resultieren aus den Daten der Abgasanalytik, exemplarische Symbole dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 300 mbar).

Der CO_2-Partialdruck p_{CO_2} stieg ab der Inokulation an, sodass ein maximaler Wert von 155 mbar nach etwa 20 h messbar war. Unter Berücksichtigung des Eingangspartialdrucks $p_{CO_2,ein}$ von 120 mbar fand demnach eine maximale Partialdruckerhöhung Δp_{CO_2} von 35 mbar statt. Für H_2 wurden während des gesamten Prozesses lediglich geringe Bildungs- und Aufnahmeratenraten zwischen 4 mmol L^{-1} h^{-1} und ~2 mmol L^{-1} h^{-1} beobachtet. Die Betrachtung des p_{H_2} zeigte eine maximale Erhöhung des Eingangspartialdruckes um 12 mbar auf einen p_{H_2} von 492 mbar. Ab einer Prozesszeit von 48 h sank dieser jedoch bis Prozessende wieder auf den Ausgangswert ab. Während des gesamten Prozesses wurden 0,77 mol CO aufgenommen, wobei 0,35 mol CO_2 entstanden. Anhand der Abgasanalytik errechnete sich für H_2 trotz der geringen Bildungsraten eine Nettobildung von 0,028 mol. Unter

Berücksichtigung des im Hefeextrakt enthaltenen Kohlenstoffs ließen sich die integralen Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen zu 104 % sowie 118 % schließen. Die substratspezifischen Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten für den Gesamtprozess ergaben sich zu $Y_{X,C}$ = 2,8 g mol_C^{-1} sowie $Y_{Acetat,C}$ = 28,6 g mol_C^{-1}. Der maximale CO-Umsatz betrug 56 %.

6.2.5 Diskussion

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Nutzung der unterschiedlichen Gase und Gasmischungen CO, CO_2/H_2, CO/CO_2 sowie $CO_2/H_2/CO$ durch *C. aceticum* untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse und ermittelten Zustandsgrößen sind in Tabelle 6.2 sowie normiert in Abbildung 6.10 zusammengestellt.

Tabelle 6.2: Vergleich autotropher Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor bei kontinuierlicher Begasung mit verschiedenen Gasen und Gasmischungen unter Standardbedingungen. Eingangspartialdrücke $p_{i,ein}$; Leerrohrgeschwindigkeit u; maximale Biotrockenmasse- (BTM_{max}) und Acetatkonzentrationen ($Acetat_{max}$); spezifische Wachstumsraten μ; abgeschätzte maximale zellspezifische und volumetrische Acetatbildungsraten q_{Acetat} und r_{Acetat}; zellspezifische Acetatausbeutekoeffizienten $Y_{Acetat,X}$; substratspezifische Biomasse- und Acetatausbeutekoeffizienten $Y_{X,C}$ und $Y_{Acetat,C}$ sowie die Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}).

Gas/Gasmischung	**CO**	**CO_2/H_2**	**CO/CO_2**	**$CO_2/H_2/CO$**
$p_{i,ein}$, mbar	100	120/480	100/100	120/480/100
u, 10^{-4}, m s^{-1}	2,4	6,0	2,4	2,4
BTM_{max}, g L^{-1}	**2,40 ± 0,03**	1,50	2,10	1,50
μ, h^{-1}	**0,13 ± 0,00**	0,06	**0,13**	**0,13**
$Acetat_{max}$, g L^{-1}	11,4 ± 0,58	**17,3**	13,3	12,0
q_{Acetat}, g g^{-1} h^{-1}	0,31 ± 0,02	**0,60**	0,36	0,35
r_{Acetat}, g L^{-1} h^{-1}	0,37 ± 0,03	0,4	**0,42**	0,38
$Y_{Acetat,X}$, g g^{-1}	2,4 ± 0,13	**10,0**	2,8	2,7
$Y_{X,C}$, g mol_C^{-1}	**4,3 ± 0,11**	2,2	3,1	2,8
$Y_{Acetat,C}$, g mol_C^{-1}	23,9 ± 0,77	27,5	25,1	**28,6**
Kohlenstoffbilanz, %	97 ± 2	97	95	104
Elektronenbilanz, %	107 ± 5	99	106	118

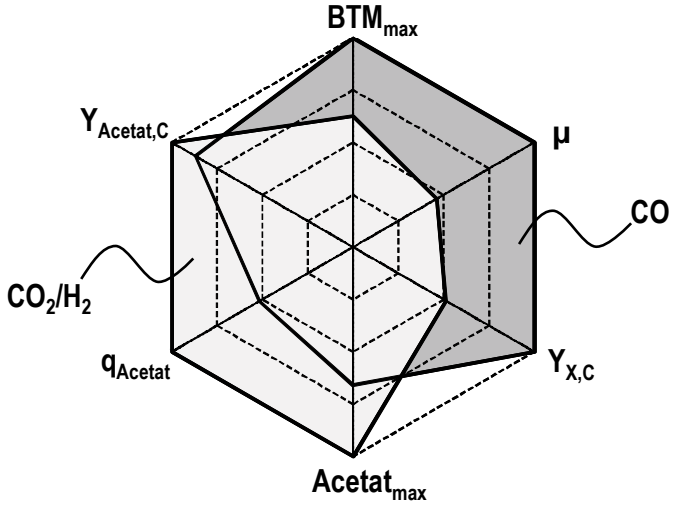

Abbildung 6.10: Vergleich autotropher Satzprozesse mit CO (dunkelgrau) und CO_2/H_2 (hellgrau). Normierte Zustandsgrößen: maximale Biotrockenmassekonzentration BTM_{max}; spezifische Wachstumsrate μ; substratspezifischer Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,C}$; maximale Acetatkonzentration $Acetat_{max}$; zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat}; substratspezifischer Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,C}$.

Kohlenstoffmonoxid

Bei der Umsetzung von CO konnten als weitere Stoffwechselprodukte neben Acetat noch Formiat und Ethanol, welche lediglich in geringen Konzentrationen gebildet wurden, identifiziert werden. Dabei ist die erstmalige autotrophe Bildung von Ethanol durch *C. aceticum* bei Nutzung von CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Die Bildung beider Nebenprodukte begann erst gegen Ende beziehungsweise im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase. Dies könnte darauf hinweisen, dass deren Bildung durch substratlimitierende oder inhibierende Faktoren induziert und der reduktive Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zur Acetat-Synthese oder zum Aufbau von Biomasse nicht störungsfrei durchlaufen wurde. Dies würde einerseits die Akkumulation des Stoffwechselintermediats Formiat als auch die Bildung von Ethanol erklären. Aufgrund der geringen Mengen Ethanol, welche parallel zur Acetatbildung gebildet wurden, kann nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob ausgehend vom Acetyl-CoA eine *de novo*-Synthese mittels Aldehyddehydrogenase stattfand oder ob zuvor produziertes Acetat mittels Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase weiter zu Ethanol reduziert wurde. In vielen Acetogenen sind die säurebildende und die solventogene Phase in Satzprozessen zeitlich getrennt, wobei die Solventogenese meist durch hohe Säurekonzentrationen und/oder der damit verbundenen Änderung des pH initiiert wird (Perez et al., 2013). Das Genom von *C. aceticum* weist Gene für Alkoholdehydrogenasen (CACET_c12170, c_16150, c_16870, c_29970, c_30240, c_36920, c_38630) sowie für eine Acetaldehyddehydrogenase (CACET_c30080) auf,

wohingegen bislang keine Gene für eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase nachzuweisen sind. Dies bestärkt die Theorie einer möglichen *de novo*-Synthese. Unabhängig vom Syntheseweg ermöglicht die Ethanolbildung jedoch keine ATP-Bildung. Allerdings verbraucht der Organismus zur Bildung eines Ethanolmoleküls vier weitere Reduktionsäquivalente, welche im Falle einer verminderten Acetat- oder Biomassesynthese auf diesem Wege regeneriert werden könnten (Ramió-Pujol et al., 2015; Schuchmann & Müller, 2014). Die Konzentrationsverläufe für die Produkte Formiat und Ethanol zeigten im Vergleich zu Acetat größere Abweichungen bei den drei Reproduktionsexperimenten.

Weiterhin fiel das Maximum der zellspezifischen Acetatbildungsraten aufgrund der wachstumsassoziierten Produktbildung mit dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase zusammen. Das Maximum der volumetrischen Acetatbildungsraten hingegen fiel zeitlich auf die Übergangsphase zur stationären Phase beziehungsweise auf deren Beginn. Dies ist ebenfalls für andere Acetogene, wie beispielsweise *Clostridium magnum* oder *Acetobacterium woodii*, bekannt (Groher & Weuster-Botz, 2016b; Kantzow, 2015). Im Vergleich zu Literaturdaten von Gasfermentationen mit CO mit diskontinuierlicher Begasung konnte die volumetrische Acetatbildungsrate für *C. aceticum* jedoch deutlich um den Faktor 19 gesteigert werden (Sim & Kamaruddin, 2008). Erklärbar ist dies durch den höheren Massentransfer von der Gas- in die Flüssigphase aufgrund des höheren volumetrischen Leistungseintrages im Rührkesselreaktor im Vergleich zu geschüttelten Anaerobflaschen.

Ebenfalls gute Reproduzierbarkeit zeigte sich auch bei Betrachtung der Substrataufnahmerate r_{CO}. Dies ist dadurch zu erklären, dass das aufgenommene CO insbesondere der Fixierung von Kohlenstoff in Biomasse und dem Primärprodukt Acetat diente, während die Nebenprodukte, bei denen die Abweichungen bei den Triplikaten verhältnismäßig höher waren, aufgrund der geringen Konzentrationen keinen großen Einfluss zeigten. Bei allen Satzprozessen wurde das aufgenommene CO jedoch nicht vollständig in Biomasse oder Produkten fixiert. Gemäß Gleichung 3.5 werden bei der Bildung eines Moleküls Acetat aus 4 Molekülen CO auch 2 Moleküle CO_2 frei. Dass das entstehende CO_2 durch *C. aceticum* nicht weiter fixiert werden konnte zeigte sich dabei einerseits am Verhältnis $r_{CO} \cdot r_{CO_2}^{-1}$, welches für alle drei Satzprozesse nahezu dem theoretischen Wert von 2 entsprach. Andererseits führte dies auch zum Anstieg des CO_2-Partialdruckes im Abgas (Daniell et al., 2012). Gemäß dem theoretischen Umsatz von CO als alleiniges Substrat konnte auch weder Aufnahme noch Bildung von H_2 beobachtet werden. Die integralen Kohlenstoff- und Elektronenbilanzen konnten gut geschlossen werden und bestätigten, dass keine weiteren, nicht detektierten Nebenprodukte während des Prozesses gebildet wurden.

Nicht endgültig geklärt werden kann an dieser Stelle die Ursache für den für Satzprozesse an sich typischen Prozessverlauf mit stationärer Phase sowie Absterbephase trotz kontinuierlicher Zufuhr des gasförmigen Substrates CO. Dies weist darauf hin, dass andere Medienbestandteile, etwa essentielle Vitamine oder Spurenelemente, limitierend oder verbraucht waren, was auch durch die in den Voruntersuchungen zur Nutzung von Komplexbestandteilen gewonnenen Erkenntnisse erhärtet wird (siehe Abschnitt 5.1.2) (Groher & Weuster-Botz, 2016a; Leclerc et al., 1998; Saxena & Tanner, 2011). Dies würde auch das Maximum der CO-Aufnahmerate am Ende der exponentiellen Phase und deren Abnahme im weiteren Prozessverlauf erklären. Andererseits könnte sich im Satzprozess durch Akkumulation auch die in den Voruntersuchungen beobachtete Produktinhibierung durch Acetat (siehe Abschnitt 5.3) negativ auf Produktbildung und Wachstum ausgewirkt haben.

Kohlenstoffdioxid/Wasserstoff

Bei Nutzung von CO_2 als Kohlenstoff- und H_2 als Energiequelle war ein verzögerungsfreies Anwachsen von *C. aceticum* im kontrollierten Rührkesselreaktor möglich. Im Vergleich zum CO-Referenzprozess (μ = 0,13 h^{-1}) war die Wachstumsrate mit 0,06 h^{-1} jedoch um mehr als 50 % verringert. Auch betrug die maximale Biotrockenmassekonzentration mit 1,50 g L^{-1} lediglich 63 % der maximalen Biotrockenmassekonzentration des CO-Prozesses. Bei Betrachtung des Primärproduktes Acetat zeigte sich, dass dieses im CO_2/H_2-Prozess mit deutlich höheren zellspezifischen Produktbildungsraten von bis zu 0,6 g g^{-1} h^{-1} gebildet wurde. Dies spiegelt sich ebenfalls im Vergleich der biomassespezifischen Acetatausbeute-koeffizienten in der exponentiellen Phase $Y_{Acetat,X}$ wider, welcher im CO_2/H_2-Prozess um den Faktor 4,2 höher war als im CO-Prozess. Dabei war die maximale volumetrische Acetatbildungsrate vergleichbar hoch wie im CO-Prozess. Dass Acetat im selben Zeitraum dennoch zu höheren Konzentrationen akkumulierte, resultiert daraus, dass die Acetatbildungsrate erst zu späterer Prozesszeit abnahm. Hieraus folgte bei vergleichbaren Prozesszeiten eine Steigerung der finalen Acetatkonzentration um 42 % im Vergleich zum CO-Prozess. Die Nebenprodukte Formiat und Ethanol hingegen scheint *C. aceticum* mit dem Substratgas CO_2/H_2 auch nach der exponentiellen Phase nicht zu bilden. Dies bestärkt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass diese Nebenprodukte nur mit CO als mögliche Folge eines Ungleichgewichts im reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg gebildet wurden.

Die Betrachtung der Gasaufnahmeraten für CO_2 und H_2 zeigte, dass *C. aceticum* mit diesen Substraten autotrophen Stoffwechsel zur Acetatbildung betreibt. Dabei findet sich das theoretische Verhältnis bei der Umsetzung von CO_2/H_2 zu Acetat von $r_{CO_2} \cdot r_{H_2}^{-1} = 0{,}5$ auch annähernd in den ermittelten Aufnahmeraten und Mengen wieder (siehe Gleichung 3.4). Die maximalen Werte der Aufnahmeraten r_{CO_2} und r_{H_2} fielen zeitlich mit der abgeschätzten

maximalen volumetrischen Acetatbildungsrate r_{Acetat} zusammen. Dies ist damit zu erklären, dass die Menge in Produkt fixierten Kohlenstoffs im Verhältnis zur Biomasse deutlich überwiegt. Wie auch zuvor im CO-Prozess nahmen die Substrataufnahmeraten anschließend deutlich ab, was durch die verringerte Biomasse- und Produktbildung zu erklären ist. Im Vergleich zum CO-Prozess wird im selben Zeitraum 40 % mehr Kohlenstoff aus dem Substratgas in Produkten und Biomasse fixiert. Andererseits betrug der substratspezifische Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,C}$ im Vergleich zum CO-Prozess lediglich 46 %. Das schlechtere Wachstumsverhalten könnte durch die geringere freie Standardenthalpie $\Delta G^{0'}$ erklärt werden, welche für die Bildung von Acetat aus CO ($\Delta G^{0'}$ = -175 kJ mol^{-1}) deutlich höher ist als für die Gase CO_2/H_2 ($\Delta G^{0'}$ = -95 kJ mol^{-1}). Die höhere Energie- und damit theoretisch höhere ATP-Ausbeute pro Mol fixiertem Kohlenstoff mit dem Substrat CO, welche für den Aufbau von Biomasse sowie für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt wird, resultierte daher in höheren substratspezifischen Biomasseausbeuten im Vergleich zu CO_2/H_2. Andererseits macht die geringere Energieausbeute mit CO_2/H_2 eine erhöhte Acetatbildung zur Gewinnung derselben Energiemengen nötig, was eine Erklärung für die deutlich höhere zellspezifische Acetatbildungsrate sowie den höheren biomassespezifischen Acetatausbeutekoeffizienten darstellt. Weiterhin muss CO_2 bei Einschleusen in den Carbonyl-Zweig zunächst reduziert werden, wofür der Organismus 2 weitere Reduktionsäquivalente aufwenden muss (siehe Abschnitt 3.1.3). Beide Theorien würden die höhere Effizienz bei der Biomassebildung bei gleichzeitig niedrigeren zellspezifischen Produktbildungsraten mit dem Substrat CO im Vergleich zu CO_2/H_2 erklären, was ebenfalls für andere Acetogene beschrieben ist (Daniel et al., 1990; Ragsdale & Pierce, 2008; Savage et al., 1987). In kontrollierten autotrophen Rührkesselreaktoren mit CO_2/H_2 (1:4) erzielten Kantzow et al. (2015) mit *A. woodii* eine maximale zellspezifische Acetatbildungsrate von 0,69 g g^{-1} h^{-1} bei höherem Leistungseintrag (~11,7 W L^{-1}), wohingegen Groher und Weuster-Botz (2016b) ebenfalls mit *A. woodii* bei geringerem Leistungseintrag (~1,5 W L^{-1}) eine maximale zellspezifische Acetatbildungsrate von 1,02 g g^{-1} h^{-1} erzielen konnten (Groher & Weuster-Botz, 2016b; Kantzow et al., 2015).

Kohlenstoffmonoxid/Kohlenstoffdioxid

Mit den Substraten CO/CO_2 war ein verzögerungsfreies Anwachsen von *C. aceticum* im autotrophen Rührkesselreaktor zu beobachten. Dabei wurde dieselbe Wachstumsrate ermittelt, wie auch im CO-Referenzprozess. Im Vergleich zu diesem war die maximale Biotrockenmassekonzentration hingegen um 12,5 % auf 2,10 g L^{-1} reduziert. Die abgeschätzten volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten sowie der zellspezifische Acetatausbeutekoeffizient waren hingegen leicht höher als im CO-Referenzprozess, weshalb trotz geringerer Biotrockenmassekonzentration eine gesteigerte

Acetatbildung beobachtet werden konnte. Bemerkenswert im Vergleich zu den CO-Referenzprozessen sowie der Umsetzung von CO_2/H_2 war die anfängliche schnelle Akkumulation von Formiat mit anschließendem Verbrauch. Dies könnte darauf hinweisen, dass zu Prozessbeginn ein Ungleichgewicht im reduktiven Acetyl-CoA-Weg vorlag, wobei eine Reaktion im Methyl-Zweig der limitierende Schritt gewesen sein könnte (Peters et al., 1999). Der anschließende Verbrauch weist auf die Anpassung an die Prozessbedingungen hin. Ethanol wurde lediglich zu sehr geringen Konzentrationen gebildet, wobei die Bildung, so wie bei der Umsetzung von CO, erst im Anschluss an die exponentielle Phase beobachtet werden konnte.

Die maximale CO-Aufnahmerate war im Vergleich zum CO-Referenzprozess reduziert, was auf die geringere Biotrockenmassekonzentration zurückzuführen ist. Das integrale Verhältnis $r_{CO} \cdot r_{CO_2}^{-1}$ wies einen Wert von 2,24 auf und entsprach demnach nahezu dem theoretischen Umsatz von CO zu Acetat. Andererseits war der substratspezifische Biomasseausbeutekoeffizient im Vergleich zu den CO-Referenzprozessen deutlich reduziert und lag mit einem Wert von 3,1 g mol_C^{-1} zwischen den CO-Prozessen (4,3 g mol_C^{-1}) und dem CO_2/H_2-Prozess (2,2 g mol_C^{-1}). Dies könnte darauf hindeuten, dass CO_2 trotz der berechneten Nettobildung in geringen Mengen zur Kohlenstofffixierung verwendet wurde. Theoretisch ist die direkte Nutzung von CO_2 für den Methyl-Zweig des reduktiven Acetyl-CoA-Weges möglich (siehe Abschnitt 3.1.3). Da hierbei jedoch keine Reduktionsäquivalente generiert werden, könnte dies in der Folge zu einem Ungleichgewicht der Reduktionsäquivalente führen und damit eine mögliche Ursache für die anfängliche Formiatakkumulation darstellen. Ebenfalls könnte dies den schlechteren maximalen Umsatz von CO von 56 % im Vergleich zu den CO-Referenzprozessen (84 ± 2 %) erklären. Dieser Theorie konnte in dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen werden und bedarf weiterer wissenschaftlicher Aufklärung, beispielsweise mittels Kohlenstofffixierungsanalyse mit markiertem CO_2 (Linke, 1969).

Synthesegas

Für den Synthesegasprozess mit $CO_2/H_2/CO$ (1,2:4,8:1) wurden zunächst die in den bisherigen Prozessen gewählten Eingangspartialdrücke der jeweiligen Gase verwendet. Ebenso wie in den CO-, CO_2/H_2- und CO/CO_2-Prozessen wurde das verzögerungsfreie Anwachsen von *C. aceticum* unter autotrophen Bedingungen beobachtet. Dabei wurde in der exponentiellen Phase mit 0,13 h^{-1} dieselbe Wachstumsrate erreicht wie zuvor im CO-Prozess. Im Vergleich zu diesem betrug die maximal erzielte Biotrockenmassekonzentration jedoch lediglich 63 %, so wie auch im CO_2/H_2-Prozess. Die Betrachtung der Primärproduktbildung zeigte hingegen große Ähnlichkeit zum CO-Prozess was die erzielte finale Acetatkonzentration sowie die abgeschätzten zellspezifischen Acetatbildungsraten betrifft. Dies spiegelte sich

ebenfalls im zellspezifischen Acetatausbeutekoeffizienten für die exponentielle Wachstumsphase wider, welche lediglich um 13 % voneinander abwichen. Auffällig war zudem die initiale Bildung von Formiat mit anschließendem Verbrauch, welche auch zuvor im CO/CO_2-Prozess beobachtet werden konnte. Die kurzzeitige Akkumulation dieses Stoffwechselintermediats trat bei den durchgeführten Untersuchungen somit lediglich bei Gasmischungen auf, welche neben CO auch CO_2 enthielten. Ethanol wurde im Vergleich zum reinen CO-Prozess hingegen lediglich in Spuren gebildet.

Durch die verringerte Biotrockenmassekonzentration war im Vergleich zum CO-Prozess die CO-Aufnahme ebenfalls reduziert, was zum deutlich reduzierten CO-Umsatz im Vergleich zu den CO-Referenzprozessen geführt hatte. Allerdings wurde im Vergleich zum CO/CO_2-Prozess derselbe maximale CO-Umsatz von 56 % erreicht. Die Nettobildung von CO_2 im nahezu stöchiometrischen Verhältnis der Acetatsynthese mit CO, die fehlende Verwertung von H_2 sowie die für das Substrat CO typische Wachstumsrate weisen darauf hin, dass *C. aceticum* bei einem Gasgemisch aus $CO_2/H_2/CO$ bevorzugt CO für den autotrophen Stoffwechsel verwendet. Dies könnte einerseits dadurch begründet sein, dass CO im Vergleich zu H_2, unabhängig von Reaktionsbedingungen wie pH, Ionenstärke oder Partialdrücken, die thermodynamisch günstigere Elektronenquelle darstellt (Hu et al., 2011). Andererseits ist von Fe-abhängigen Hydrogenasen, wie sie auch im Genom von *C. aceticum* vorhanden sind (CACET_c03920-c03940, CACET_c07230-c07250, CACET_c32700-c32740, CACET_ c35700-c35750), bekannt, dass deren Aktivität in Anwesenheit von CO reversibel inhibiert wird (Bennett et al., 2000; Greco et al., 2007; Matsumoto et al., 2011; Poehlein et al., 2015). In diesem Fall wäre eine simultane Nutzung von CO und H_2 als Elektronenquellen und somit der möglichst vollständige Umsatz der gasförmigen Substrate in einem Synthesegasgemisch bestehend aus $CO_2/H_2/CO$ wie beobachtet ohne räumliche Entkopplung nicht möglich.

6.3 Energiestoffwechsel*

Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 verdeutlicht findet bei acetogenen Mikroorganismen im reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg keine Energiekonservierung über Substratkettenphosphorylierung statt. Vielmehr ist die Energiekonservierung an den Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten $\Delta\mu_i$ mittels membranassoziierten Enzymkomplexen gekoppelt, wobei als translozierte Ionen bisher entweder Protonen oder Na^+-Ionen identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.4). Bei den bisher entdeckten membranassoziierten Enzymkomplexen handelte es sich entweder um Ferredoxin:NAD^+-Oxidoreduktasen (Rnf-Komplex) oder um Ferredoxin:H^+-Oxidoreduktasen (Ech-Komplex), welche als Elektronenüberträger Ferredoxin nutzen.

Durch die Aufklärung des Genoms ist bekannt, dass *C. aceticum* sowohl Gene für einen Rnf-Komplex als auch zur Synthese von Cytochromen besitzt. Letztere wurden bislang jedoch nur bei Acetogenen nachgewiesen, welche einen Ech-Komplex aufweisen. Acetogene, welche über Cytochrome sowie einen Ech-Komplex verfügen, besitzen zudem Quinonen, welche zusammen mit den Cytochromen zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt werden. *C. aceticum* stellt demnach einen Sonderfall dar, da er der erste acetogene Mikroorganismus ist, der sowohl über einen Rnf-Komplex als auch über Cytochrome verfügen könnte und andererseits jedoch keine Gene für die Synthese von Quinonen trägt.

6.3.1 Natriumbedarf

Bei Na^+-abhängigen Acetogenen sind die Energiekonservierung aber auch andere metabolische Prozesse, beispielsweise Fortbewegungsprozesse, an den Aufbau eines Na^+-Gradienten gekoppelt. Daher ist es nicht überraschend, dass bei autotrophen Kultivierungsprozessen mit diesen Organismen die Natriumkonzentration im Reaktionsmedium von entscheidender Rolle sein kann. Untersuchungen zum Einfluss von Natrium auf das Wachstums- und Produktbildungsverhalten könnten demnach erste Hinweise darauf geben, ob der zu charakterisierende Mikroorganismus *C. aceticum* eine Na^+-Abhängigkeit aufweist.

*Teile dieses Abschnitts sind publiziert in: Mayer & Weuster-Botz (2017); Reaction engineering analysis of the autotrophic energy metabolism of *Clostridium aceticum*. *FEMS Microbiology Letters* 364: fnx219; https://doi.org/10.1093/femsle/fnx219

Natriumhydrogencarbonat

In kontrollierten autotrophen Satzprozessen wurde zunächst der Einfluss von $NaHCO_3$ im Reaktionsmedium sowohl für CO-Prozesse ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar) als auch für CO_2/H_2-Prozesse ($p_{CO2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N2,ein}$ = 400 mbar) untersucht. Anders als im bisherigen CO-Referenzprozess (siehe Abschnitt 6.2.1) wurde dabei $NaHCO_3$ im Reaktionsmedium nicht äquimolar durch NaCl ersetzt. Weiterhin wurde in einem weiteren CO-Prozess $NaHCO_3$ ersatzlos aus dem Reaktionsmedium entfernt. In einem CO_2/H_2-Prozess wurde zudem $NaHCO_3$ äquimolar durch $KHCO_3$ ersetzt. Hierdurch wurde überprüft, ob der Austausch des Kations einen Einfluss auf den Satzprozess zeigt. Für die übrigen Prozessparameter wurden für alle unabhängigen Satzprozesse die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Die resultierenden Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen sowie die CO- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{H2}) sind in Abbildung 6.11 A - F dargestellt. Vergleichend ist weiterhin der Prozessverlauf des bereits vorgestellten CO_2/H_2-Referenzprozesses mit $NaHCO_3$ im Reaktionsmedium dargestellt (siehe Abschnitt 6.2.2).

Im CO-Prozess mit 10 g L^{-1} $NaHCO_3$ im Reaktionsmedium betrug die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase 0,12 h^{-1}. Die maximale Biotrockenmassekonzentration von 2,0 g L^{-1} wurde nach etwa 48 h erreicht und fiel anschließend bis Prozessende nach 72 h auf 1,7 g L^{-1} ab. Acetat wurde von Prozessbeginn an gebildet und akkumulierte bis zu Prozessende auf 15,7 g L^{-1}. Die CO-Aufnahmerate r_{CO} zeigte nach 17 h einen maximalen Wert von 32 mmol L^{-1} h^{-1}. Bis Prozessende fiel die Aufnahmerate jedoch auf ~8 mmol L^{-1} h^{-1} ab.

Im Gegensatz hierzu war im CO-Satzprozess ohne $NaHCO_3$ im Reaktionsmedium über 70 h weder eine Zunahme der Biotrockenmasse- noch der Acetatkonzentration zu verzeichnen. Eine Aufnahme von CO konnte nicht beobachtet werden.

Im CO_2/H_2-Prozess, bei dem $NaHCO_3$ äquimolar durch $KHCO_3$ ersetzt wurde, war über einen Prozesszeitraum von 45 h weder die Zunahme der Biotrockenmasse- noch der Acetatkonzentration festzustellen. Die Aufnahme von Substrat konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Diskussion

Beim CO-Prozess mit $NaHCO_3$ fielen Wachstum und Produktbildung ähnlich hoch aus wie zuvor im CO-Referenzprozess, wobei die Biotrockenmassekonzentration etwas verringert und die Acetatkonzentration etwas erhöht waren (siehe Abschnitt 6.2.1). Im Prozess ohne $NaHCO_3$ konnte hingegen über 72 h lang weder Wachstum noch Produktbildung oder

Substrataufnahme beobachtet werden. Der Vergleich zeigte demnach deutlich, dass $NaHCO_3$ eine essentielle Medienkomponente für autotrophe Prozesse mit *C. aceticum* darstellt. Weiterhin zeigte der Einsatz von $KHCO_3$ statt $NaHCO_3$ im CO_2/H_2-Prozess, dass das Kation und nicht das Hydrogencarbonat, beispielsweise als zusätzliche Kohlenstoffquelle, von entscheidender Bedeutung für *C. aceticum* zu sein scheint und dass somit Na^+ nicht durch K^+ ersetzt werden konnte.

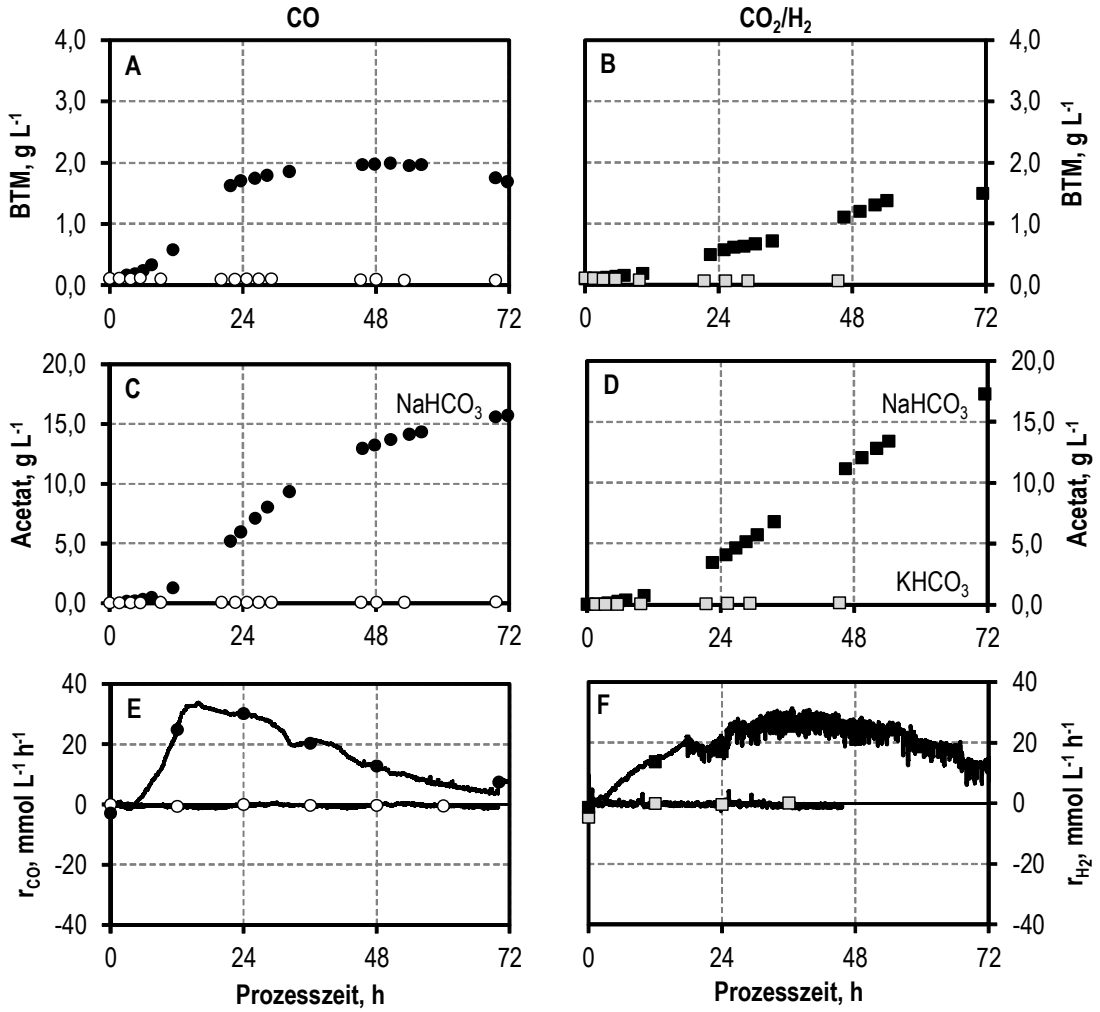

Abbildung 6.11: Autotrophe CO- (A, C, E) und CO_2/H_2-Satzprozesse (B, D, F) im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* bei Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein}$ = 100 mbar und $p_{N2,ein}$ = 900 mbar (A, C, E) sowie $p_{CO2,ein}$ = 120 mbar, $p_{H2,ein}$ = 480 mbar und $p_{N2,ein}$ = 400 mbar (B, D, F) unter Standardbedingungen mit $NaHCO_3$ (●,■), ohne $NaHCO_3$ (○) sowie mit äquimolarem Austausch durch $KHCO_3$ (▩). Exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Natriumkonzentration

Um den Bedarf von Na^+ näher zu untersuchen wurde in unabhängigen Satzprozessen mit CO als alleinigem Substrat ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar) die Natriumkonzentration im Reaktionsmedium durch Einstellen entsprechender NaCl-Konzentrationen zwischen 0 mM und 179 mM variiert. Für die übrigen Prozessparameter wurden für alle Prozesse die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Eine vollständige Übersicht über die erzielten spezifischen Wachstumsraten μ sowie die maximalen Biotrockenmasse- (BTM_{max}) und Acetatkonzentrationen ($Acetat_{max}$) aller Prozesse während Prozesszeiten von 70 h ist in Abbildung 6.12 dargestellt.

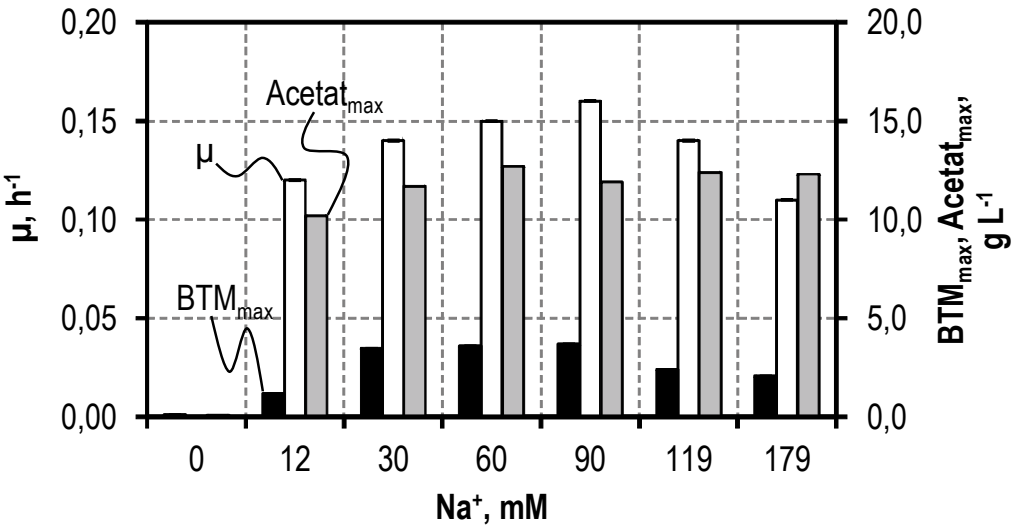

Abbildung 6.12: Autotrophe CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit variierten Na^+-Konzentrationen im Reaktionsmedium zwischen 0 mM bis 179 mM. Maximal erzielte Biotrockenmassekonzentrationen BTM_{max} (schwarz); ermittelte spezifische Wachstumsraten in der exponentiellen Phase μ (weiß); maximal erzielte Acetatkonzentrationen $Acetat_{max}$ (grau) (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar).

Bereits bei einer Na^+-Konzentration von 12 mM konnte im autotrophen Satzprozess Wachstum festgestellt werden. Dabei betrug die spezifische Wachstumsrate 0,12 h^{-1}, während sich die maximale Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen auf 1,2 g L^{-1} und 10,2 g L^{-1} beliefen. Bei Erhöhung der Natriumkonzentrationen auf 30 - 90 mM stiegen die Wachstumsraten auf 0,14 - 0,16 h^{-1} und die maximal erzielten Biotrockenmassekonzentrationen auf 3,5 - 3,7 g L^{-1} an. Die erzielten maximalen Acetatkonzentrationen hingegen zeigten bei 60 mM Na^+ ein Maximum von 12,7 g L^{-1}. Bei weiterer Erhöhung sanken sowohl die Wachstumsraten als auch

die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen: bei 119 mM Na^+ betrugen die spezifische Wachstumsrate und die maximale Biotrockenmassekonzentration $\mu = 0{,}13\ h^{-1}$ sowie $BTM_{max} = 2{,}4\ g\ L^{-1}$ und bei 179 mM Na^+ war $\mu = 0{,}12\ h^{-1}$ und $BTM_{max} = 2{,}1\ g\ L^{-1}$. Die finalen Acetatkonzentrationen wurden bei diesen Natriumkonzentrationen jedoch kaum erhöht und betrugen 12,4 g L^{-1} sowie 12,3 g L^{-1}.

Diskussion

Durch Variation der Natriumkonzentration im Reaktionsmedium konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Natriumkonzentrationen von 12 mM im Reaktionsmedium ausreichend waren, um autotrophes Wachstum und Produktbildung von *C. aceticum* zu ermöglichen. Durch weitere Steigerung der Natriumkonzentration konnte zudem für kontrollierte autotrophe Satzprozesse mit kontinuierlicher CO-Begasung ein optimaler Na^+-Konzentrationsbereich von 30 - 90 mM für maximale Biotrockenmassekonzentrationen und Wachstumsraten identifiziert werden. Dieser deutliche Einfluss der Natriumkonzentration sowie das Vorhandensein von Genen des Rnf-Komplexes (CACET_c16320-c16370) im Genom legte zunächst den Verdacht nahe, dass *C. aceticum* einen Na^+-abhängigen Energiestoffwechsel aufweisen könnte. In diesem Fall würde ein Na^+-Gradient zur Energiekonservierung mittels membranständiger Na^+-abhängiger ATPase genutzt werden. Dies konnte beispielsweise auch für *A. woodii* gezeigt werden, bei dem nicht nur die Energiekonservierung auf dem Aufbau eines Na^+-Gradienten beruht, sondern der diesen auch zur Fortbewegung mittels Flagellen nutzt (Heise et al., 1989; Poehlein et al., 2012). Dabei zeigen neben *A. woodii* auch andere Acetogene, etwa *A. kivui* oder *Peptostreptococcus productus*, dass die Na^+-Konzentration im Reaktionsmedium einen Einfluss auf Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen ausübt (Geerligs et al., 1989; Kantzow, 2015; Yang & Drake, 1990). Andererseits wurde bei *C. aceticum* die maximale Acetatkonzentration nur geringfügig von der Variation der Natriumkonzentration beeinflusst und die im Genom gefundenen Gene für die membranständige ATPase (CACET_c02160-c02220) weist keine Na^+-Bindestelle auf. Dies spricht wiederum dafür, dass der reduktive Acetyl-CoA-Weg nicht direkt durch die Natriumionenkonzentration beeinflusst wird und somit kein primärer Na^+-Gradient zur Energiekonservierung genutzt werden würde (Meier et al., 2006; Poehlein et al., 2015; Rahlfs et al., 1999). Natriumionen spielen jedoch auch für andere zelluläre Prozesse, etwa bei der Regulierung des Ionenhaushalts, der Fortbewegung, der Homöostase oder bei selektiven Transportvorgängen eine wichtige Rolle (Munk, 2008). Die im Genom von *C. aceticum* auffindbaren Gene für den Antrieb von Flagellen, Mot A und Mot B (CACET c02760, c02770, c20250, c20260), sind bei Mikroorgansimen weit verbreitet und in der Regel H^+-abhängig. *A. woodii*, welches ebenfalls diese Gene zur flagellaren Fortbewegung (AWO c25150, c25160) besitzt, zeigt hingegen eine klare Na^+-Abhängigkeit der Flagellen.

Aufgrund dessen könnte auch *C. aceticum* eine Na^+-abhängige Fortbewegung besitzen (Asai et al., 2003; Müller & Bowien, 1995; Schmidt et al., 2009). Weiterhin zeigt *C. aceticum* auch Gene für H^+/Na^+-Antiporter (CACET_c29680-29750; CACET_c33270-33340), welche möglicherweise dem Aufbau eines sekundären Natriumgradienten dienen, welcher wiederum zum Antrieb der Flagellen genutzt werden könnte. Ebenfalls ist bekannt, dass H^+/Na^+-Antiporter zur Homöostase, also der Aufrechterhaltung des zellinternen Millieus, wie pH, Osmolarität oder Redoxstatus, benötigt werden. Die für *C. aceticum* bereits bei relativ niedrigen Acetatkonzentrationen einsetzende Produktinhibierung (siehe Abschnitt 5.3) zeigt, dass dies bei diesem Organismus womöglich ein kritischer und wichtiger Vorgang sein könnte, durch dessen Störung das Zellwachstum schnell inhibiert wird. Aufgrund der Gene für Substrat/Na^+-Symporter (CACET_c24220), für Ca^{2+}/Na^+-Antiporter (CACET_c00900) sowie Phosphat/Na^+-Symporter (CACET_c06260) sind jedoch auch andere selektive Transportvorgänge denkbar, welche eine Natriumabhängigkeit erklären könnten.

6.3.2 Entkopplungsexperimente

Um die Art des verwendeten Ionengradienten zu identifizieren und somit den Energiekonservierungsmechanismus von *C. aceticum* weiter aufzuklären, fanden in unabhängigen autotrophen Satzprozessen Entkopplungsexperimente mittels sogenannter Ionophore statt. Ionophore können selektiv Ionen durch Zellmembranen transportieren und sind somit in der Lage vorhandene Ionengradienten zu entkoppeln. Die Ionophore wurden nach 22 h im Anschluss an die exponentiellen Phasen als ethanolische Lösungen sterilfiltriert über das Septum im Reaktordeckel zugegeben. Als Na^+-selektives Ionophor wurden 60 µmol *N,N,N′,N′*-Tetracyclohexyl-1,2-phenylenedioxydiacetamid (ETH2120) eingesetzt. Als Protonophor wurden 300 µmol Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) verwendet, während Monensin, von dem ebenfalls 300 µmol zugesetzt wurden, mit hoher Spezifität für H^+ Kationen über die Zellmembran transportiert. Als Referenz diente ein weiterer Satzprozess, bei welchem im Anschluss an die exponentielle Phase 100 mmol Ethanol zugesetzt wurden, was der Menge Ethanol der ethanolischen Ionophorlösungen entsprach. Für die übrigen Prozessparameter wurden für alle Prozesse die in den Voruntersuchungen zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) sowie eine CO/N_2-Gasmischung (1:9) mit den Partialdrücken $p_{CO,ein}$ = 100 mbar und $p_{N2,ein}$ = 900 mbar gewählt. Die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) sowie der Acetat- und Formiatkonzentrationen der Entkopplungsexperimente sind in Abbildung 6.13 A - F und die zugehörigen Daten der Abgasanalytik (r_{CO}, p_{CO}) in Abbildung 6.14 A - D dargestellt.

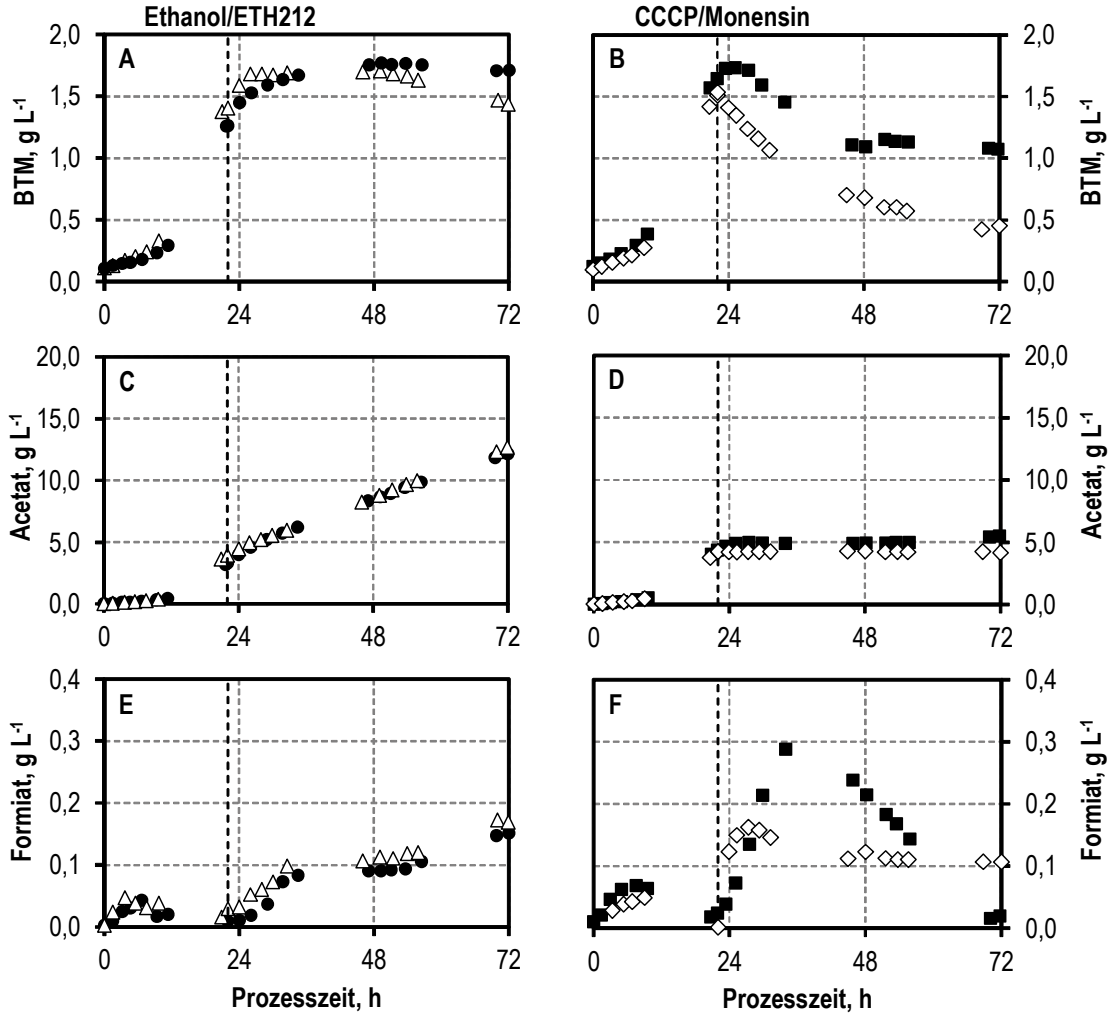

Abbildung 6.13: Autotrophe CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen unter Zugabe von 100 mmol Ethanol (●), 60 µmol ETH2120 (△), 300 µmol CCCP (■) sowie 300 µmol Monensin (◊) nach 22 h (gestrichelte Vertikale) (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar).

Ethanol

Im Satzprozess mit späterer Zugabe von 100 mmol Ethanol nach 22 h (Abbildung 6.13 A, C, E und Abbildung 6.14 A, C) stieg die Biotrockenmassekonzentration ohne Verzögerungsphase an, wobei die spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Phase µ = 0,13 h^{-1} betrug. Die maximale Biotrockenmassekonzentration von 1,76 g L^{-1} wurde nach 48 h erreicht und blieb für weitere 24 h bis Prozessende konstant. Die Acetatkonzentration nahm nach der Ethanolzugabe nahezu linear auf final 12,2 g L^{-1} nach 72 h zu. Geringe Mengen an Formiat (0,04 g L^{-1}) wurden direkt nach der Inokulation gebildet und anschließend wieder verbraucht. Erst nach der Ethanolzugabe beziehungsweise beim Übergang in die stationäre Phase war eine kontinuierliche Formiatbildung zu beobachten, was zur Akkumulation von final 0,15 g L^{-1} führte. Nach der Inokulation stieg die CO-Aufnahmerate auf einen Maximalwert von

32 mmol L^{-1} h^{-1} nach 20,5 h an. Anschließend fiel die Aufnahmerate auf knapp 10 mmol L^{-1} h^{-1} während der stationären Phase bis Prozessende ab. Der CO-Partialdruck sank nach Inokulation auf einen minimalen Wert von 17,5 mbar nach 20,5 h. Anschließend stieg der p_{CO} auf einen stabilen Druck von knapp 70 mbar während der stationären Phase.

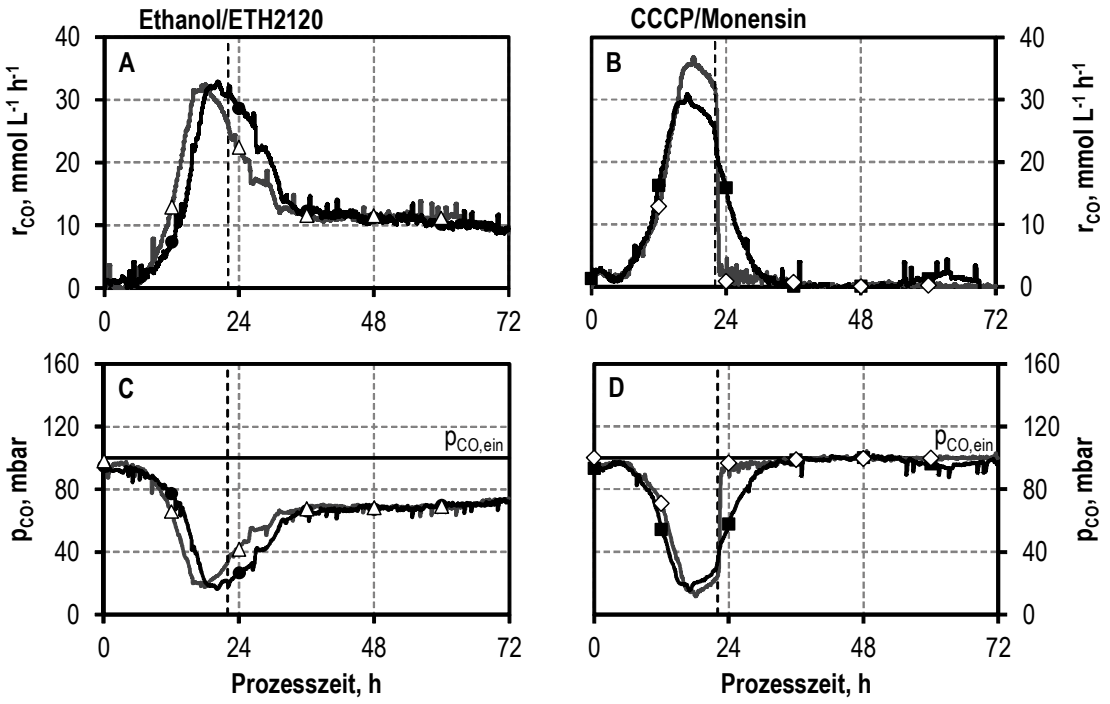

Abbildung 6.14: Abgasdaten autotropher CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen unter Zugabe von 100 mmol Ethanol (●), 60 µmol ETH2120 (△), 300 µmol CCCP (■) sowie 300 µmol Monensin (◊) nach 22 h (gestrichelte Vertikale). Exemplarische Symbole dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{N2,ein}$ = 900 mbar).

ETH2120

Im Prozess mit späterer Zugabe des Na^+-Ionophores ETH2120 (siehe Abbildung 6.13 A, C, E und Abbildung 6.14 A, C) wurde die spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Phase zu µ = 0,12 h^{-1} ermittelt. Nach Zugabe der ethanolischen ETH2120-Lösung nach 22 h stieg die Biotrockenmassekonzentration noch auf ihren Maximalwert von 1,71 g L^{-1} nach 48 h. Anschließend fiel die Biotrockenmassekonzentration bis Prozessende auf 1,44 g L^{-1} ab. Die Acetatkonzentration zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei Ethanolzugabe, sodass die finale Acetatkonzentration 12,7 g L^{-1} nach 72 h betrug. Der anfänglichen Formiatbildung auf 0,05 g L^{-1} folgte der nahezu vollständige Abbau. Erst nach Ethanolzugabe beziehungsweise Übergang in die stationäre Phase konnte eine erneute Formiatbildung beobachtet werden. Die

finale Formiatkonzentration betrug 0,17 g L^{-1}. Die maximale CO-Aufnahmerate r_{CO} betrug 31 mmol L^{-1} h^{-1}, welche nach 19 h erreicht wurde. Die sich daraufhin einstellende stationäre Aufnahmerate belief sich auf 10 mmol L^{-1} h^{-1}. Ein minimaler p_{CO} von 18 mbar wurde nach 19 h gemessen, der CO-Partialdruck während der stationären Phase betrug ~70 mbar.

CCCP

Im Prozess mit späterer Zugabe von 300 µmol des Protonophors CCCP (Abbildung 6.13 B, D, F und Abbildung 6.14 B, D) betrug die spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Phase $\mu = 0{,}12\ h^{-1}$. Zum Zeitpunkt der Protonophorzugabe lag die Biotrockenmassekonzentration bei 1,65 g L^{-1}, welche noch auf 1,73 g L^{-1} anstieg und für weitere 3 h konstant blieb. Anschließend sank die Biotrockenmassekonzentration innerhalb von 18 h auf 1,08 g L^{-1} ab und verblieb auf diesem Wert bis Prozessende. Bis zur CCCP-Zugabe nach 22 h konnte die Akkumulation von Acetat bis auf eine Konzentration von 4,7 g L^{-1} beobachtet werden. Anschließend fand lediglich eine geringe Acetatbildung statt, sodass die Acetatkonzentration zu Prozessende 5,5 g L^{-1} betrug. Formiat wurde direkt zu Prozessbeginn bis zu 0,07 g L^{-1} gebildet und wieder abgebaut. Nach Protonophorzugabe stieg die Formiatkonzentration innerhalb von 12 h auf 0,29 g L^{-1} an, wurde anschließend jedoch bis Prozessende wieder nahezu vollständig abgebaut. Die maximale CO-Aufnahmerate von knapp 30 mmol L^{-1} h^{-1} wurde nach 17,5 h erreicht und sank dann bis zur CCCP-Zugabe auf ~25 mmol L^{-1} h^{-1} ab. Nach Protonophorzugabe sank die CO-Aufnahmerate r_{CO} schlagartig zunächst auf ~20 mmol L^{-1} h^{-1} und im weiteren Prozessverlauf immer weiter ab. Nach 36 h war die Aufnahmerate unterhalb der Nachweisgrenze, wobei erneut geringe Aufnahmeraten nach 55 h bis 68 h gemessen wurden. Der minimale CO-Partialdruck von 17 mbar wurde nach 17,5 h gemessen. Zum Zeitpunkt der Protonophorzugabe betrug der p_{CO} noch 35 mbar, stieg dann jedoch schlagartig auf 48 mbar und im weiteren Verlauf weiter auf den Wert des Eingangspartialdrucks von 100 mbar an. Eine geringe Partialdruckabnahme war nach 55 - 68 h zu verzeichnen. Nach der Zugabe des CCCP stieg der pH des Reaktionsmediums, weswegen die Gegentitration mittels Säure notwendig war (Daten nicht gezeigt).

Monensin

Im Prozess mit späterer Monensinzugabe (Abbildung 6.13 B, D, F und Abbildung 6.14 B, D) wurde während der exponentiellen Phase eine spezifische Wachstumsrate von $\mu = 0{,}13\ h^{-1}$ ermittelt. Zum Zeitpunkt der Monensinzugabe nach 22 h betrug die Biotrockenmasse-konzentration 1,51 g L^{-1}, fiel dann jedoch innerhalb von 10 h auf 1,1 g L^{-1} ab. Im weiteren Prozessverlauf sank die Biotrockenmassekonzentration weiter ab, sodass zu Prozessende eine Konzentration von 0,4 g L^{-1} vorlag. Bis zur Zugabe des Monensins wurde Acetat bis zu

einer Konzentration von 4,2 g L^{-1} gebildet. Anschließend konnte keine weitere Acetatbildung mehr festgestellt werden, sodass die Acetatkonzentration bis Prozessende konstant blieb. Nach anfänglicher Formiatbildung und -verbrauch stieg die Formiatkonzentration nach der Monensinzugabe innerhalb von 5 h auf 0,16 g L^{-1} an. Im weiteren Verlauf sank diese jedoch auf einen konstanten Wert von 0,11 g L^{-1} ab. Zum Zeitpunkt der Monensinzugabe wurde eine CO-Aufnahmerate von r_{CO} = 31 mmol L^{-1} h^{-1} gemessen, welche dann jedoch innerhalb von 2 h unter die Nachweisgrenze absank, sodass keine weitere CO-Aufnahme mehr messbar war. Umgekehrt stieg der p_{CO} nach Monensinzugabe auf den Wert des Eingangspartialdrucks an. Nach Zugabe des Monensins war aufgrund eines auftretenden pH-Anstiegs die Gegentitration mittels Säure notwendig (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Durch unabhängige Entkopplungsexperimente mit Na^+- und H^+-selektiven Ionophoren wurde der Energiestoffwechsel von *C. aceticum* näher charakterisiert. Aufgrund der Unsicherheit, ob die im Genom vorhandenen Gene für H^+/Na^+-Antiporter (CACET_c29680-29750; CACET_c33270-33340) exprimiert werden und ob die vorhandene ATPase (CACET_c02160-c02220) aufgrund des fehlenden Motivs einer Na^+-Bindestelle wirklich H^+-abhängig ist oder nicht, wurden zur Interpretation der gewonnenen Ergebnisse zunächst zwei Hypothesen aufgestellt. Für die erste Hypothese wurde angenommen, dass ein mittels Rnf-Komplex aufgebauter Protonengradient zur Energiekonservierung mittels H^+-abhängiger ATPase verwendet wird und dass die vorhandenen H^+/Na^+-Antiportergene exprimiert werden und der Homöostase oder dem Aufbau eines sekundären Na^+-Gradienten dienen. In der zweiten Hypothese verwendet *C. aceticum* einen primären Na^+-Gradienten zur Energiekonservierung mittels Rnf-Komplex und Na^+-abhängiger ATPase mit ebenfalls exprimierten H^+/Na^+-Antiportergenen.

Im Vergleich zum CO-Referenzprozess (siehe Abschnitt 6.2.1) war die maximale Biotrockenmassekonzentration durch Ethanolzugabe um ~0,6 g L^{-1} verringert, was auf eine inhibierende Wirkung von Ethanol auf *C. aceticum* hinweisen könnte. Die eingesetzte Menge Ethanol entsprach einer Konzentration von knapp 5 g L^{-1}. Da dieselbe Konzentration Ethanol jedoch in allen Ansätzen zugesetzt wurde war dieser Effekt beim Vergleich der Ionophore in dieser Untersuchung zu vernachlässigen.

Im Gegensatz hierzu lag im Prozess mit Zugabe des Na^+-Ionophors ETH2120 die maximale Biomassekonzentration mit 1,71 g L^{-1} leicht höher. Weiterhin wurde die stationäre Phase bereits früher erreicht, was den Versatz der CO-Aufnahmerate und des Partialdruckes erklärt. Bei Betrachtung der Acetat- und Formiatkonzentrationen hingegen war im Vergleich zum

Referenzprozess mit Ethanolzugabe kein signifikanter Unterschied zu beobachten, was sich auch in der maximalen CO-Aufnahmerate und der Gleichgewichtsaufnahmerate während der stationären Phase widerspiegelte. Hieraus lässt sich schließen, dass das Na^+-Ionophor ETH2120 keinen Einfluss auf den Stoffwechsel lebender Zellen von *C. aceticum* unter den gegebenen autotrophen Bedingungen hatte.

Das Na^+-Ionophor ETH2120 wurde in der Literatur bereits erfolgreich zur Entkopplung von Na^+-Gradienten eingesetzt, unter anderem auch bei der Aufklärung des Energiestoffwechsels des Acetogenen *A. woodii* (Biegel & Müller, 2011; Imkamp & Müller, 2002). Bei Nutzung eines primären Na^+-Gradienten zur Energiekonservierung hätte die Entkopplung des Na^+-Gradienten direkte Auswirkungen auf den reduktiven Acetyl-CoA-Weg, sodass die Acetat- und Formiatkonzentrationen sowie die Substrataufnahme und schließlich die Biomassekonzentration im Vergleich zum Referenzversuch mit Ethanolzugabe deutlich beeinflusst worden wären. Weiterhin wurde im Homoacetogenen *C. ljungdahlii* sowie in *Desulfovibrio alaskensis* aufgrund der Unwirksamkeit von ETH2120 sowie des wirksamen Effekts eines Protonophores der Aufbau eines Protonengradienten zur primären Energiekonservierung postuliert (Hess et al., 2016; Tremblay et al., 2012; Wang et al., 2016). Dieses Ergebnis bestärkt somit die getroffene erste Hypothese der Nutzung eines Protonengradienten, trotz der in vorherigen Untersuchungen ermittelten Abhängigkeit der Biomassebildung von der Na^+-Konzentration. Diese könnte, wie bereits beschrieben, auch der Homöostase durch H^+/Na^+-Antiporter (CACET_c29680-29750; CACET_c33270-33340) oder der Substrataufnahme durch Symporterproteine (CACET_c24220, CACET_c00900, CACET_c06260) geschuldet sein.

Im Gegensatz zum Na^+-Ionophor zeigten sowohl das Protonophor CCCP als auch Monensin in den unabhängigen Satzprozessen deutliche Effekte auf *C. aceticum*, die sich in der Reduktion der Biotrockenmassekonzentration, dem Einstellen der Acetatbildung sowie kurzzeitiger Akkumulation von Formiat äußerten. Weiterhin brach nach der jeweiligen Zugabe die Substrataufnahme stark ein und ging sogar auf null zurück. Diese Effekte weisen auf eine erhebliche Störung des reduktiven Acetyl-CoA-Weges hin, welche durch einen Mangel an regenerierten Reduktionsäquivalenten oder durch Mangel an ATP hervorgerufen worden sein könnte. Im Acetyl-CoA-Stoffwechselweg werden Reduktionsäquivalente im Methyl-Zweig zur schrittweisen Reduktion von CO_2 benötigt (siehe Abbildung 6.15). Die Oxidation des alleinigen Substrates CO zu CO_2 liefert für die Reduktion zu Formiat die zunächst benötigten Reduktionsäquivalente (siehe Abschnitt 3.1.3). Die weitere Reduktion ausgehend vom Formiat zur Methyl-Gruppe benötigt zusätzlich neben vier weiteren Reduktionsäquivalenten auch ATP. Die Störung des Energiestoffwechsels durch Entkopplung des Ionengradienten hätte zur

Folge, dass der Organismus kein oder nur noch unzureichend ATP konservieren kann. Dies würde die weitere Reduktion von Formiat behindern, was wiederum die beobachtete kurzzeitige Akkumulation dieses Intermediats erklären würde. Weiterhin würde eine Störung des reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweges die Acetatbildung unterbrechen, was ebenfalls in den Entkopplungsprozessen mit CCCP und Monensin beobachtet wurde. Die Entkopplung des zur Energiekonservierung nötigen Ionengradienten würde außerdem zum gänzlichen metabolischen Zusammenbruch führen. Der Unterbrechung der Substrataufnahme würde dann durch unzureichende Bedienung des Erhaltungsstoffwechsels die Reduktion der Biotrockenmassekonzentration aufgrund absterbender Zellen folgen, was beides durch Zugabe der Entkoppler CCCP und Monensin experimentell induziert werden konnte. Zudem musste der pH in beiden Fällen aufgrund eines pH-Anstieges im Reaktionsmedium durch Gegentitration mit Säure (HCl) kontrolliert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass aufgrund des metabolischen Zusammenbruchs und der Unterbrechung der Substrataufnahme von *C. aceticum* kein weiteres CO_2 mehr gebildet wurde. Durch die kontinuierliche Begasung mit CO/N_2 könnte sich dementsprechend die CO_2-Gelöstkonzentration verringert haben, was wiederum einen Anstieg des pH nach sich ziehen würde. Ein deutlicher Anstieg des pH im Reaktionsmedium aufgrund eines durch die Protonophore ausgelösten ins Zellinnere gerichteten Protonenflusses ist aufgrund des geringen zellinternen Volumens hingegen unwahrscheinlich.

Die Effekte, welche durch die CCCP- und die Monensinzugaben ausgelöst wurden, weisen alle darauf hin, dass durch die Entkoppler ein primärer Protonengradient aufgelöst wurde. Der komplette metabolische Zusammenbruch bestärkt zudem die Hypothese, dass dieser von *C. aceticum* zur Energiekonservierung genutzt wird. Im Vergleich des Protonophores CCCP mit dem H^+/Kationen-Antiporter Monensin zeigte CCCP eine zunächst verzögerte Wirkung auf *C. aceticum*. Eine mögliche Ursache hierfür findet sich in der unterschiedlichen Wirkungsweise: Monensin lagert sich in die Zellmembran ein und fungiert dort als H^+/Kationen-Antiporter, der in der Lage ist einen vorherrschenden Konzentrationsgradienten direkt zu entkoppeln (Lowicki & Huczynski, 2013; Mollenhauer et al., 1990). Die Protonierung von CCCP im Reaktionsmedium bei einem pH von 8,0 findet hingegen relativ langsam statt, da das Gleichgewicht aufseiten des deprotonierten Zustandes liegt. Dennoch ist mit diesem und ähnlich funktionierenden, verwandten Protonophoren auch in anderen Mikroorganismen die Entkopplung eines Protonengradienten in der Literatur beschrieben (Johnston et al., 2016; Seedorf et al., 2008).

Bei den beiden Hypothesen zur Energiekonservierung wurde angenommen, dass die im Genom vorhandenen H^+/Na^+-Antiporter von *C. aceticum* exprimiert werden, weshalb CCCP und Monensin auch bei Nutzung eines Na^+-Gradienten zur Energiekonservierung Effekte auf Wachstum und Produktbildung haben könnten. Da jedoch die Anwendung des Na^+-Ionophors keine negativen Effekte auf Wachstum, Produktbildung sowie Substrataufnahme zeigte sowie die ATPase keine Na^+-Bindestelle aufweist ist die Schlussfolgerung des Aufbaus eines primären Protonengradienten mittels Rnf-Komplex zur Energiekonservierung in *C. aceticum* schlüssig. In Abbildung 6.15 ist daher der reduktive Acetyl-CoA-Weg erweitert um den Energiekonservierungsmechanismus sowie der zuvor beobachteten Ethanolbildung bei CO-Prozessen (siehe Abschnitt 6.2.5) dargestellt.

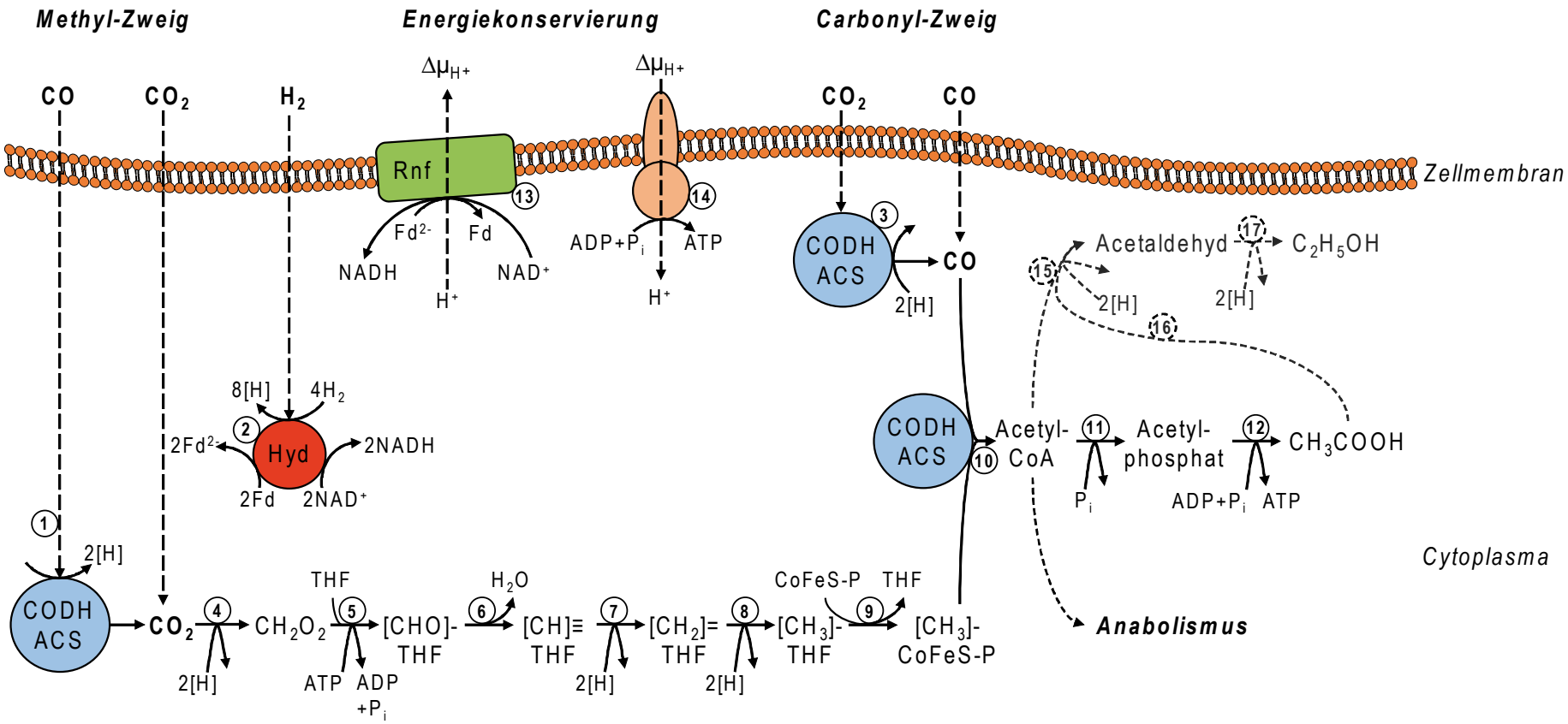

Abbildung 6.15: Erweiterte schematische Darstellung des reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweges zur Umsetzung von CO, CO_2 und H_2 über den Methyl- und Carbonyl-Zweig, der mögliche Energiekonservierungsmechanismus über den Rnf-Komplex sowie die Bildung der Stoffwechselprodukte Acetat (CH_3COOH) und Ethanol (C_2H_5OH) über folgende Enzyme: 1), 3), 10) CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (CODH/ACS); 2) Hydrogenase; 4) Formiatdehydrogenase; 5) Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase; 6) Formyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase; 7) Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase; 8) Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase; 9) Methyl-Transferase; 11) Phosphotransacetylase; 12) Acetatkinase; 13) Rnf-Komplex; 14) ATP-Synthase; 15) Aldehyddehydrogenase; 16) Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase; 17) Alkoholdehydrogenase. Abkürzungen: Formiat CH_2O_2; Formyl-Tetrahydrofolat [CHO]-THF; Methenyl-Tetrahydrofolat [CH]≡THF; Methylen-Tetrahydrofolat $[CH_2]$=THF; Methyl-Tetrahydrofolat $[CH_3]$-THF; Methyl-CoFeS-P $[CH_3]$-CoFeS-P; Reduktionsäquivalente [H]; Ferredoxin Fd, Nicotinamidadenindinukleotid NAD; Adenosindiphosphat ADP, Adenosintriphosphat ATP, Phosphat P_i; Protonengradient $\Delta\mu_{H^+}$.

6.4 Substratinhibierung*

Für Gasfermentationen industriell eingesetzte Reaktoren weisen an ihrem Boden aufgrund hoher Wassersäulen von 30 m und mehr hohe hydrostatische Drücke auf. Dies führt zu hohen Eingangspartialdrücken der gasförmigen Substrate, die am Boden des Reaktors eingeleitet werden und diesen von unten nach oben durchströmen. Die hohen Partialdrücke erhöhen damit einerseits die Massentransferrate aus der Gas- in die Flüssigphase und führen andererseits zur Erhöhung der Gelöstkonzentrationen der eingebrachten Substrate (siehe Abschnitt 3.4.4). Da insbesondere von den Gasen CO und H_2 bekannt ist, dass diese bei hohen Konzentrationen inhibierende oder gar toxische Wirkung auf Mikroorganismen haben können ist für den effizienten Betrieb eines Gasfermentationsprozesses mit kontinuierlicher Begasung die Kenntnis der zugrundeliegenden Inhibierungskinetik von großer Relevanz.

6.4.1 Kohlenstoffmonoxid

Die Untersuchungen, ob *C. aceticum* durch CO inhibiert wird oder dieses Substrat bei hohen Konzentrationen gar toxisch für diesen Organismus ist, wurden in unabhängigen Satzprozessen im kontrollierten autotrophen Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen (T = 30 °C; pH 8,0; $P\ V^{-1}$ = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}) mit CO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle sowie einer initialen Biotrockenmassekonzentration von 0,10 g L^{-1} durchgeführt.

Partialdruck

Im CO-Referenzprozess betrug der konstante Eingangspartialdruck $p_{CO,ein}$ = 100 mbar (siehe Abschnitt 6.2.1). Um den Effekt erhöhter CO-Partialdrücke zu untersuchen wurde der CO-Eingangspartialdruck in zwei unabhängigen Satzprozessen auf $p_{CO,ein}$ = 200 mbar und $p_{CO,ein}$ = 500 mbar gesteigert, wobei die korrespondierenden N_2-Partialdrücke $p_{N2,ein}$ = 800 mbar und $p_{N2,ein}$ = 500 mbar betrugen. Die resultierenden Konzentrationsverläufe der Biotrockenmasse- (BTM), der Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie die mit Hilfe nichtlinearer Regression der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen abgeschätzten volumetrischen (r_{Acetat}) und zellspezifischen Acetatbildungsraten (q_{Acetat}) sind in Abbildung 6.16 A - F dargestellt. Zu Vergleichszwecken sind auch die Resultate des CO-Referenzprozesses mit $p_{CO,ein}$ = 100 mbar dargestellt.

*Teile dieses Abschnitts sind publiziert in: Mayer et al. (2018); Carbon monoxide conversion with *Clostridium aceticum*. *Biotechnology and Bioengineering*: https://doi.org/10.1002/bit.26808

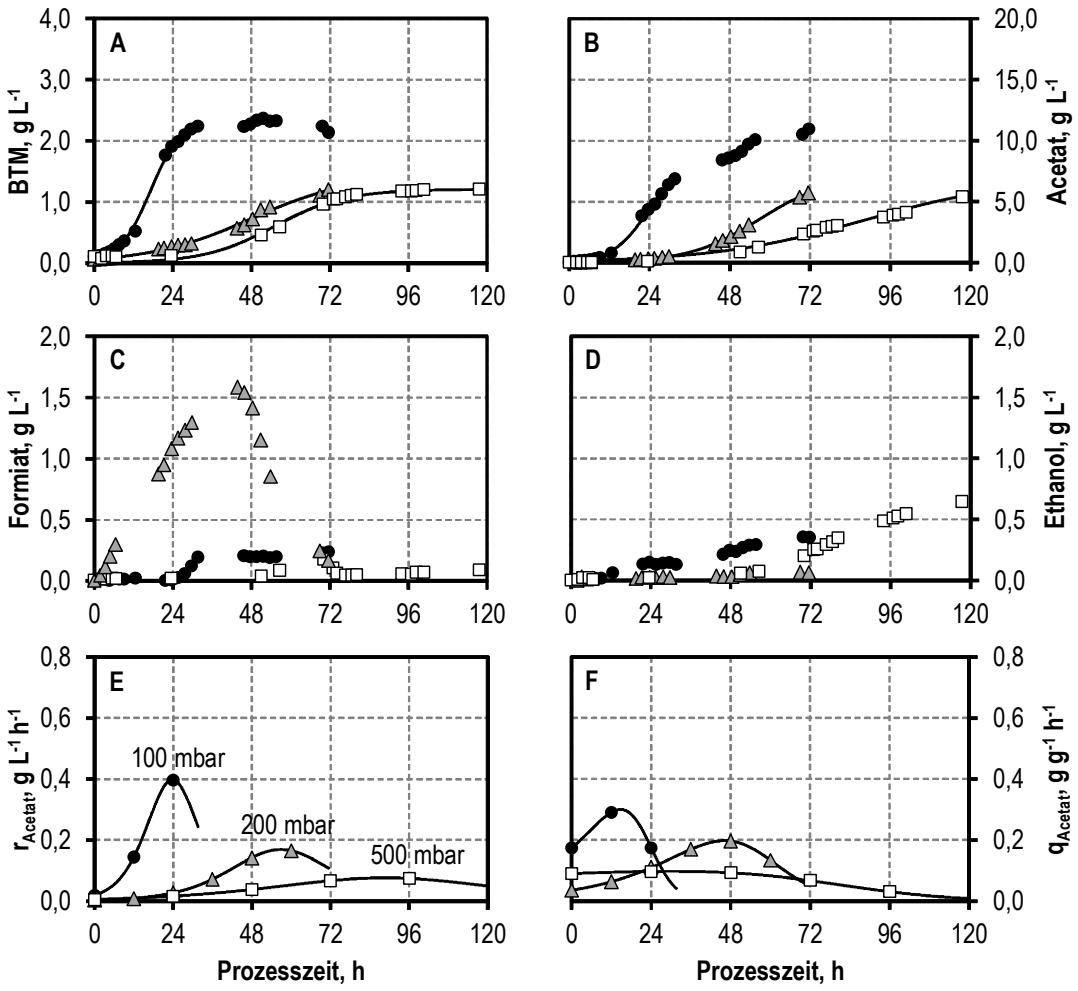

Abbildung 6.16: Autotrophe CO-Satzprozesse im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* bei variierten Eingangspartialdrücken von $p_{CO,ein}$ = 100 mbar (schwarz), $p_{CO,ein}$ = 200 mbar (grau) sowie $p_{CO,ein}$ = 500 mbar (weiß) unter Standardbedingungen. Durchgezogene Linien resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Bei einem konstanten Eingangspartialdruck von 200 mbar betrug die spezifische Wachstumsrate während der für knapp 12 h andauernden exponentiellen Phase μ = 0,07 h^{-1}. Anschließend nahm die Wachstumsrate ab und nach einer Prozesszeit von 72 h wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 1,20 g L^{-1} erreicht. Die Bildung von Acetat war über die gesamte Prozesszeit zu beobachten, wobei die Konzentration zu Prozessende 5,7 g L^{-1} betrug. Zu Prozessbeginn konnte eine schnelle Formiatbildung mit einer maximalen Formiatkonzentration von 1,59 g L^{-1} nach 43 h beobachtet werden. Anschließend sank die Formiatkonzentration bis Prozessende auf 0,17 g L^{-1} ab. Ethanol wurde nur zu sehr geringen Mengen gebildet, sodass die Endkonzentration lediglich 0,06 g L^{-1} betrug. Die abgeschätzte volumetrische Acetatbildungsrate r_{Acetat} zeigte einen Maximalwert von 0,17 g L^{-1} h^{-1} nach 57 h.

Die abgeschätzte zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} hingegen wies ihren Maximalwert von 0,20 g g^{-1} h^{-1} bereits nach 46 h auf. Bei Erhöhung des Eingangspartialdrucks auf 500 mbar zeigte *C. aceticum* zunächst eine deutliche Verzögerungsphase von etwa 23 h, ehe Wachstum festgestellt werden konnte. Die sich anschließende exponentielle Phase dauerte knapp 48 h an. Die hierbei ermittelte spezifische Wachstumsrate betrug 0,04 h^{-1}. Anschließend verringerte sich die Wachstumsrate und es stellte sich eine stationäre Phase mit einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von 1,20 g L^{-1} ein. Die Acetatkonzentration nahm erstmals merklich nach 24 h zu. Bis Prozessende war die stetige Zunahme der Acetatkonzentration auf einen finalen Wert von 5,4 g L^{-1} zu beobachten. Die Bildung von Formiat fand ab einer Prozesszeit von 48 h statt, wobei nach 70 h eine maximale Konzentration von 0,18 g L^{-1} gemessen werden konnte. Anschließend sank die Formiatkonzentration bis Prozessende auf 0,09 g L^{-1} ab. Die stetige Bildung von Ethanol konnte ab einer Prozesszeit von 48 h nachvollzogen werden, wobei nach 120 h die Endkonzentration 0,60 g L^{-1} betrug. Die maximale abgeschätzte volumetrische Acetatbildungsrate wurde nach 89 h erreicht und betrug 0,08 g L^{-1} h^{-1}, während die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate von 0,09 g g^{-1} h^{-1} bereits nach 30 h erreicht wurde.

Diskussion

Die Erhöhung des Eingangspartialdruckes auf 200 mbar führte zunächst zu einer deutlichen Verringerung der spezifischen Wachstumsrate während der exponentiellen Phase von 0,06 h^{-1}. Im Vergleich zum Referenzprozess mit $p_{CO,ein}$ = 100 mbar (μ = 0,13 h^{-1}) entsprach dies einer Reduktion um 54 %. Ebenfalls deutlich verringert zeigten sich die abgeschätzten Acetatbildungsraten. Die volumetrische Acetatbildungsrate r_{Acetat} war im Vergleich zum Referenzprozess (r_{Acetat} = 0,37 g L^{-1} h^{-1}; q_{Acetat} = 0,31 g g^{-1} h^{-1}) um 54 % und die zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} um 35 % verringert. Dies führte im selben Zeitraum zu einer deutlich reduzierten Acetatkonzentration. Auffallend war die starke Formiatbildung zu Prozessbeginn. Da die weitere Reduktion des Intermediats Formiat im Methyl-Zweig des reduktiven Acetyl-CoA-Weges 4 weitere Reduktionsäquivalente und 1 ATP erfordert, könnte die Akkumulation von Formiat eine Störung im zentralen Stoffwechselweg aufzeigen (Diekert & Wohlfarth, 1994; Peters et al., 1999). Der erneute Verbrauch des Intermediats nach knapp 48 h fiel mit dem Maximum der zellspezifischen Acetatbildungsrate zusammen. Dies bedeutet, dass die metabolische Leistung ab diesem Zeitpunkt abnahm, weswegen das zuvor gebildete Formiat im Acetyl-CoA-Weg langsam wieder verbraucht wurde. Bei weiterer Erhöhung des Eingangspartialdruckes auf 500 mbar zeigte *C. aceticum* eine deutliche Verzögerungsphase, was auf eine nötige Adaption auf die Umweltbedingungen hindeutet. Ebenso wurden die abgeschätzten Acetatbildungsraten im Vergleich zum Referenzprozess noch stärker

verringert. Die volumetrische Acetatbildungsrate war um 78 % sowie die zellspezifische Acetatbildungsrate um 71 % reduziert.

Die Reduktion der Wachstums- und der Acetatbildungsraten sowie das Auftreten einer Verzögerungsphase bei erhöhten CO-Eingangspartialdrücken ließ die Schlussfolgerung zu, dass *C. aceticum* sensitiv auf hohe CO-Konzentrationen beziehungsweise Partialdrücke reagiert.

Inhibierungskinetik

Zur Identifikation der CO-Überschussinhibierung (siehe Abschnitt 4.5.5) wurden die CO-Eingangspartialdrücke in unabhängigen Satzprozessen zwischen 0 mbar und 300 mbar variiert und die jeweiligen spezifischen Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen ermittelt. Da die CO-Gelöstkonzentrationen im Reaktionsmedium nicht direkt messbar waren, wurden die ermittelten spezifischen Wachstumsraten als Funktion der mittleren CO-Partialdrücke im Reaktor dargestellt, da diese aufgrund steigender Aufnahmeraten durch steigende Biotrockenmassekonzentrationen mit zunehmender Prozesszeit während der exponentiellen Wachstumsphasen abnahmen. Nach Schätzung der kinetischen Parameter μ_{max}, K_S und K_I über nichtlineare Regressionsanalyse wurde anschließend der optimale CO-Partialdruck berechnet. Mit diesem erfolgte die Berechnung der optimalen spezifischen Wachstumsrate μ_{opt}. Mit dem zuvor in unabhängigen Satzprozessen während der exponentiellen Wachstumsphase ermittelten produktspezifischen Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X,Acetat} = 0{,}467\ g\ g^{-1}$ wurden die abgeleiteten Zustandsgrößen $q_{Acetat,max}$ und $q_{Acetat,opt}$ bestimmt. Die bei unterschiedlichen Eingangspartialdrücken als Funktion der Prozesszeit gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen BTM, die CO-Partialdruckverläufe p_{CO} sowie die exponentiellen Wachstumsphasen sind unter Angabe der korrespondierenden mittleren CO-Partialdrücke $\bar{p}_{CO}$ und der ermittelten spezifischen Wachstumsraten μ in Abbildung 6.17 A - I dargestellt.

Bei einem CO-Eingangspartialdruck von 0 mbar, was gleichbedeutend mit einer reinen N_2-Begasung ist, konnten weder Wachstum noch Produktbildung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei Begasung mit einem CO-Eingangspartialdruck von $p_{CO,ein} = 3$ mbar dauerte die exponentielle Phase 4 h an, wobei ein mittlerer CO-Partialdruck von 1 mbar aus den Abgasdaten bestimmt und eine spezifische Wachstumsrate von 0,20 h^{-1} ermittelt wurde. Die Biotrockenmassekonzentration am Ende der exponentiellen Phase betrug 0,24 g L^{-1}.

Bei einem CO-Eingangspartialdruck von 9 mbar fiel der Abgaspartialdruck während der 4,2 h andauernden exponentiellen Phase auf 2 mbar ab, wodurch ein mittlerer Partialdruck von

5 mbar bestimmt wurde. Mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,22 h^{-1} stieg die Biotrockenmassekonzentration auf 0,26 g L^{-1} am Ende der exponentiellen Phase an.

Während der 4,5 h andauernden exponentiellen Phase bei einem Eingangspartialdruck von $p_{CO,ein}$ = 20 mbar konnte eine spezifische Wachstumsrate von 0,23 h^{-1} ermittelt werden. Dabei stieg die Biotrockenmassekonzentration in dieser Zeit auf 0,30 g L^{-1} an, während sich ein mittlerer CO-Partialdruck von 13 mbar einstellte.

Bei Erhöhung des Eingangspartialdrucks auf 50 mbar dauerte die exponentielle Phase 7,5 h an. Hierbei wurde eine spezifische Wachstumsrate von 0,20 h^{-1} ermittelt, was zum Anstieg der Biotrockenmassekonzentration auf 0,40 g L^{-1} führte. Durch Substratverbrauch ergab sich ein $\bar{p}_{CO}$ von 38 mbar.

Mit einem $p_{CO,ein}$ von 70 mbar wurde in der 8,6 h andauernden exponentiellen Phase ein mittlerer CO-Partialdruck von 63 mbar ermittelt. Mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,16 h^{-1} stieg dabei die Biotrockenmassekonzentration auf 0,50 g L^{-1} am Ende der exponentiellen Phase an.

Bei einem CO-Eingangspartialdruck von 100 mbar sank der p_{CO} während der 12 h andauernden exponentiellen Phase auf 74 mbar ab, wodurch sich ein mittlerer Partialdruck von 90 mbar einstellte. Mit einer ermittelten spezifischen Wachstumsrate von μ = 0,13 h^{-1} stieg die Biotrockenmassekonzentration in diesem Zeitraum auf 0,50 g L^{-1} an.

Bei Erhöhung des $p_{CO,ein}$ auf 150 mbar sank der Partialdruck zum Ende der 11,3 h andauernden exponentiellen Phase lediglich auf 135 mbar ab, wodurch sich ein $\bar{p}_{CO}$ von 146 mbar ergab. Dabei wurde eine spezifische Wachstumsrate von 0,09 h^{-1} ermittelt. Die Biotrockenmassekonzentration stieg in dieser Zeit von 0,11 g L^{-1} auf 0,35 g L^{-1} an.

Bei einem CO-Eingangspartialdruck von 200 mbar dauerte die exponentielle Phase 13,6 h an. Hierbei wurde ein mittlerer CO-Partialdruck von 192 mbar ermittelt. Die Biotrockenmasse-konzentration stieg mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,07 h^{-1} auf einen Wert von 0,27 g L^{-1} an.

Beim höchsten zur Identifikation der Inhibierungskinetik verwendeten Eingangspartialdruck von $p_{CO,ein}$ = 300 mbar wurde zunächst eine 8 h andauernde Verzögerungsphase beobachtet. An diese schloss sich eine 18 h andauernde exponentielle Phase mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,06 h^{-1} an. Der sich einstellende mittlere CO-Partialdruck $\bar{p}_{CO}$ betrug 299 mbar, wobei die Biotrockenmassekonzentration in dieser Zeit auf 0,40 g L^{-1} anstieg. Im weiteren Verlauf sank die Wachstumsrate und es stellte sich ein lineares Wachstumsverhalten ein.

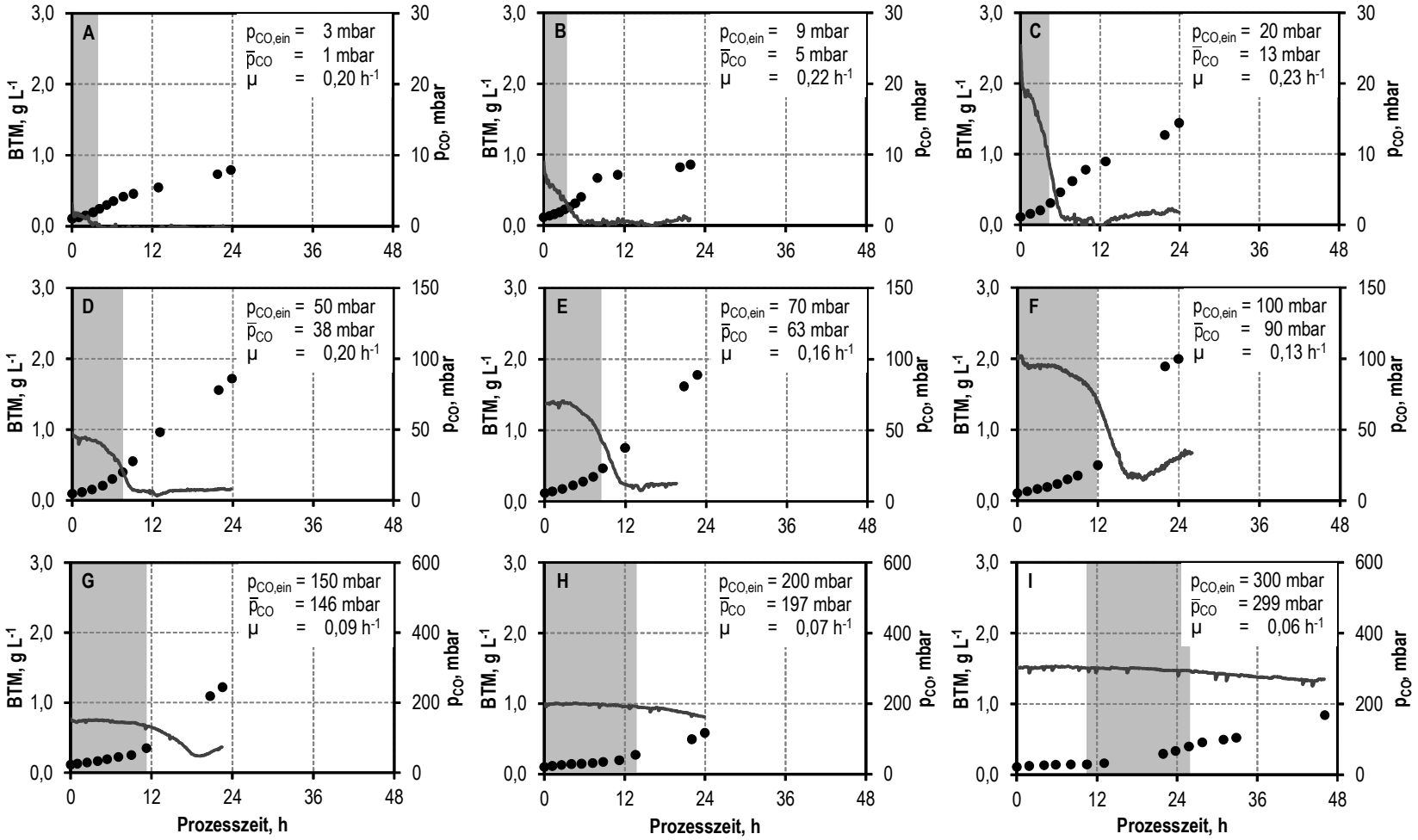

Abbildung 6.17: Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) von *C. aceticum* bei verschiedenen CO-Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein}$ in unabhängigen autotrophen Satzprozessen im kontrollierten Rührkesselreaktor. Die zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten μ herangezogenen exponentiellen Phasen mit den korrespondierenden mittleren CO-Partialdrücken im Abgas $\bar{p}_{CO}$ sind grau schattiert (T = 30 °C; pH = 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Diskussion

Die höchste Wachstumsrate von 0,23 h^{-1} wurde bei einem CO-Eingangspartialdruck von 20 mbar beziehungsweise einem korrespondierenden mittleren CO-Partialdruck von 13 mbar gemessen. Eine weitere Erhöhung des Eingangspartialdrucks resultierte in der Reduktion der Wachstumsraten. Die höchste Biotrockenmassekonzentration von 2,0 g L^{-1} wurde hingegen bei einem Eingangspartialdruck von 100 mbar nach 24 h erzielt. Höhere CO-Eingangspartialdrücke $p_{CO,ein}$ resultierten in verringerten finalen sowie maximalen Biotrockenmassekonzentrationen. Auffällig war eine ausgeprägte Verzögerungsphase von 8 h beim höchsten untersuchten CO-Eingangspartialdruck von 300 mbar, was auf eine starke initiale Inhibierung mit zunehmender Adaption an die Prozessbedingungen hinweist. Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen am Ende der exponentiellen Phasen lagen zwischen 0,24 g L^{-1} ($p_{CO,ein}$ = 3 mbar) und 0,50 g L^{-1} ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar). Die maximalen Acetatkonzentrationen am Ende der exponentiellen Phasen lagen zwischen 0,4 g L^{-1} ($p_{CO,ein}$ = 3 mbar) und 0,8 g L^{-1} ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar) (Daten nicht gezeigt). Die mit den ermittelten spezifischen Wachstumsraten μ und den korrespondierenden mittleren CO-Partialdrücken $\bar{p}_{CO}$ durch nichtlineare Regression mit dem Substratüberschuss-inhibierungsmodell von Andrews abgeschätzten kinetischen Parameter μ_{max}, K_S und K_I sowie die davon abgeleiteten Zustandsgrößen $q_{Acetate,max}$, $p_{CO,opt}$, μ_{opt} und $q_{Acetat,opt}$ sind in Tabelle 6.3 aufgelistet. Die Modellkurven der CO-Inhibierungskinetik für die spezifische Wachstumsrate μ und die zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat} samt 95 % Konfidenzintervallen sind als Funktion des mittleren CO-Partialdrucks $\bar{p}_{CO}$ in Abbildung 6.18 A und B dargestellt.

Tabelle 6.3: Identifizierte kinetische Modellparameter und abgeleitete Zustandsgrößen der CO-Substratüberschussinhibierung (Modell nach Andrews) für *C. aceticum*, ermittelt in unabhängigen autotrophen Satzprozessen im kontrollierten Rührkesselreaktor und gültig für Biotrockenmasse-konzentrationen unter 0,5 g L^{-1} (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Parameter/Zustandsgröße	Symbol	Wert	
Maximale zellspezifische Wachstumsrate	μ_{max}	0,27	h^{-1}
Halbsättigungskonstante	K_S	0,3	mbar
Inhibierungskonstante	K_I	86,7	mbar
Maximale zellspezifische Acetatbildungsrate	$q_{Acetat,max}$	0,58	g g^{-1} h^{-1}
Optimaler CO-Partialdruck	$p_{CO,opt}$	5,4	mbar
Optimale zellspezifische Wachstumsrate	μ_{opt}	0,24	h^{-1}
Optimale zellspezifische Acetatbildungsrate	$q_{Acetat,opt}$	0,51	g g^{-1} h^{-1}

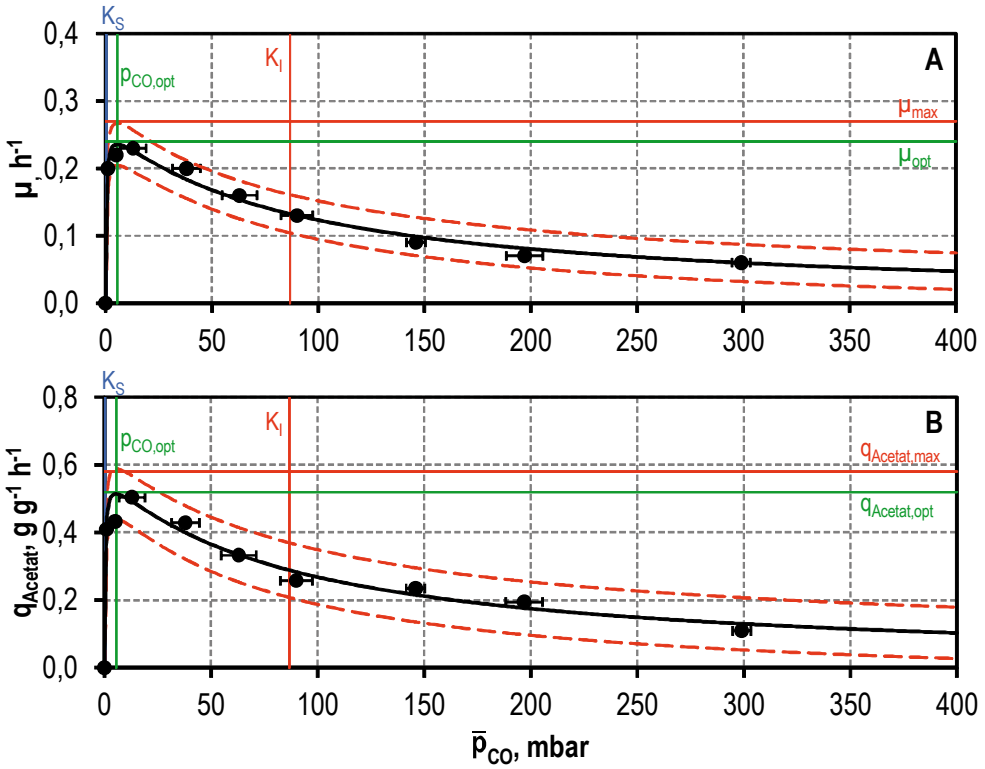

Abbildung 6.18: Ermittelte zellspezifische Wachstums- (μ, A) und Acetatbildungsraten (q_{Acetat}, B) von *C. aceticum* als Funktion der mittleren CO-Partialdrücke $\bar{p}_{CO}$ mit Standardabweichungen, identifiziertem Substratüberschussinhibierungsmodell nach Andrews (schwarze Linien), 95 % Konfidenzintervallen (rot gestrichelte Linien), abgeschätzten kinetischen Parametern maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} = 0,27 h^{-1} (rote Horizontale, A), Halbsättigungskonstante K_S = 0,3 mbar (blaue Vertikale) und Inhibierungskonstante K_I = 86,7 mbar (rote Vertikale) sowie die abgeleiteten Zustandsgrößen optimaler CO-Partialdruck $p_{CO,opt}$ = 5,4 mbar (grüne Vertikale), optimale spezifische Wachstumsrate μ_{opt} = 0,24 h^{-1} (grüne Horizontale, A), maximale zellspezifische Acetatbildungsrate $q_{Acetat,max}$ = 0,58 g g^{-1} h^{-1} (rote Horizontale, B) und optimale zellspezifische Acetatbildungsrate $q_{Acetat,opt}$ = 0,52 g g^{-1} h^{-1} (grüne Horizontale, B) (c_X < 0,5 g L^{-1}, T = 30 °C; pH = 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}, u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Der sehr niedrige Wert für die Halbsättigungskonstante K_S = 0,3 mbar zeigt, dass *C. aceticum* unter den gegebenen Bedingungen eine extrem hohe Substrataffinität für CO aufweist. Durch die Abschätzung des Henry-Koeffizienten He_{CO}(30 °C) ≈ 9,38 · 10^{-7} mol L^{-1} $mbar^{-1}$ für 30 °C ergäbe sich für K_S = 0,3 mbar = 2,8 10^{-4} mmol L^{-1} (Sander, 1999). Andererseits zeigt der relativ niedrige Wert für K_I = 86,7 mbar eine starke und früh einsetzende Substratinhibierung durch CO auf.

Es liegen nur vereinzelt Studien zur Bestimmung der Halbsättigungskonstante gasförmiger Substrate vor. Für *Sphaerotilus natans*, einem Mikroorganismus aus der aeroben Abwasserbehandlung von dem eine hohe Sauerstoffaffinität bekannt ist, identifizierten beispielsweise Hao et al. (1983) K_S = 2,06 10^{-3} mmol L^{-1} O_2, was um den Faktor 7 höher ist als die für *C. aceticum* bestimmte Halbsättigungskonstante für CO.

Mittels K_S und K_I ließ sich der optimale CO-Partialdruck $p_{CO,opt}$ = 5,4 mbar abschätzen, wobei sich die korrespondierenden optimalen zellspezifischen Wachstums- und Acetatbildungsraten zu μ_{opt} = 0,24 h^{-1} sowie $q_{Acetat,opt}$ = 0,52 g g^{-1} h^{-1} ableiteten. Aufgrund der starken Inhibierung ist der optimale CO-Partialdruck sehr niedrig. Da keine Möglichkeit zur Messung der CO-Gelöstkonzentration bestand und zur Identifikation der Substratüberschussinhibierungskinetik der mittlere CO-Partialdruck herangezogen wurde, musste sichergestellt sein, dass während der exponentiellen Wachstumsphase keine CO-limitierenden Bedingungen herrschten. Da bei höheren Biotrockenmassekonzentrationen höhere volumetrische CO-Aufnahmeraten vorliegen wurde die Substratüberschussinhibierungskinetik zur Gewährleistung ausreichender CO-Gelöstkonzentrationen nur für Biotrockenmassekonzentrationen unter 0,5 g L^{-1} bestimmt.

Kinetische Studien zur Substrat- oder CO-Inhibierung für acetogene Mikroorganismen sind selten, was unter anderem daran liegt, dass sich die CO- Gelöstkonzentration nur schwer und ungenau bestimmen lässt. Daher werden Wachstum und Produktbildung in Bezug auf die CO-Partialdrücke meist lediglich qualitativ beschrieben. So zeige beispielsweise *C. carboxidivorans* auch bei CO-Eingangspartialdrücken von 2000 mbar kein inhibiertes Wachstums- und Produktbildungsverhalten. Im Gegenteil, es wird für diesen Organismus sogar über eine Steigerung des Wachstums und der Ethanolbildung berichtet (Hurst & Lewis, 2010). Ein ähnliches Verhalten wird von Najafpour und Younesi für *C. ljungdahlii* berichtet (Najafpour & Younesi, 2006). *Eubacterium limosum* KIST612 zeigte in einem Blasensäulenreaktor bei einem CO-Partialdruck von 1000 mbar die höchsten Gas-aufnahmeraten, während für *Peptostreptococcus productus* in Satzprozessen gar Inhibierungskonstanten von 3000 mbar abgeschätzt wurden, was im Vergleich zu *C. aceticum* deutlich höhere CO-Toleranzen bedeutet (Chang et al., 2001; Vega et al., 1988; Vega et al., 1989). In einer der wenigen Kinetikstudien schätzten Mohammadi et al. (2014) auf Basis des Inhibierungsmodells nach Andrews den K_I für *C. ljungdahlii* auf 494 mbar CO. Diese hohe Inhibierungskonstante zeigt deutlich, wie unterschiedlich die Toleranz gegenüber CO innerhalb der Gruppe acetogener Mikroorganismen sein kann und wie sensitiv demgegenüber *C. aceticum* ist. Die effiziente CO-Umsetzung mit *C. aceticum* kann demnach bei niedrigen Biotrockenmassekonzentrationen unter 0,5 g L^{-1} mit niedrigen CO-Aufnahmeraten durch niedrige CO-Partialdrücke mit $p_{CO,opt}$ = 5,4 mbar gewährleistet werden.

6.4.2 Wasserstoff

Zur Untersuchung der Sensitivität von *C. aceticum* gegenüber der Elektronenquelle H_2 wurde in unabhängigen Satzprozessen im kontrollierten autotrophen Rührkesselreaktor unter Standardbedingungen (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}) mit kontinuierlicher Begasung mit CO_2/H_2 der H_2-Eingangsartialdruck bei konstantem $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar zwischen 0 mbar und 845 mbar variiert. Dabei wurden die spezifischen Wachstumsraten μ und die korrespondierenden mittleren H_2-Partialdrücke $\bar{p}_{H_2}$ während der exponentiellen Wachstumsphasen ermittelt. Die mit den unterschiedlichen Eingangspartialdrücken $p_{H_2,ein}$ über die Prozesszeit gemessenen Biotrockenmassekonzentrationen BTM, die H_2-Partialdruckverläufe p_{H_2} sowie die exponentiellen Phasen sind unter Angabe der mittleren H_2-Partialdrücke $\bar{p}_{H_2}$ und der ermittelten spezifischen Wachstumsraten μ Abbildung 6.19 A - I dargestellt. Die ermittelten Wachstumsraten μ sind weiterhin in Abbildung 6.20 über die korrespondierenden mittleren H_2-Partialdrücke $\bar{p}_{H_2}$ aufgetragen.

Bei einem H_2-Eingangspartialdruck von 0 mbar konnte kein Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei einem $p_{H_2,ein}$ von 102 mbar wurde eine exponentielle Phase von 7 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,06 h^{-1} ermittelt, wobei sich ein mittlerer H_2-Partialdruck von 98 mbar einstellte. Die Biotrockenmassekonzentration am Ende der exponentiellen Phase betrug 0,19 g L^{-1}.

Bei einem H_2-Eingangspartialdruck von 222 mbar stellte sich während der 10,5 h andauernden exponentiellen Phase ein mittlerer H_2-Partialdruck von 218 mbar ein. Die spezifische Wachstumsrate wurde zu 0,05 h^{-1} ermittelt, wodurch die Biotrockenmassekonzentration bis zum Ende der exponentiellen Phase auf 0,20 g L^{-1} anstieg.

Eine 12 h dauernde exponentielle Phase konnte bei einem $p_{H_2,ein}$ von 390 mbar beobachtet werden. Dabei sank der Partialdruck im Mittel auf 383 mbar ab. Die spezifische Wachstumsrate wurde zu 0,06 h^{-1} ermittelt, wobei die Biotrockenmassekonzentration am Ende der exponentiellen Phase 0,28 g L^{-1} betrug.

Bei Erhöhung des H_2-Eingangspartialdrucks auf 437 mbar wurde eine exponentielle Phase von 10,2 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,06 h^{-1} ermittelt. Die Biotrockenmassekonzentration und der H_2-Partialdruck am Ende der exponentiellen Phase ergab sich zu 0,18 g L^{-1} und 424 mbar und der mittlere H_2-Partialdruck für diese Phase war 431 mbar.

Mit $p_{H2,ein}$ = 480 mbar wurde für mindestens 10,3 h eine spezifische Wachstumsrate von 0,06 h^{-1} ermittelt. Hierdurch stieg die Biotrockenmassekonzentration auf einen Wert von 0,19 g L^{-1} an. Der mittlere H_2-Partialdruck ergab sich dabei zu 478 mbar.

Die weitere Erhöhung des Eingangspartialdrucks um 100 mbar auf $p_{H2,ein}$ = 580 mbar resultierte in einer leicht verringerten spezifischen Wachstumsrate von 0,05 h^{-1}, wobei die exponentielle Phase mindestens für 9,6 h andauerte. Der korrespondierende mittlere H_2-Partialdruck betrug dabei 573 mbar und die Biotrockenmassekonzentration am Ende der exponentiellen Phase lag bei 0,18 g L^{-1}.

Eine weiter reduzierte spezifische Wachstumsrate von 0,04 h^{-1} wurde bei einem mittleren H_2-Partialdruck von 659 mbar ermittelt, welcher aus einem Eingangspartialdruck von 664 mbar resultierte. Die Biotrockenmassekonzentration am Ende der 9,8 h anhaltenden exponentiellen Phase betrug 0,17 g L^{-1}.

Durch die Erhöhung des H_2-Eingangspartialdruckes auf 750 mbar wurde die spezifische Wachstumsrate noch weiter auf 0,03 h^{-1} reduziert. Der korrespondierende mittlere H_2-Partialdruck war dabei 749 mbar und die Biotrockenmassekonzentration am Ende der exponentiellen Phase belief sich auf 0,27 g L^{-1}.

Beim höchsten untersuchten H_2-Eingangspartialdruck von 845 mbar wurde eine spezifische Wachstumsrate von 0,03 h^{-1} ermittelt. Die exponentielle Phase dauerte dabei knapp 22,2 h an, wobei ein mittlerer H_2-Partialdruck von 843 mbar und eine Biotrockenmassekonzentration von 0,21 g L^{-1} ermittelt wurden.

Diskussion

Durch Variation des H_2-Eingangspartialdruckes und Ermittlung der spezifischen Wachstumsraten während der exponentiellen Phase wurde überprüft, wie *C. aceticum* auf gesteigerte H_2-Konzentrationen reagiert und ob möglicherweise eine Substratüberschussinhibierung vorliegt. Durch Ermittlung der korrespondierenden mittleren H_2-Partialdrücke während der exponentiellen Phasen konnte gezeigt werden, dass *C. aceticum* in CO_2/H_2-Prozessen bis zu einem H_2-Partialdruck von 478 mbar eine spezifische Wachstumsrate von 0,06 h^{-1} aufweist. Eine Ausnahme stellt dabei der Partialdruck von 218 mbar dar, bei welchem lediglich eine spezifische Wachstumsrate von 0,05 h^{-1} ermittelt werden konnte. Bei weiterer Erhöhung war hingegen die deutliche Abnahme der Wachstumsraten zu beobachten, wobei eine minimale spezifische Wachstumsrate von 0,03 h^{-1} bei den mittleren H_2-Partialdrücken 749 mbar und 843 mbar ermittelt wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *C. aceticum* bei erhöhten H_2-Partialdrücken in seinem Wachstumsverhalten inhibiert wird.

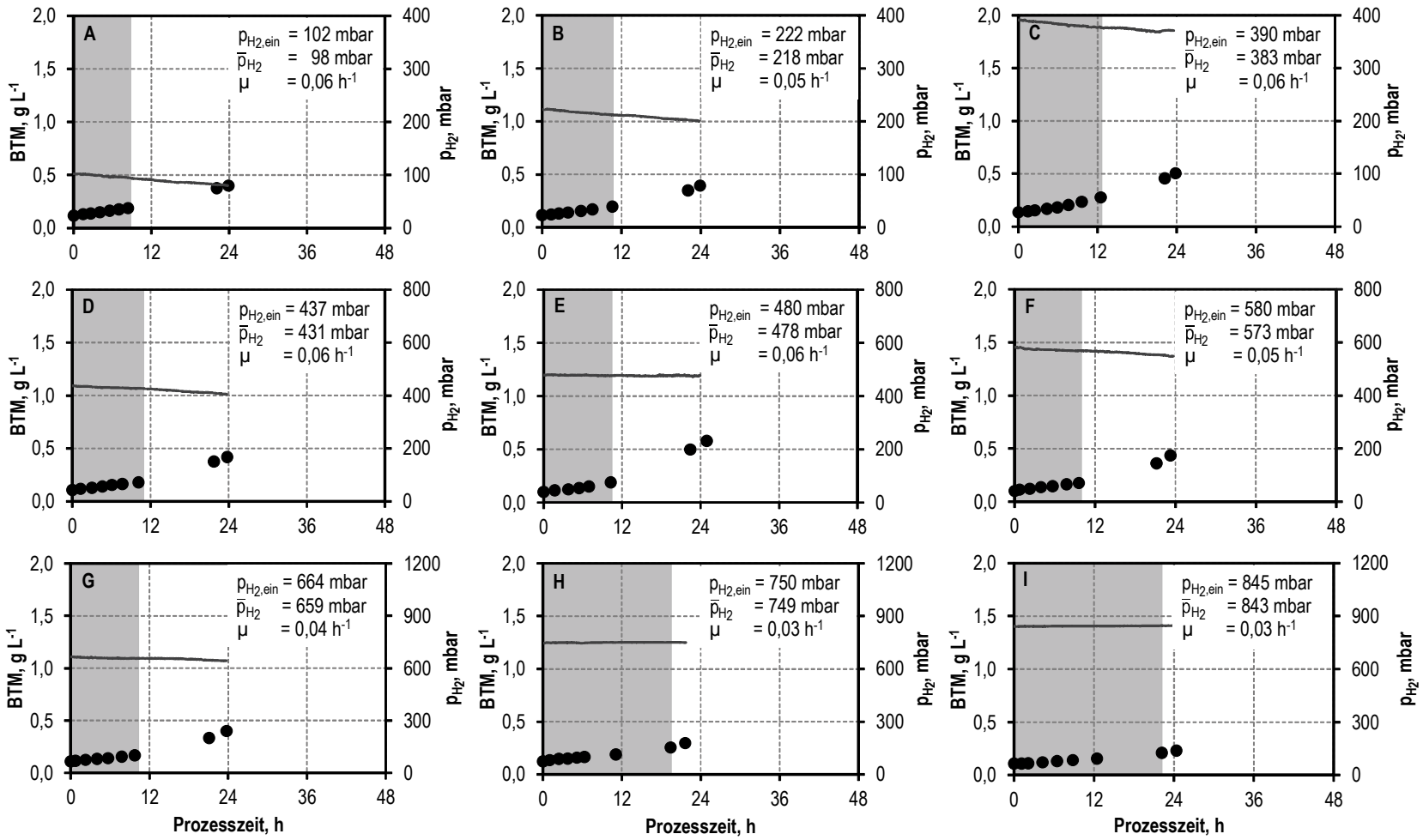

Abbildung 6.19: Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) von *C. aceticum* bei verschiedenen H_2-Eingangspartialdrücken $p_{H2,ein}$ in autotrophen Satzprozessen im kontrollierten Rührkesselreaktor. Die zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten μ herangezogenen exponentiellen Phasen mit den korrespondierenden mittleren H_2-Partialdrücken im Abgas $\bar{p}_{H2}$ sind grau schattiert (T = 30 °C; pH = 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}, u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

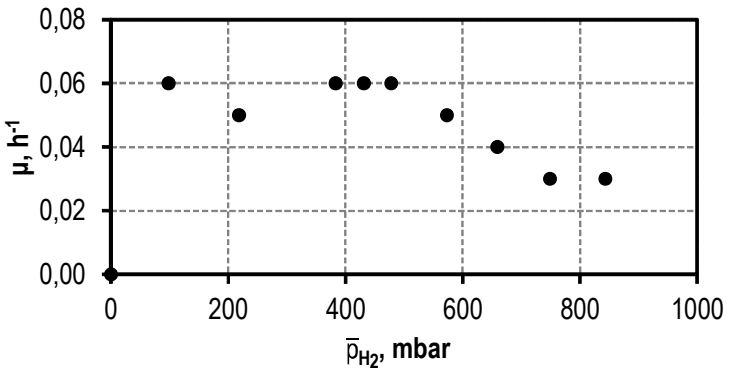

Abbildung 6.20: Ermittelte spezifische Wachstumsraten μ während der exponentiellen Wachstumsphasen von *C. aceticum* im kontrollierten Rührkesselreaktor bei variierten mittleren H_2-Partialdrücken im Abgas $\bar{p}_{H_2}$ (T = 30 °C; pH = 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}, u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Dieses Verhalten ist auch von anderen acetogenen Mikroorganismen, etwa *A. woodii* bekannt. So ist über *A. woodii* berichtet, dass dessen Wachstums- und Acetatbildungsrate in einem Überdruckreaktor bei $p_{H2,ein}$ = 1400 mbar deutlich reduziert wurden. Bei weiterer Erhöhung des H_2-Partialdruckes auf bis zu 2100 mbar war zudem eine deutliche Verzögerungsphase von 12 h beobachtet worden. In beiden Fällen war im Vergleich zum Referenzprozess mit einem $p_{H2,ein}$ von 400 mbar zudem eine deutliche Formiatbildung sowie reduzierte H_2-Aufnahmeraten zu beobachten, was auf eine Störung des reduktiven Acetyl-CoA-Weges hinweise (Kantzow & Weuster-Botz, 2016). Für *C. aceticum* konnte jedoch neben der reduzierten Wachstumsrate bei stark erhöhten H_2-Partialdrücken keine gesteigerte Formiatbildung festgestellt werden. Im Gegensatz zur in dieser Arbeit bereits charakterisierten CO-Substratinhibierung war die Inhibierung durch H_2 weitaus weniger stark ausgeprägt, sodass die Verringerung der Wachstumsrate erst bei deutlich höheren Partialdrücken beobachtet wurde. Zudem kann die Substratüberschussinhibierung nicht mit dem einfachen Modellansatz von Andrews beschrieben werden, da nicht ausreichend Messdaten bei sehr niedrigen p_{H_2} vorliegen.

7 Kontinuierliche Gasfermentationen mit *Clostridium aceticum*

Da bei Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung das vorgelegte flüssige Reaktionsmedium nicht ausgetauscht wird, werden mit zunehmender Prozessdauer trotz kontinuierlicher Zufuhr der gasförmigen Substrate essentielle Vitamine, Spurenelemente und andere Medienbestandteile verbraucht, während Stoffwechselprodukte im Reaktionsmedium akkumulieren. Dies hat zur Folge, dass Mikroorganismen zunächst in die stationäre Phase und bei vollständigem Verbrauch essentieller Nährstoffe oder nach dem Erreichen inhibierender oder gar toxischer Stoffwechselproduktkonzentrationen in die Absterbephase übergehen (siehe Abbildung 3.9). Für Prozesse mit langen Laufzeiten bietet daher die kontinuierliche Prozessführung den Vorteil, dass die Mikroorganismen kontinuierlich mit frischem Reaktionsmedium versorgt werden und eine durch Medienkomponenten verursachte Medienlimitierung verhindert wird. Weiterhin können in kontinuierlichen Prozessen inhibierende Stoffwechselprodukte ausgewaschen werden. Sofern die Verdünnungsrate D, das Verhältnis von Volumenstrom zu Flüssigvolumen im Reaktor, nicht zu hoch gewählt wird können sich bei kontinuierlicher Prozessführung im Rührkesselreaktor Fließgleichgewichts-zustände mit konstanten Gleichgewichtskonzentrationen einstellen, was gegenüber Satzprozessen den Vorteil der kontinuierlichen Produktbildung mit höheren Raum-Zeit-Ausbeuten bietet. Hydraulische Voraussetzung für ein Fließgleichgewicht ist eine Prozesszeit von mindestens 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten τ (siehe Abschnitt 3.4.2). Aufgrund der geringen Wachstumsraten von acetogenen Mikroorganismen unter autotrophen Bedingungen limitiert die maximal mögliche Wachstumsrate von *C. aceticum* die Verdünnungsrate D und damit bei wachstumsassoziierter Produktbildung auch die Raum-Zeit-Ausbeute der Produktbildung. Durch Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Medium können jedoch auch bei hohen Verdünnungsraten stabile Betriebspunkte eingestellt werden. Dabei können im Vergleich zur kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellrückhaltung weitaus höhere Biotrockenmassekonzentrationen sowie gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeuten bei gleichzeitig kontinuierlicher Versorgung mit frischem Medium sowie dem Auswaschen potentiell inhibierender Produkte erzielt werden. In dieser Arbeit wurden zur totalen Zellrückhaltung Hohlfasermembranen verwendet, welche als getauchtes Membranmodul im kontinuierlichen Membranbioreaktor das Auswaschen von *C. aceticum* verhindern.

7.1 Verwertung gasförmiger Substrate

7.1.1 Kohlenstoffmonoxid/Kohlenstoffdioxid

Chemostat

Ebenso wie im Satzprozess (siehe Abschnitt 6.2.3) wurde im kontinuierlichen Prozess die Umsetzung einer $CO/CO_2/N_2$-Gasmischung (1:1:8) untersucht, wobei die jeweiligen Eingangspartialdrücke $p_{CO,ein} = p_{CO2,ein} = 100$ mbar sowie $p_{N2,ein} = 800$ mbar betrugen. Nach Inokulation wurde der Reaktor zunächst für 8,5 h als Satzprozess betrieben um eine genügend hohe Zelldichte von *C. aceticum* für die kontinuierliche Prozessführung zu ermöglichen. Anschließend wurde die kontinuierliche Betriebsweise mit einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}06\ h^{-1}$ oder einer mittleren hydraulischen Verweilzeit τ von 16,67 h gestartet. Dies entsprach 46 % der Wachstumsrate bei $p_{CO,ein} = 100$ mbar in Satzprozessen ($\mu = 0{,}13\ h^{-1}$), wodurch ein Auswaschen der Zellen vermieden werden sollte. Für die übrigen Prozessparameter wurden wie in den bisherigen Satzprozessen die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; $u = 2{,}4\ 10^{-4}\ m\ s^{-1}$; $P\ V^{-1} = 6{,}8\ W\ L^{-1}$) gewählt. Inokuliert wurde der kontinuierliche Prozess mit 0,1 g Biotrockenmasse. In Abbildung 7.1 A - H sind die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat und Ethanolkonzentrationen, der volumetrischen CO- und CO_2-Aufnahme- und Bildungsraten (r_{CO}, r_{CO2}) sowie der Partialdrücke (p_{CO}, p_{CO2}) dargestellt. Vergleichend sind auch die Daten des bereits beschriebenen und diskutierten CO/CO_2-Satzprozesses dargestellt (siehe Abschnitt 6.2.1).

Während der 8,5 h andauernden Satzphase wurde eine spezifische Wachstumsrate von $0{,}11\ h^{-1}$ ermittelt. Nach dem Start der kontinuierlichen Prozessführung mit einer Verdünnungsrate von $0{,}06\ h^{-1}$ stieg die Biotrockenmassekonzentration nach 48 h auf einen maximalen Wert von ~2,5 g L^{-1} an. Anschließend sank diese bis Prozessende nach 100 h auf ~1,2 g L^{-1} ab. Die Acetatkonzentration stieg bis zu einer Prozesszeit von 55,8 h auf ~4,5 g L^{-1} an und blieb dann bis Prozessende konstant. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,27 g $L^{-1}\ h^{-1}$. Formiat akkumulierte zu Prozessbeginn bis 8,5 h nach Inokulation bis zu einer Konzentration von 0,45 g L^{-1}. Anschließend sank die Konzentration auf Werte um die Nachweisgrenze. Eine erneute Akkumulation von Formiat konnte erst nach knapp 56 h beobachtet werden, sodass die Formiatkonzentration zu Prozessende 0,16 g L^{-1} betrug. Die Bildung von Ethanol konnte während des gesamten Prozesses nicht beobachtet werden.

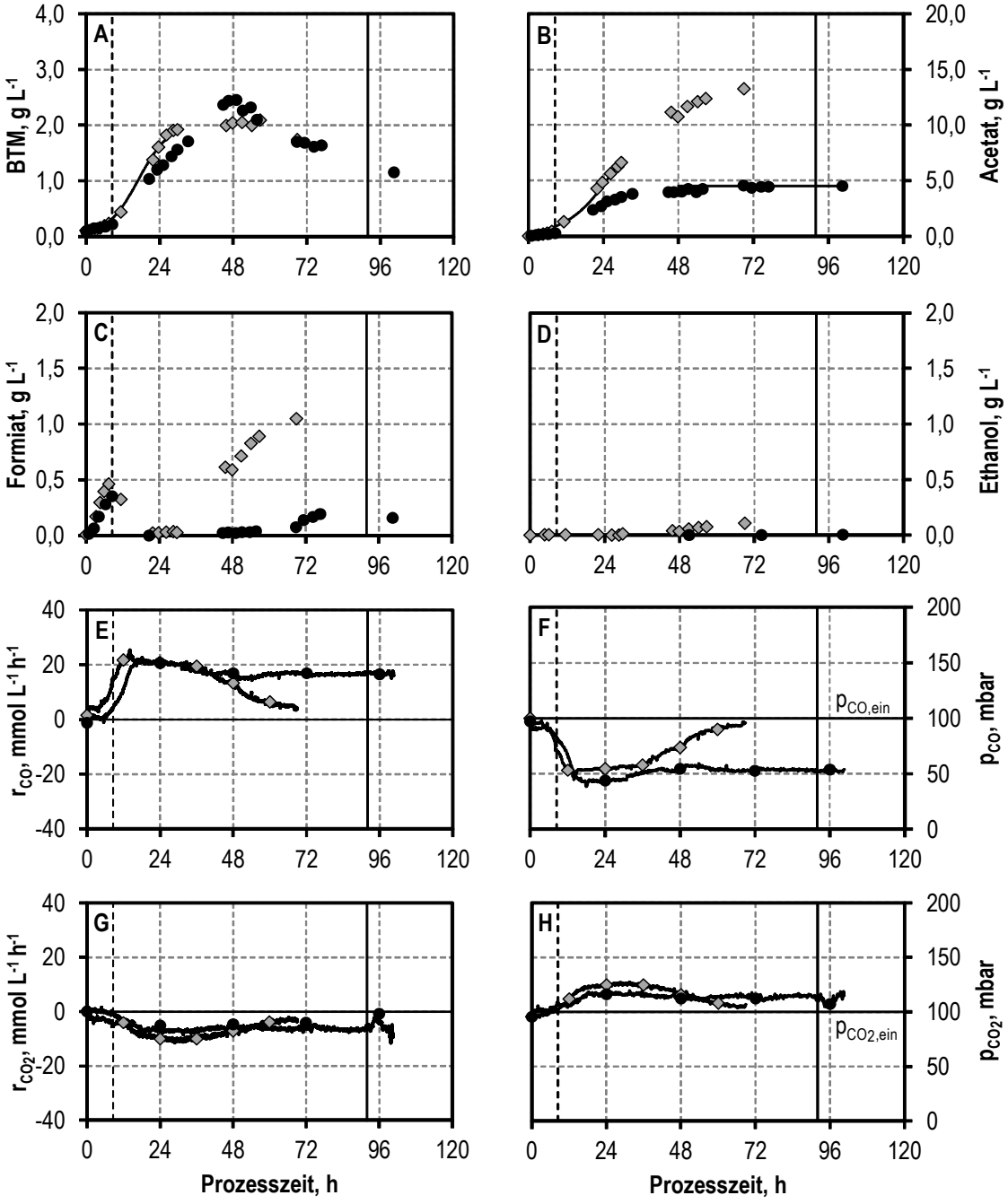

Abbildung 7.1: Autotropher kontinuierlicher CO/CO_2-Prozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen im Chemostaten mit der Verdünnungsrate $D = 0{,}06\ h^{-1}$ (schwarz) sowie vergleichend als Satzprozess (grau). Die gestrichelte Vertikale kennzeichnet den Start der kontinuierlichen Prozessführung nach 8,5 h, die durchgezogene Vertikale nach 92,3 h kennzeichnet 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten τ. Exemplarische Symbole in E, F, G und H dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung ($T = 30\ °C$; pH 8,0; $P\ V^{-1} = 6{,}8\ W\ L^{-1}$; $u = 2{,}4\ 10^{-4}\ m\ s^{-1}$; $D = 0{,}06\ h^{-1}$; $p_{CO,ein} = p_{CO2,ein} = 100$ mbar; $p_{N2,ein} = 800$ mbar).

Die CO-Aufnahmerate nahm nach Inokulation zu und zeigte nach 24 h ein Maximum von 21 mmol $L^{-1}\ h^{-1}$. Im weiteren Verlauf nahm diese ab und zeigte konstante Werte von

~16 mmol L^{-1} h^{-1}. Der CO-Partialdruck sank nach Inokulation auf einen minimalen Wert von 43 mbar nach etwa 22 h und stieg anschließend auf Werte um 53 mbar an. CO_2 wurde während des gesamten Prozesses gebildet, wobei eine maximale CO_2-Bildungsrate von 12 mmol L^{-1} h^{-1} bestimmt werden konnte. Im Gleichgewicht lag eine CO_2-Bildungsrate von knapp 7 mmol L^{-1} h^{-1} vor. Der CO_2-Partialdruck betrug zu Beginn 100 mbar, stieg jedoch auf einen durchschnittlichen Wert von 115 mbar an.

Diskussion

Die spezifische Wachstumsrate während der exponentiellen Satzphase war mit 0,11 h^{-1} im Vergleich zum Satzprozess (0,13 h^{-1}) leicht reduziert. Im Vergleich zu diesem wurde im Chemostaten jedoch zeitweise eine etwas höhere maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht. Die Reduktion der Biotrockenmassekonzentration bei ansonsten gleichbleibenden Prozessbedingungen nach 48 h ist auf die kontinuierliche Prozessführung und somit auf das Auswaschen der Biomasse zurückzuführen, wobei nach einer Prozesszeit von 96 h oder 5,2 τ für die Biotrockenmassekonzentration noch kein Fließgleichgewicht erreicht war. Das dynamische Einstellen des Fließgleichgewichts nach Erreichen des Maximalwertes nach 48 h setzt hydraulisch mindestens weitere 5 τ voraus, welche erst bei einer Prozesszeit von 131 h erreicht worden wären. Im Gegensatz hierzu stellte sich für das primäre Stoffwechselprodukt Acetat, in guter Übereinstimmung mit dem Einstellen eines Fließgleichgewichts der CO-Aufnahmerate nach knapp 48 h, bereits nach ~3,4 τ eine Gleichgewichtskonzentration ein. Wie zuvor im Satzprozess konnte eine initiale Formiatbildung mit anschließendem Verbrauch des Stoffwechselintermediats beobachtet werden. Dies bekräftigte die zuvor in Abschnitt 6.2.5 für Satzprozesse mit CO/CO_2 aufgestellte Hypothese eines Ungleichgewichts im reduktiven Acetyl-CoA-Weg sowie die Adaption an die Prozessbedingungen. Die nicht beobachtete Ethanolbildung im kontinuierlichen Prozess könnte einerseits an den geringen Konzentrationen liegen, welche, bedingt durch die kontinuierliche Prozessführung, im Vergleich zum Satzprozess nochmals deutlich niedriger und daher auch schwerer zu detektieren wären. Andererseits wurde die Ethanolbildung in Satzprozessen bislang immer erst bei Eintritt in die stationäre Phase beziehungsweise im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase beobachtet. Bei kontinuierlicher Prozessführung werden die Zellen jedoch stets in der Wachstumsphase gehalten und erreichen somit den Zustand der stationären Phase nicht, was die ausbleibende Ethanolbildung erklären könnte. Die Abgasanalytik zeigte weiterhin, dass eine Nettobildung von CO_2 stattfand. Dabei wurde ein Verhältnis $r_{CO} \cdot r_{CO_2}^{-1}$ im Gleichgewichtszustand von ~2,3 bestimmt, welches die stöchiometrische Bildung von 2 CO_2 bei Verbrauch von 4 CO leicht überschätzte. Da CO_2 in wässrigen Medien überwiegend als HCO_3^- und CO_3^{2-} chemisch gelöst vorliegt (siehe Abbildung 3.6) erfolgt bei kontinuierlicher

Prozessführung der Austrag über die Flüssigphase, wohingegen das zugeführte Medium erneut mit CO_2 gesättigt wird. Durch diese nicht-biologisch bedingte CO_2-Aufnahme wird die netto verzeichnete CO_2-Bildungsrate reduziert und somit das Verhältnis $r_{CO} \cdot r_{CO2}^{-1}$ erhöht, was die Abweichung zum stöchiometrischen Verhältnis erklären könnte.

Membranbioreaktor

In kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor wurde ebenfalls die Umsetzung von CO/CO_2 durch *C. aceticum* bei den konstanten Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein}$ = 100 mbar, $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar sowie $p_{N2,ein}$ = 700 mbar untersucht. Aufgrund der totalen Zellrückhaltung wurde die Verdünnungsrate auf D = 0,12 h^{-1} (τ = 8,33 h) erhöht. Zudem wurde in einem zweiten Prozess bei gleicher Gaszusammensetzung eine Verdünnungsrate von D = 0,18 h^{-1} (τ = 5,56 h) gewählt. Aufgrund der Verweilzeitentkopplung durch totale Zellrückhaltung konnte der Reaktor direkt nach der Inokulation kontinuierlich betrieben werden. Für die übrigen Prozessparameter wurden die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Beide Prozesse wurden mit 0,1 g Biotrockenmasse inokuliert. Weiterhin wurden durch nichtlineare Regression die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen abgeschätzt, was die Abschätzung volumetrischer und zellspezifischer Acetatbildungsraten erlaubte. In Abbildung 7.2 A - F sind die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM), Acetat-, Formiat- und Ethanolkonzentrationen sowie der abgeschätzten volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}) und in Abbildung 7.3 A - D sind die Verläufe der Aufnahmeraten und Partialdrücke für CO (r_{CO}, p_{CO}) und CO_2 (r_{CO2}, p_{CO2}) normiert als Funktion der mittleren hydraulischen Verweilzeiten τ dargestellt.

Bei einer Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} dauerte die exponentielle Phase mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,13 h^{-1} für 2,6 τ an. Hierbei wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 1,8 g L^{-1} erreicht. Die Biomasse nahm bis Prozessende zu, sodass nach 19,9 τ eine Biotrockenmassekonzentration von 14,1 g L^{-1} vorlag. Die Bildung und Akkumulation von Acetat konnte von Prozessbeginn an beobachtet werden. Dabei stellte sich nach ~5 τ ein Fließgleichgewicht von 2,75 g L^{-1} ein, welches bis Prozessende nach 19,9 τ konstant blieb. Hieraus resultierte eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,33 g L^{-1} h^{-1}. Innerhalb der ersten 0,85 τ konnte die Akkumulation von Formiat im Reaktionsmedium bis auf eine Konzentration von 0,5 g L^{-1} beobachtet werden. Anschließend sank die Formiatkonzentration und blieb bis zum Prozessende am Rande der Nachweisgrenze. Ethanol konnte während des gesamten Prozesses lediglich in Spuren nachgewiesen werden. Die volumetrischen und im

Prozesszeitraum bis 10 τ abgeschätzten zellspezifischen Acetatbildungsraten zeigten maximale Werte von r_{Acetat} = 0,37 g L^{-1} h^{-1} und q_{Acetat} = 0,18 g g^{-1} h^{-1} nach 2,6 τ und 2,2 τ. Anschließend stellte sich für die volumetrische Acetatbildungsrate eine Gleichgewichtsrate von 0,33 g L^{-1} h^{-1} ein. Die zellspezifische Acetatbildungsrate hingegen sank anschließend bis 10 τ auf 0,02 g g h^{-1} ab.

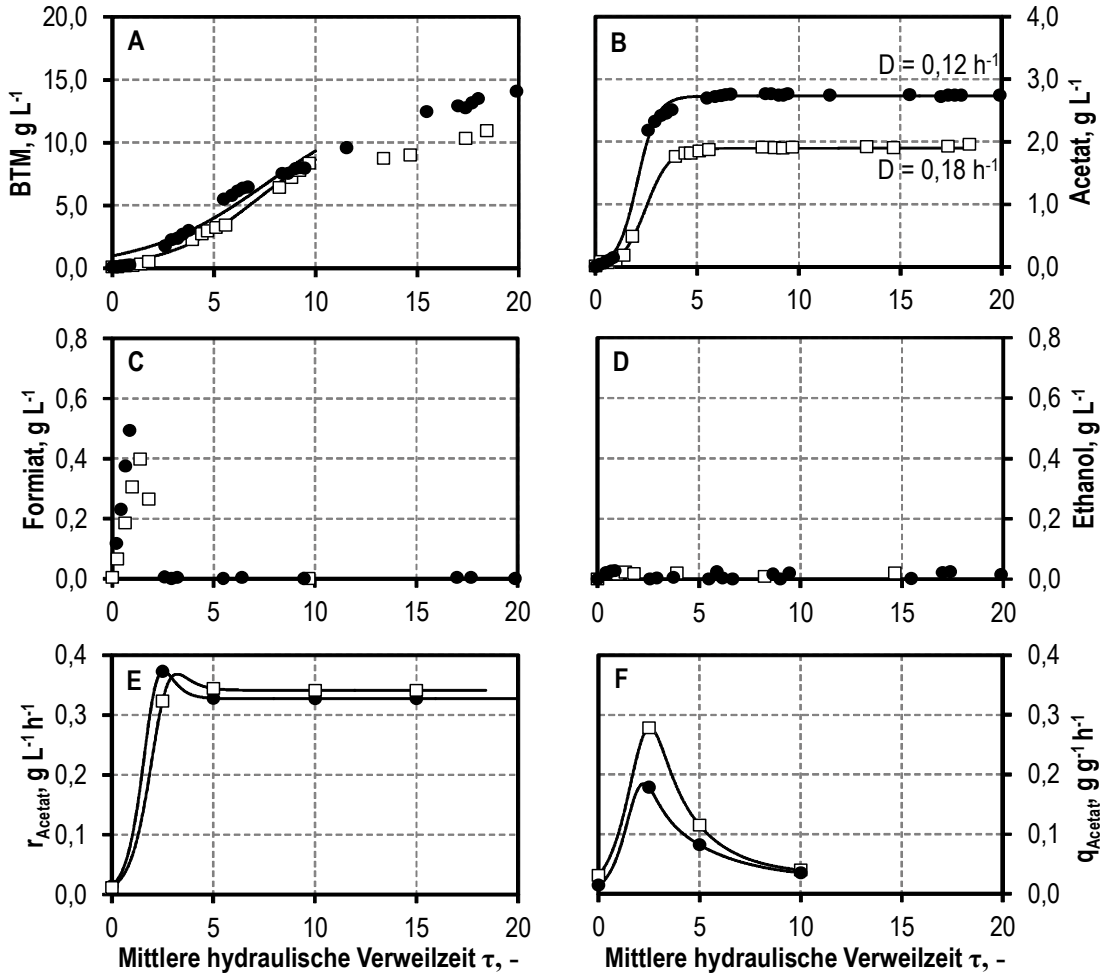

Abbildung 7.2: Autotrophe kontinuierliche CO/CO_2-Prozesse mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit den Verdünnungsraten D = 0,12 h^{-1} (schwarz) und D = 0,18 h^{-1} (weiß). Durchgezogene Linien in A, B, E und F resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar; $p_{N2,ein}$ = 700 mbar).

Die CO-Aufnahmerate r_{CO} wies nach knapp 2 τ ein Maximum von ~24 mmol L^{-1} h^{-1} auf, sank bis Prozessende jedoch auf eine konstante Rate von ~20 mmol L^{-1} h^{-1} ab. Der CO-Partialdruck fiel nach 2,1 τ auf einen minimalen Wert von 47 mbar und stieg dann bis Prozessende auf

52 mbar an. Eine geringe und kurzzeitige CO_2-Aufnahme mit maximal ~8 mmol L^{-1} h^{-1} wurde nach 1 τ ermittelt. Anschließend sank die CO_2-Aufnahmerate ab 1,9 τ bis Prozessende unter die Nachweisgrenze. Der CO_2-Partialdruck sank zu Prozessbeginn auf 175 mbar bei 0,9 τ, stieg dann jedoch bis 1,8 τ auf den Ausgangswert von 200 mbar, welcher bis Prozessende konstant blieb.

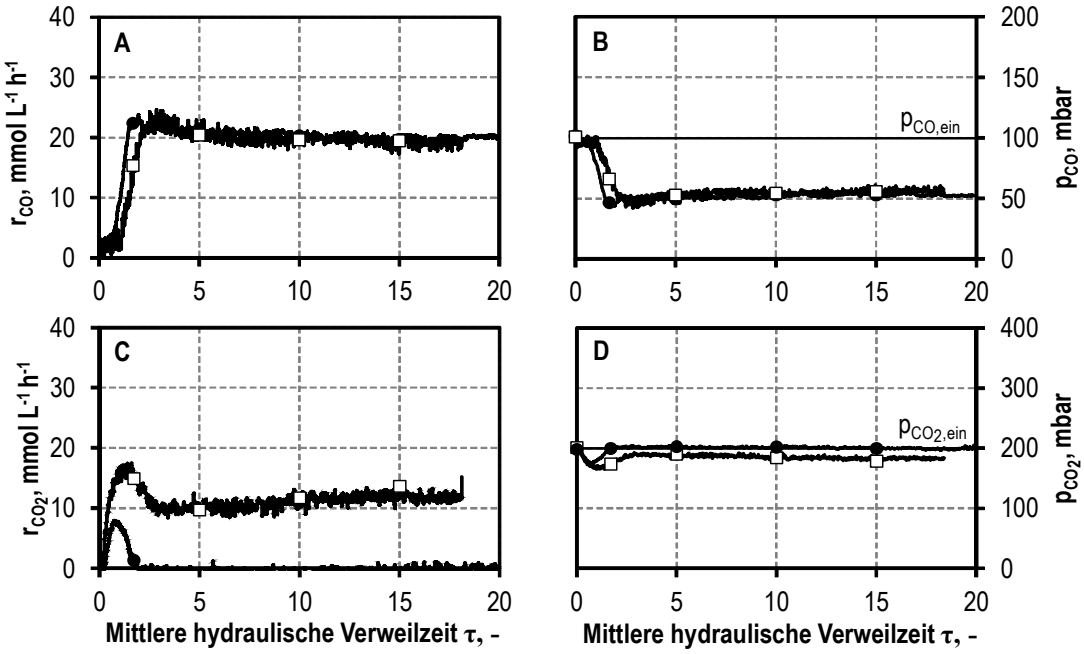

Abbildung 7.3: Abgasdaten autotropher kontinuierlicher CO/CO_2-Prozesse mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit den Verdünnungsraten D = 0,12 h^{-1} (schwarz) und D = 0,18 h^{-1} (weiß). Exemplarische Symbole in A - D dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{CO_2,ein}$ = 200 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 700 mbar).

Bei einer Verdünnungsrate von 0,18 h^{-1} dauerte die exponentielle Phase mindestens 1,8 τ an, wobei die spezifische Wachstumsrate zu 0,13 h^{-1} ermittelt wurde. Im weiteren Prozessverlauf nahm die Wachstumsrate ab, sodass zu Prozessende nach 14,7 τ eine finale Biotrockenmassekonzentration von 9,0 g L^{-1} resultierte. Die Bildung von Acetat konnte direkt nach Inokulation beobachtet werden, wobei sich nach knapp 5 τ ein Fließgleichgewicht bei einer Konzentration von 1,9 g L^{-1} einstellte. Aus diesem resultierte mit der gewählten Verdünnungsrate von 0,18 h^{-1} eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,34 g L^{-1} h^{-1}. Die Akkumulation von Formiat konnte auch bei dieser Verdünnungsrate direkt zu Prozessbeginn im Reaktionsmedium nachgewiesen werden, wobei nach 1,4 τ eine Konzentration von 0,4 g L^{-1} vorlag. Anschließend nahm die Formiatkonzentration ab und verblieb bis Prozessende am

Rande der Nachweisgrenze. Spuren von Ethanol am Rande der Nachweisgrenze konnten während des gesamten Prozesses nachgewiesen werden. Der Verlauf der abgeschätzten volumetrischen Acetatbildungsrate zeigte einen Maximalwert von 0,35 g L^{-1} h^{-1} nach 3,1 τ. Anschließend sank die volumetrische Acetatbildungsrate auf eine Gleichgewichtsrate von 0,34 g L^{-1} h^{-1}. Die im Prozesszeitraum bis 10 τ abgeschätzte zellspezifische Acetatbildungsrate wies hingegen nach 2,5 τ einen Maximalwert von 0,28 g g^{-1} h^{-1} auf und sank anschließend auf 0,03 g g^{-1} h^{-1} ab. Nach 2,9 τ konnte eine maximale CO-Aufnahmerate von ~25 mmol L^{-1} h^{-1} gemessen werden. Anschließend fiel diese bis Prozessende auf einen konstanten Wert von ~19 mmol L^{-1} h^{-1}. Nach Inokulation nahm der CO-Partialdruck zunächst ab und zeigte nach 2,9 τ einen minimalen Druck von 42 mbar an. Bis Prozessende stieg dieser jedoch wieder auf 75 mbar an. Eine geringe und kurzzeitige CO_2-Aufnahme mit maximal ~16 mmol L^{-1} h^{-1} wurde bei dieser Verdünnungsrate nach 1,5 τ ermittelt. Anschließend sank die CO_2-Aufnahmerate ab 3 τ bis Prozessende auf 10 - 12 mmol L^{-1} h^{-1}. Der CO_2-Partialdruck sank zu Prozessbeginn bis auf 173 mbar bei 1,7 τ ab. Anschließend stieg dieser jedoch bis 2,7 τ wieder auf den Ausgangswert von 180 mbar, welcher bis Prozessende konstant blieb.

Diskussion

In beiden Prozessen wurde die initiale exponentielle Wachstumsrate zu 0,13 h^{-1} ermittelt. Dies entsprach auch der in den vorherigen Untersuchungen zur Substratinhibierung in kontrollierten Satzprozessen ermittelten exponentiellen Wachstumsrate bei diesem CO-Eingangspartialdruck (siehe Abschnitt 6.4.1). Wie erwartet waren die ermittelten Wachstumsraten bei totaler Zellrückhaltung unabhängig von der Verdünnungsrate und somit bei geringen Biotrockenmassekonzentrationen lediglich vom CO-Partialdruck abhängig. Unabhängig von der Verdünnungsrate sank in beiden Fällen die Wachstumsrate bei zunehmender Prozessdauer im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase. Aufgrund der totalen Zellrückhaltung nahmen die Biotrockenmassekonzentrationen jedoch in beiden Prozessen über die gesamte Prozesszeit zu. Dabei konnten bei niedrigerer Verdünnungsrate ($D = 0,12\ h^{-1}$) ab einer Prozesszeit von ~10 τ bezogen auf die ausgetauschten Volumina des Reaktionsmediums höhere Biotrockenmassekonzentrationen erzielt werden als bei höherer Verdünnungsrate ($D = 0,18\ h^{-1}$). Ein hypothetischer Erklärungsansatz hierfür ist, dass bei geringerer Verdünnungsrate zum Aufbau von Biomasse verwendete Medienbestandteile eine längere Aufenthaltsdauer im Reaktor aufweisen und daher effizienter genutzt werden konnten. Läge im Gegensatz hierzu eine Medienlimitierung vor, so müsste eine Steigerung der Verdünnungsrate zu einer verbesserten Versorgung mit dem limitierenden Medienbestandteil und somit bei selber Verweilzeit zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen führen.

Für das Primärprodukt Acetat stellten sich unabhängig von der Verdünnungsrate nach ~5 τ Fließgleichgewichte ein. Dabei wurde wie erwartet eine höhere Gleichgewichtskonzentration bei niedrigerer Verdünnungsrate erzielt. Dass dies auf den veränderten Volumenstrom zurückzuführen war konnte anhand der identischen Raum-Zeit-Ausbeuten im Fließgleichgewicht identifiziert werden und spiegelte sich auch in den abgeschätzten volumetrischen Acetatbildungsraten wider. Diese wiesen ähnlich hohe Maximal- und Gleichgewichtswerte auf. Die Abschätzung der Biotrockenmassekonzentrationen mittels nichtlinearer Regression über sigmoidale Ausgleichsfunktionen erfolgte nur in Prozesszeiträumen bis 10 τ. Aufgrund der stetig zunehmenden Biotrockenmasse-konzentrationen durch totale Zellrückhaltung war für die restlichen Prozesszeiträume eine Beschreibung mittels sigmoidaler Ausgleichsfunktion nicht möglich. Da die Biomasse in beiden Prozessen stetig anstieg sind bei konstanten Raum-Zeit-Ausbeuten jedoch keine konstanten zellspezifischen Gleichgewichtsraten sondern die stetige Abnahme der zellspezifischen Acetatbildungsraten prognostizierbar. Beide Prozesse zeigten ebenfalls hohe Übereinstimmung bei den CO-Aufnahmeraten, welche nach Erreichen eines Maximalwertes zum Ende der exponentiellen Phasen jeweils den ähnlichen Gleichgewichtswert annahmen. Wie auch für die zellspezifischen Acetatbildungsraten bedeutete die stetige Zunahme der Biomassen jedoch die stetige Verringerung der zellspezifischen CO-Aufnahmeraten (Daten nicht gezeigt).

Da die CO-Gelöstkonzentration nicht messbar war wird zur Interpretation der beobachteten Ergebnisse die Hypothese aufgestellt, dass durch stetig steigende Biotrockenmasse-konzentrationen bei gleichzeitig angenommener konstanter CO-Massentransferrate (COTR = konst., siehe Abschnitt 3.4.4) die CO-Gelöstkonzentration im Reaktionsmedium aufgrund von Massentransferlimitierung kontinuierlich abnahm. Weiterhin wird angenommen, dass Acetat als kataboles Produkt wachstumsassoziiert gebildet wurde. Unter Berücksichtigung der Substratüberschussinhibierungskinetik (siehe Abbildung 6.18) ist mit dieser Hypothese zunächst der anfängliche Anstieg der spezifischen Wachstums- und Produktbildungsraten sowie der CO-Aufnahmeraten durch Verringerung der kontrollierenden CO-Konzentration bis zum Erreichen der optimalen Substratkonzentration zu erklären. Durch Absinken der CO-Konzentration unterhalb der optimalen CO-Konzentration $c_{CO,opt}$ tritt gemäß Definition ($c_{S,lim} < c_{S,opt}$, siehe Abschnitt 3.4.1) eine CO-Limitierung auf. Durch die stetige Konzentrationsverringerung des kontrollierenden Substrats CO sank daher die spezifische Wachstums- und Acetatbildungsrate, wobei aufgrund der steigenden Biotrockenmasse-konzentrationen, wie beobachtet, konstante Raum-Zeit-Ausbeuten resultierten.

Bei Prozessbeginn wurde mit beiden Verdünnungsraten eine kurzzeitig erhöhte CO_2-Aufnahme beobachtet, welche zeitlich mit der initialen Bildung von Formiat zusammenfiel. Da dies ebenso zuvor im Chemostaten sowie im kontrollierten Satzprozess mit CO/CO_2-Begasung beobachtet wurde, weist dies auf ein anfängliches Ungleichgewicht im reduktiven Acetyl-CoA-Weg hin. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass das thermodynamische Gleichgewicht bei der Reduktion von CO_2 zu Formiat über die Formiat-Dehydrogenase im Methyl-Zweig auf der Eduktseite liegt (Savage et al., 1987; Yamamoto et al., 1983). Dies könnte aufgrund eines Ungleichgewichts der Reduktionsäquivalente zur kurzzeitigen Akkumulation von Formiat geführt haben. Während im Chemostatprozess ($p_{CO2,ein}$ = 100 mbar, D = 0,06 h^{-1}) noch eine Nettobildung von CO_2 festgestellt wurde, war bei höherem CO_2-Eingangspartialdruck ($p_{CO2,ein}$ = 200 mbar) und höheren Verdünnungsraten im Membranbioreaktor über den gesamten Prozesszeitraum keine Nettobildung (D = 0,12 h^{-1}) oder sogar eine Nettoaufnahme (D = 0,18 h^{-1}) von CO_2 feststellbar. Dies bekräftigt die Vermutung des Austrags von chemisch gelöstem CO_2 bei kontinuierlicher Prozessführung, wodurch die Bestimmung der CO_2-Aufnahme/Bildungsraten beeinträchtigt wurde.

Eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten und somit der Produktivität durch Erhöhung der Verdünnungsrate bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen wurde somit in kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung mit $p_{CO,ein}$ = 100 mbar und $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar nicht beobachtet. Der Vergleich zum kontinuierlichen Prozess ohne Zellrückhaltung (siehe Abschnitt 7.1.1) zeigte jedoch den Vorteil des Zellrückhaltesystems, da hier trotz der geringen Wachstumsraten von *C. aceticum* höhere Verdünnungsraten mit deutlich höheren Biotrockenmassekonzentrationen möglich waren. Hierdurch war im Vergleich zum Chemostaten für das Produkt Acetat eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um 20 % möglich.

7.1.2 Kohlenstoffdioxid/Wasserstoff

Für die Substrate CO_2/H_2 wurde ebenfalls die Umsetzung in kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung und konstanten Eingangspartialdrücken $p_{CO2,ein}$ = 120 mbar, $p_{H2,ein}$ = 480 mbar und $p_{N2,ein}$ = 400 mbar im Membranbioreaktor untersucht. Zur Ermittlung möglicher Raum-Zeit-Ausbeuten wurden aufgrund der zu erwartenden geringeren Wachstumsraten für CO_2/H_2-Prozesse Verdünnungsraten von 0,06 h^{-1} (τ = 16,67 h) sowie 0,12 h^{-1} (τ = 8,33 h) gewählt. Aufgrund der Verweilzeitentkopplung durch totale Zellrückhaltung wurde die kontinuierliche Prozessführung direkt nach der Inokulation gestartet. Für die übrigen Prozessparameter wurden die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Beide

Prozesse wurden mit 0,1 g Biotrockenmasse inokuliert. In Abbildung 7.4 A - F sind die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und der Acetatkonzentrationen, der CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO_2}, r_{H_2}) sowie der resultierenden Partialdrücke (p_{CO_2}, p_{H_2}) normiert als Funktion der mittleren hydraulischen Verweilzeiten aufgetragen.

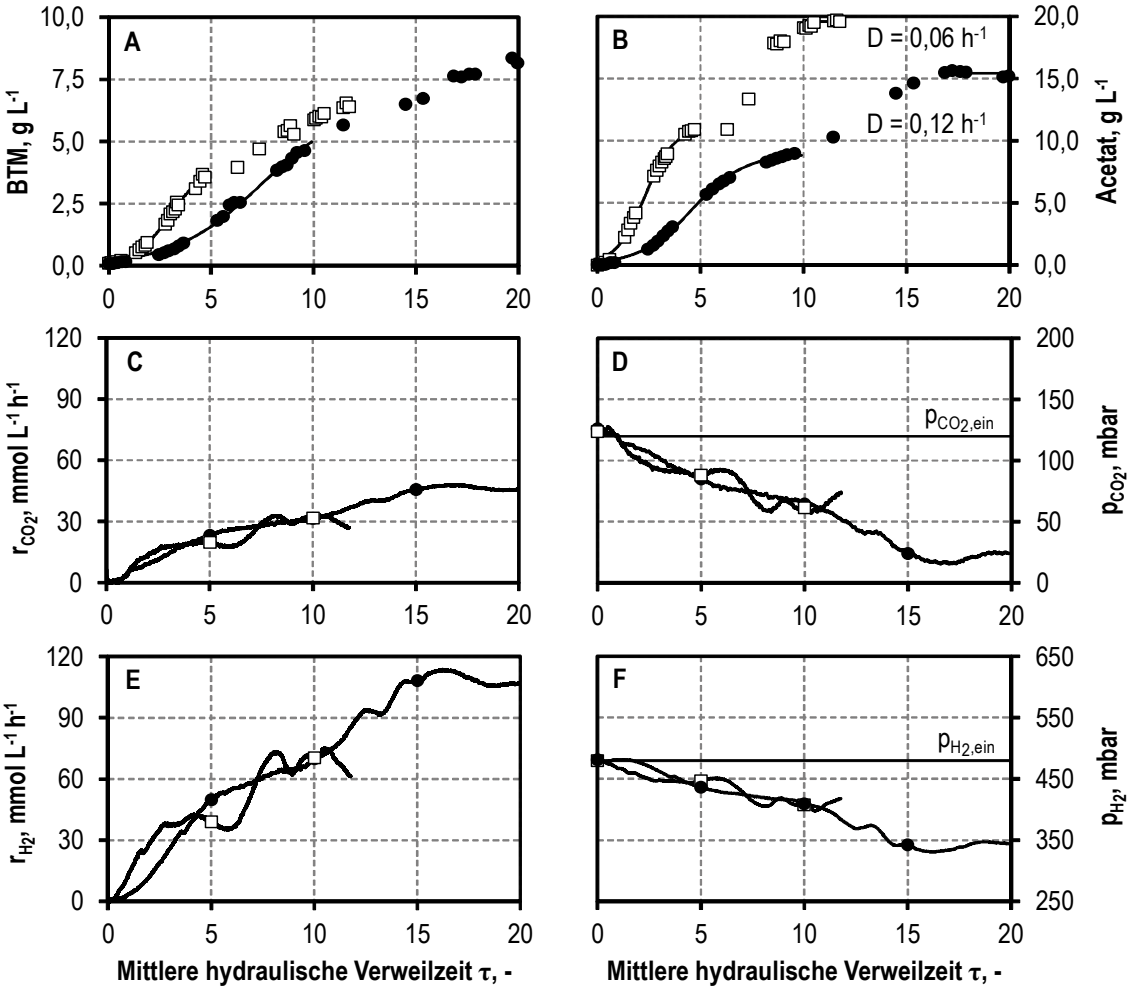

Abbildung 7.4: Autotrophe kontinuierliche CO_2/H_2-Prozesse mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit den Verdünnungsraten D = 0,06 h^{-1} (weiß) und D = 0,12 h^{-1} (schwarz). Durchgezogene Linien in A und B resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in C, D, E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; $p_{CO_2,ein}$ = 120 mbar; $p_{H_2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N_2,ein}$ = 400 mbar).

Bei einer Verdünnungsrate von 0,06 h^{-1} wurde während der 1,6 τ andauernden exponentiellen Phase eine spezifische Wachstumsrate von 0,07 h^{-1} ermittelt. Anschließend sank diese ab, sodass sich nach 4,7 τ eine Biotrockenmassekonzentration von 3,6 g L^{-1} ergab. Nach einer augenscheinlichen Plateauphase von knapp 1,6 τ mit lediglich geringer Zunahme der

Biotrockenmassekonzentration auf ~4,0 g L^{-1} stieg diese bis Prozessende nach 11,8 τ nochmals auf final 6,4 g L^{-1} an. Die Bildung von Acetat wurde direkt ab Inokulation beobachtet. Dabei stieg die Acetatkonzentration zwischen 4,7 - 6,3 τ zunächst auf eine scheinbar konstante Konzentration von 10,9 g L^{-1} an. Anschließend folgte jedoch eine erneute Steigerung der Acetatkonzentration, sodass bis zu einer Prozesszeit von 10,5 - 11,7 τ etwa 19,5 g L^{-1} akkumulierten. Die CO_2-Aufnahmerate zeigte zunächst bis ~5 τ einen Anstieg auf ~20 mmol L^{-1} h^{-1}. Erst ab einer Prozessdauer von 6,5 τ konnte die weitere Steigerung der CO_2-Aufnahmerate beobachtet werden. Ab diesem Zeitpunkt stieg r_{CO_2} auf Werte, welche zunächst um 30 mmol L^{-1} h^{-1} schwankten und zu Prozessende auf 27 mmol $L^{-1}h^{-1}$ abnahmen. Der CO_2-Partialdruck zeigte dem Verlauf der Aufnahmerate entsprechend nach 5 ± 1,5 τ zunächst einen Plateauwert von ~90 mbar. Diesem folgte die weitere Abnahme des Partialdrucks auf einen minimalen Wert von 58 mbar. Zu Prozessende betrug der Partialdruck 74 mbar. Die Aufnahmerate für H_2 stieg zu Prozessbeginn ebenfalls bis 4 τ auf ~42 mmol L^{-1} h^{-1} an. Es folgte eine geringfügige Abnahme auf ~36 mmol L^{-1} h^{-1} nach 6 τ und die weitere Zunahme auf ~73 mmol L^{-1} h^{-1} nach 8 τ. Bis Prozessende schwankte die H_2-Aufnahmerate zwischen 61 mmol L^{-1} h^{-1} und 75 mmol L^{-1} h^{-1}, wobei die finale Aufnahmerate 61 mmol L^{-1} h^{-1} betrug. Der H_2-Partialdruck zeigte einen ähnlichen Verlauf wie der CO_2-Partialdruck mit einem Plateauwert von ~450 mbar zwischen 3,9 τ und 6,2 τ. Diesem folgte die weitere schwankende Partialdruckabnahme auf 409 mbar nach 10,4 τ. Der finale Partialdruck betrug 418 mbar. Aufgrund des stufenweisen Anstieges der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen mit ausgebildeten Plateauphasen erfolgte keine Abschätzung der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten. Allerdings betrug die Raum-Zeit-Ausbeute während der beobachteten kurzen Plateauphase zwischen 4,7 - 6,3 τ etwa 0,65 g L^{-1} h^{-1}. Die weitere Acetatakkumulation mit einer geschätzten Gleichgewichtskonzentration von 19,5 g L^{-1} zu Prozessende entspräche einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,17 g L^{-1} h^{-1}. Hierbei muss jedoch betont werden, dass jeweils keine 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten vergangen und somit die hydrodynamischen Voraussetzungen eines Fließgleichgewichtes noch nicht erfüllt waren. Die Bildung von Formiat oder Ethanol konnte während des gesamten Prozesses nicht beobachtet werden.

Bei einer Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} konnte eine exponentielle Phase mit einer Dauer von 3,6 τ und der spezifischen Wachstumsrate μ = 0,07 h^{-1} ermittelt werden. Anschließend nahm die Wachstumsrate ab. Im Prozessintervall 9 - 9,6 τ war lediglich eine geringe Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von 4,3 g L^{-1} auf ~4,6 g L^{-1} zu beobachten. Daraufhin folgte eine verstärkte Biomassebildung auf einen finalen Wert von ~8,2 g L^{-1} nach 19,9 τ. Acetat

akkumulierte auch trotz der höheren Durchflussrate von Prozessbeginn an im Reaktionsmedium. Nach 9,6 τ lag eine Acetatkonzentration von 9,0 g L^{-1} im Reaktionsmedium vor. Daraufhin konnte eine weitere verstärkte Acetatakkumulation beobachtet werden. Ab einer Prozesszeit von 17,2 τ bis Prozessende stellte sich eine Gleichgewichtskonzentration von ~15,3 g L^{-1} ein. CO_2 wurde während des gesamten Prozesses aufgenommen. Hierbei zeigte sich eine abflachende Aufnahmerate bis etwa 10 τ auf 32 mmol L^{-1} h^{-1}. Dieser folgte eine verstärkte Aufnahme, sodass die Aufnahmerate nach 17 τ auf etwa 48 mmol L^{-1} h^{-1} zunahm. Bis Prozessende stellte sich eine nahezu konstante Aufnahmerate von etwa 45 mmol L^{-1} h^{-1} ein. Der CO_2-Partialdruck sank auf einen Wert von 409 mbar nach 10 τ ab. Anschließend nahm der Partialdruck weiter ab, sodass nach 17 τ ein minimaler p_{CO_2} von 15,7 mbar ermittelt wurde. Zu Prozessende stieg der CO_2-Partialdruck geringfügig auf 24,4 mbar an. Die H_2-Aufnahmerate stieg bis 5 τ auf 50 mmol L^{-1} h^{-1} an und im weiteren Verlauf stellte sich bis 10 τ eine Aufnahmerate von ~71 mmol L^{-1} h^{-1} ein. Bis 16,4 τ stieg r_{H_2} auf einen maximalen Wert von 113 mmol L^{-1} h^{-1} an. Bis Prozessende stellte sich eine konstante Aufnahme von ~107 mmol L^{-1} h^{-1} ein. Der H_2-Partialdruck nahm bis 10 τ auf knapp 410 mbar ab. Anschließend nahm der H_2-Partialdruck weiter ab, sodass nach 16,3 τ ein minimaler Partialdruck p_{H_2} von 331,6 mbar messbar war. Bis Prozessende stellte sich ein konstanter Partialdruck von ~345 mbar ein. Aufgrund des stufenweisen Anstieges der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen mit ausgebildeten Plateauphasen erfolgte keine Abschätzung der volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten. Ein erstes Konzentrationsplateau für Acetat mit 9,0 g L^{-1} konnte nach 9,6 τ beobachtet werden. Dies entspräche einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,08 g L^{-1} h^{-1}. Die zu Prozessende deutlich ausgebildete Gleichgewichtskonzentration von etwa 15,3 g L^{-1} entsprach hingegen einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,84 g L^{-1} h^{-1}, wobei die hydraulische Voraussetzung eines Fließgleichgewichts von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten noch nicht erfüllt war. Die Bildung von Formiat oder Ethanol konnte während des gesamten Prozesses nicht beobachtet werden.

Diskussion

Die ermittelten Wachstumsraten während der exponentiellen Phasen lagen mit 0,07 h^{-1} geringfügig höher als in CO_2/H_2-Satzprozessen (0,06 h^{-1}) mit denselben Eingangs-partialdrücken. Wie zuvor in den CO/CO_2-Prozessen wurden bezogen auf die hydraulischen Verweilzeiten bei geringerer Verdünnungsrate höhere Biotrockenmassekonzentrationen erzielt. Wie zuvor könnte dies durch eine längere Aufenthaltsdauer von für den Biomasseaufbau verwendeten Medienkomponenten erklärt werden. Weiterhin konnte für

beide Verdünnungsraten sowohl für die Biotrockenmasse- als auch die Acetatkonzentration das Ausbilden von Plateauphasen mit kurzzeitig konstanten Konzentrationen beobachtet werden. Diese Reduktion der Wachstums- und Produktbildungsraten spiegelte sich ebenfalls in den Gasaufnahmeraten der Substrate CO_2/H_2 wider. Da es sich um gänzlich unabhängige Prozesse mit jeweils eigens hergestelltem anaerobem Zulaufmedium handelte, ist es unwahrscheinlich, dass hierfür Fehler bei der Medienherstellung verantwortlich waren. Eine Möglichkeit könnte jedoch die mögliche Produktinhibierung durch Acetat sein. In beiden Prozessen fiel die Plateauphase mit Acetatkonzentrationen von 9,0 g L^{-1} sowie 10,9 g L^{-1} zusammen. In Voruntersuchungen war gezeigt worden, dass das Wachstum von *C. aceticum* bereits bei diesen Konzentrationen inhibiert wurde (siehe Abschnitt 5.3). Allerdings zeigte sich in den kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung nach kurzer Verzögerungszeit die weitere Zunahme der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen. Unter der Annahme, dass tatsächlich eine Produktinhibierung vorgelegen haben könnte, wäre dies ein Hinweis für die Adaption der Zellen an die produktinhibierenden Bedingungen, wodurch die erneute verstärkte Substrataufnahme und Zunahme von Biomasse- und Acetatbildung ermöglicht wurde. Zudem weist das Phänomen der dynamisch schwankenden Aufnahmeraten für CO_2 und H_2, welche zeitlich mit den beobachteten Plateauphasen korreliert werden können, auf starke, möglicherweise durch Adaption hervorgerufene, physiologische Änderungen hin.

Durch Verdopplung der Verdünnungsrate auf 0,12 h^{-1} konnte die Raum-Zeit-Ausbeute von 1,17 g L^{-1} h^{-1} (D = 0,06 h^{-1}) auf 1,84 g L^{-1} h^{-1} gesteigert werden. Dies entsprach einer Steigerung um 57 % und stellte die in dieser Arbeit höchste erzielte Acetatbildungsrate beziehungsweise Raum-Zeit-Ausbeute mit *C. aceticum* dar. Auch in der Literatur sind für *C. aceticum* keine vergleichbar hohen Acetatbildungsraten oder Raum-Zeit-Ausbeuten berichtet (Braun et al., 1981; Sim & Kamaruddin, 2008). Die Substrataufnahmeraten stiegen in beiden Prozessen über den gesamten Prozesszeitraum an, wobei für D = 0,12 h^{-1} zu Prozessende konstante Aufnahmeraten angenommen werden können. Dies könnte darauf hinweisen, dass dieser CO_2/H_2-Prozess nicht beziehungsweise erst zu Prozessende mit einer Biotrockenmassekonzentration über 8,0 g L^{-1} und mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1,84 g L^{-1} h^{-1} gaslimitiert war, wobei hierfür aufgrund der geringen Löslichkeit mutmaßlich H_2 in Frage kommt (siehe Tabelle 3.3). Im Gegensatz zu den vorherigen CO/CO_2-Prozessen waren die Acetatkonzentrationen sowie die Aufnahmeraten aufgrund des Versuchsabbruchs lediglich für knapp 3,7 τ konstant und somit die hydraulische Voraussetzung für ein Fließgleichgewicht noch nicht erfüllt. Zur Überprüfung, ob unter diesen Prozessbedingungen und bei diesen Biotrockenmassekonzentrationen die maximale Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat durch mutmaßliche Limitierung des gasförmigen Substrates H_2 tatsächlich auf

1,84 g L^{-1} h^{-1} begrenzt ist, könnte die Erhöhung des H_2-Partialdrucks oder der Leerrohrgeschwindigkeit untersucht werden.

Der Vergleich des kontinuierlichen CO_2/H_2-Prozesses mit dem CO/CO_2-Prozess mit $p_{CO,ein}$ = 100 mbar und gleicher Verdünnungsrate D = 0,12 h^{-1} zeigte, dass bei totaler Zellrückhaltung mit CO die erzielbaren Wachstumsraten sowie die im selben Prozesszeitraum möglichen Biotrockenmassekonzentrationen deutlich höher waren. Allerdings waren die Acetatbildungsraten und Gleichgewichtskonzentrationen im CO/CO_2-Prozess deutlich verringert, sodass die Raum-Zeit-Ausbeute mit den Substraten CO_2/H_2 um den Faktor 5,4 höher lag. Dies zeigt wiederum, dass der zellspezifische Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,X}$ für *C. aceticum* mit CO auch bei kontinuierlicher Prozessführung deutlich niedriger ist als für CO_2/H_2. Als Ursache wird, wie bereits für die Satzprozesse diskutiert, die unterschiedliche potentielle Energieausbeute beim Umsatz der jeweiligen Substrate zu Acetat vermutet (siehe Abschnitt 6.2.5).

Bei gleichen Prozessbedingungen (CO_2/H_2 1:4) konnte mit *Acetobacterium woodii* in kontinuierlichen Prozessen im Membranbioreaktor bereits bei geringerer Verdünnungsrate D = 0,07 h^{-1} eine Acetatkonzentration im Gleichgewicht von 23,5 g L^{-1} sowie eine Raum-Zeit-Ausbeute von 1,65 g L^{-1} h^{-1} Acetat erzielt werden. Durch Steigerung der Verdünnungsrate auf D = 0,35 h^{-1} war mit einer resultierenden Acetatgleichgewichtskonzentration von 17,6 g L^{-1} sogar eine Raum-Zeit-Ausbeute von 6,16 g L^{-1} h^{-1} und somit im Vergleich zu *C. aceticum* (D = 0,12 h^{-1}, 1,84 g L^{-1} h^{-1}) eine deutlich höhere Acetatbildung möglich (Kantzow et al., 2015).

7.1.3 Zweiphasige Prozessführung

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde bei kontinuierlicher Prozessführung mit totaler Zellrückhaltung die Umsetzung der Substrate CO/CO_2 und CO_2/H_2 durch *C. aceticum* quantitativ charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit dem Substrat CO als Kohlenstoff- und Energiequelle durch hohe Wachstumsraten einerseits hohe Biotrockenmassekonzentrationen möglich waren aber sich andererseits aufgrund des geringen zellspezifischen Acetatausbeutekoeffizienten niedrige Gleichgewichtskonzentrationen für das Primärprodukt Acetat einstellten. Für CO_2/H_2 hingegen konnte eine deutlich höhere Raum-Zeit-Ausbeute für das Primärprodukt Acetat erzielt werden. Daher wurde in einem unabhängigen kontinuierlichen Prozess mit totaler Zellrückhaltung die Möglichkeit einer zweiphasigen Prozessführungsstrategie untersucht. In einer ersten Prozessphase wurde durch Nutzung des Substrates CO eine hohe Wachstumsrate und somit eine hohe Biotrockenmassekonzentration angestrebt. Anschließend wurde durch Kontrolle der Gaszusammensetzung mit der erzielten hohen Biotrockenmassekonzentration mit CO_2/H_2 die

Induktion einer gesteigerten Produktbildung erwartet. Um beim Umstellen der Gaszusammensetzung keine schlagartige Ansäuerung des Reaktionsmediums durch Lösung von CO_2 zu verursachen, wurde für die erste Prozessphase eine Gasmischung aus $CO/CO_2/N_2$ (1:2:7) verwendet, wobei die Eingangspartialdrücke $p_{CO,ein}$ = 100 mbar, $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar sowie $p_{N2,ein}$ = 700 mbar gewählt wurden. In der zweiten Prozessphase wurde eine Gasmischung $CO_2/H_2/N_2$ (1:2,4:1,6) mit den Eingangspartialdrücken $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar, $p_{H2,ein}$ = 480 mbar und $p_{N2,ein}$ = 320 mbar gewählt. Für die übrigen Prozessparameter wurden die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. In Abbildung 7.5 A - H sind die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen, der volumetrischen CO-, CO_2- und H_2-Aufnahmeraten (r_{CO}, r_{CO2}, r_{H2}) sowie der jeweiligen Partialdrücke (p_{CO}, p_{CO2}, p_{H2}) normiert als Funktion der mittleren hydraulischen Verweilzeiten aufgetragen. Vergleichend sind die kontinuierlichen Prozesse mit totaler Zellrückhaltung bei der Verdünnungsrate D = 0,12 h^{-1} mit CO/CO_2-Begasung sowie CO_2/H_2-Begasung dargestellt.

Die CO/CO_2-Phase dauerte für 5,6 τ an. Dabei wurde für die ersten 2,6 τ die exponentielle Phase mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,13 h^{-1} ermittelt. Bis zum Ende der CO/CO_2-Phase stieg die Biotrockenmassekonzentration auf 5,2 g L^{-1} an. Nach dem Umstellen der Gaszusammensetzung auf CO_2/H_2 verblieb die Biotrockenmassekonzentration bis zu einer Prozessdauer von 6,7 τ auf 5,3 g L^{-1}, ehe sie innerhalb von 2 Verweilzeiten auf 4,4 g L^{-1} absank. Bis Prozessende nach 18,1 τ war die erneute Zunahme der Biomasse bis zu einer Konzentration von 7,6 g L^{-1} zu beobachten. Acetat wurde bis zum Ende der CO/CO_2-Phase bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von 2,7 g L^{-1} gebildet. Nach dem Umstellen der Gaszusammensetzung stieg die Acetatkonzentration zunächst auf 5,9 g L^{-1} nach 6,7 τ an. Anschließend sank diese jedoch bis 9,6 τ auf eine Konzentration von 5,4 g L^{-1} ab. Im weiteren Prozessverlauf fand die erneute, lineare Akkumulation von Acetat bis zu einer Endkonzentration von 13,3 g L^{-1} statt. Zu Prozessbeginn waren die Akkumulation auf 0,5 g L^{-1} sowie der folgende Verbrauch von Formiat bis 5,5 τ zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Über den weiteren Prozessverlauf konnten lediglich geringe Formiatkonzentrationen am Rande der Nachweisgrenze gemessen werden. Während des gesamten Prozesses wurden zudem lediglich geringe Ethanolkonzentrationen am Rande der Nachweisgrenze gemessen.

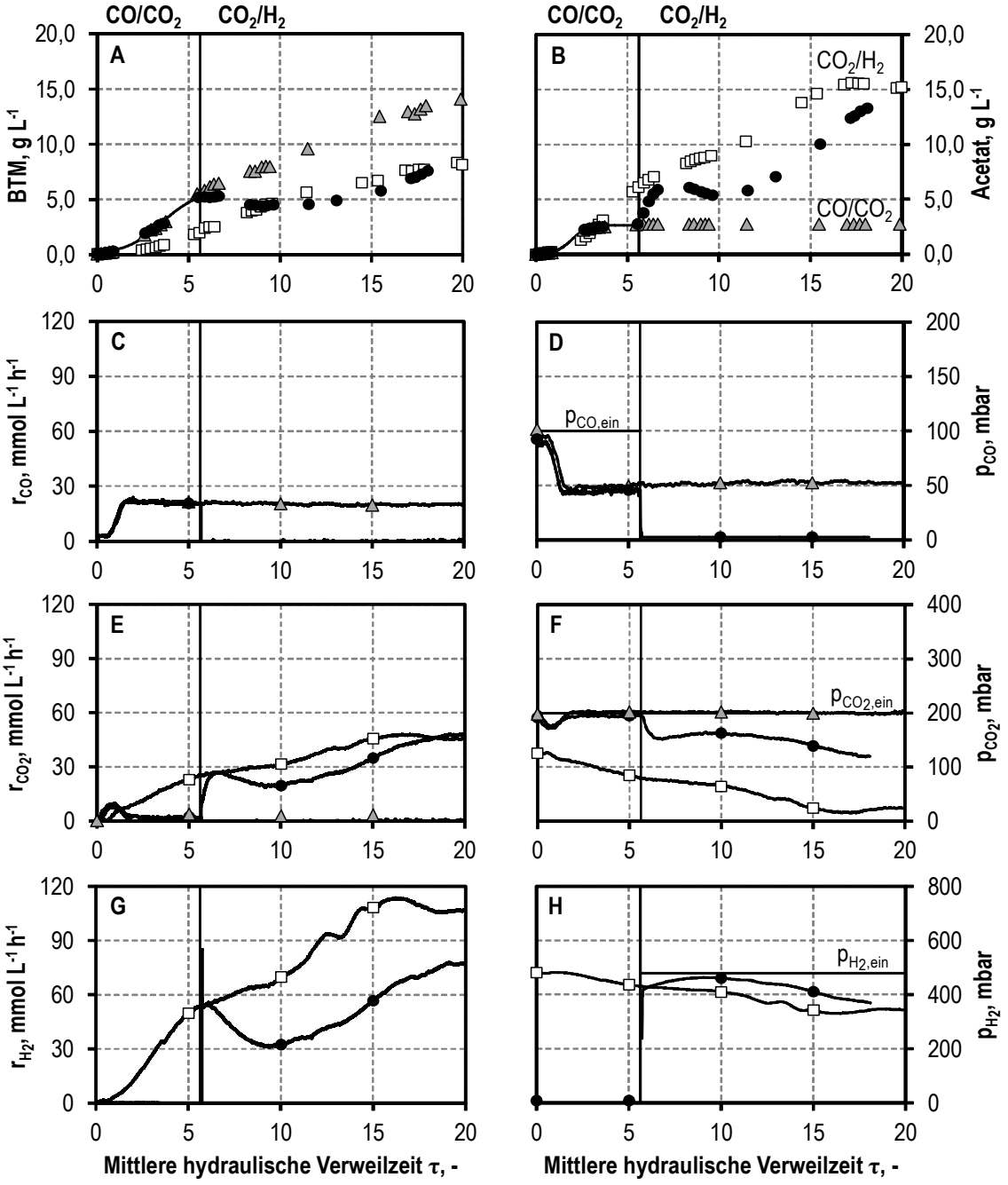

Abbildung 7.5: Autotropher kontinuierlicher zweiphasiger Prozess mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* mit einer CO/CO_2-Phase ($p_{CO,ein}$ = 100 mbar; $p_{CO2,ein}$ = 200 mbar; $p_{N2,ein}$ = 700 mbar) und einer CO_2/H_2-Phase ($p_{CO2,ein}$ = 200 mbar; $p_{H2,ein}$ = 480 mbar; $p_{N2,ein}$ = 320 mbar) (schwarz) sowie vergleichend kontinuierliche CO/CO_2- (grau) und CO_2/H_2-Prozesse (weiß) mit totaler Zellrückhaltung unter Standardbedingungen mit der Verdünnungsrate D = 0,12 h^{-1}. Durchgezogene Linien in A und B resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, die Vertikale kennzeichnet das Umstellen der Gaszusammensetzung nach 5,6 τ, exemplarische Symbole in C, D, E, F, G und H dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; D = 0,12 h^{-1}).

Die CO-Aufnahmerate r_{CO} stieg nach Inokulation innerhalb von 2 τ auf ~21 mmol L^{-1} h^{-1}. Bis zum Umstellen der Gasmischung blieb diese Rate konstant. Nach der Umstellung fiel die CO-Aufnahmerate auf 0 mmol L^{-1} h^{-1}. Der CO-Partialdruck fiel von anfänglich 100 mbar auf einen konstanten Wert von 44 mbar ab. Im Prozesszeitraum nach der Umstellung der Gaszusammensetzung betrug der p_{CO} erwartungsgemäß 0 mbar. Zu Prozessbeginn konnte eine minimale CO_2-Aufnahme von 9 mmol L^{-1} h^{-1} nach etwa 1 τ bestimmt werden. Erst nach der Umstellung der Gaszusammensetzung konnte die weitere Aufnahme festgestellt werden. Dabei stieg diese zunächst auf knapp 26 mmol L^{-1} h^{-1} nach 7 τ an, fiel dann auf einen Wert von 19 mmol L^{-1} h^{-1} nach etwa 10 τ und stieg bis Prozessende wieder auf eine Rate von 48 mmol L^{-1} h^{-1} an. Der CO_2-Partialdruck sank zu Prozessbeginn kurzzeitig auf 176,5 mbar ab. Nach Umstellung der Gaszusammensetzung sank der p_{CO_2} weiter, sodass nach 6,9 τ noch 153 mbar CO_2 im Abgas messbar waren. Bis zu einer Prozesszeit von 10 τ war der Anstieg des Partialdrucks bis 163 mbar zu beobachten, wobei anschließend bis Prozessende der p_{CO_2} bis auf 119 mbar absank. Die Aufnahme von H_2 konnte erst ab Umstellen der Gaszusammensetzung nach 5,6 τ festgestellt werden. Dabei stieg die Aufnahmerate schlagartig auf 120 mmol L^{-1} h^{-1} an, sank dann jedoch bis 9,5 τ auf einen Wert von 31 mmol L^{-1} h^{-1} ab. Bis Prozessende war anschließend die Zunahme der Aufnahmerate bis auf einen maximalen Wert von 77 mmol L^{-1} h^{-1} messbar. Der H_2-Partialdruck stieg nach Umstellung der Gaszusammensetzung zunächst bis etwa 10 τ auf 461 mbar an. Im weiteren Verlauf war bis Prozessende die Abnahme des Partialdrucks auf einen Wert von 369 mbar zu beobachten.

Diskussion

Die während der CO/CO_2-Phase ermittelte spezifische Wachstumsrate, die hieraus resultierende Biotrockenmassekonzentration, die sich einstellende Gleichgewichts-konzentration von Acetat sowie die CO-Aufnahmerate entsprachen wie erwartet in guter Übereinstimmung denen des kontinuierlichen CO/CO_2-Prozesses mit totaler Zellrückhaltung (siehe Abschnitt 7.1.1). Die ebenfalls beschriebene anfängliche Akkumulation von Formiat korrelierte zeitlich in den kontinuierlichen CO/CO_2-Prozessen mit $p_{CO_2,ein}$ = 200 mbar mit der kurzzeitigen Aufnahme von CO_2. Im Vergleich konnte im CO/CO_2-Satzprozess keine CO_2-Aufnahme beobachtet werden, wobei hier der CO_2-Eingangspartialdruck lediglich 100 mbar betrug. Der höhere CO_2-Partialdruck könnte demnach für eine verstärkte oder detektierbare CO_2-Aufnahme verantwortlich sein, wobei wie bereits für vorherige kontinuierliche Prozesse diskutiert der mutmaßliche Austrag von chemisch gelöstem CO_2 zu einer nicht-biologisch bedingten CO_2-Aufnahme führte. Nach der Umstellung der Gaszusammensetzung und der

Bereitstellung von CO_2/H_2 war direkt eine verstärkte Acetatbildung zu beobachten. Dies entsprach den Erwartungen, da aus den vorherigen Untersuchungen für CO_2/H_2 höhere zellspezifische Acetatausbeutekoeffizienten beobachtet wurden als für CO sowie CO/CO_2. Direkt nach der Umstellung der Gaszusammensetzung fand ebenfalls die sofortige Nutzung der zur Verfügung gestellten Elektronenquelle H_2 statt. Nicht vorhersehbar war jedoch, dass die Biotrockenmassekonzentration zunächst deutlich abfiel und über 5 τ benötigt wurden, bevor die erneute Zunahme der Biomasse feststellbar war. In Folge war die Acetatbildung reduziert, weswegen die Acetatkonzentration im Reaktionsmedium sowie die CO_2- und H_2-Aufnahmeraten im selben Zeitraum ebenfalls absanken. Erst durch die erneute Zunahme der Biotrockenmasse war die kontinuierliche Zunahme der Acetatkonzentration sowie der CO_2- und H_2-Aufnahmeraten zu beobachten. Im Vergleich zum kontinuierlichen CO_2/H_2-Prozess mit totaler Zellrückhaltung konnten nach 5,6 τ zunächst höhere Biotrockenmassekonzentrationen erzielt werden. Durch Umstellung der Substratzusammensetzung folgten jedoch die Reduktion der Biotrockenmassekonzentration, mutmaßlich durch Zelllyse, sowie eine Adaptionsphase, ehe erneutes Biomassewachstum möglich war. Daher lag die Biotrockenmassekonzentration bis Prozessende sogar unter der des CO_2/H_2-Prozesses. Über die Ursache der Biomassereduktion und des damit verbundenen Einbruchs der Acetatbildung kann nur spekuliert werden. Möglich wäre jedoch, dass aufgrund der vorangegangenen CO/CO_2-Phase zunächst die Adaption an das neue Substratspektrum nötig war.

Für die Acetogenen *C. thermoautotrophicum* sowie *A. kivui* konnte ermittelt werden, dass die Substratzusammensetzung starken Einfluss auf die Expression von Hydrogenasen, CO-Dehydrogenasen und Formiatdehydrogenasen hat (Daniel et al., 1990; Kellum & Drake, 1986). Im Vergleich zum Wachstum auf CO ist die freie Standardenthalpie bei Wachstum auf CO_2/H_2 verringert, was eine verstärkte Hydrogenaseaktivität zur Bereitstellung ausreichender Mengen an Reduktionsäquivalenten nötig macht. Somit könnte die aufgetretene Adaptionsphase an die veränderten Prozessbedingungen durch die Notwendigkeit einer erhöhten Hydrogenaseexpression verursacht sein. Ein Nachweis hierzu durch die Untersuchung der Enzymaktivitäten und der Genexpression in den jeweiligen Prozessphasen ist jedoch nicht erfolgt.

7.2 Partialdruckkontrolle

Durch Identifikation der CO-Inhibierungskinetik in kontrollierten Satzprozessen konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer Substratüberschussinhibierung der CO-Partialdruck die Wachstumsrate von *C. aceticum* mit CO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle bestimmt (siehe Abschnitt 6.4.1). Mangels der Möglichkeit der Quantifizierung der CO-Gelöstkonzentration wäre es zur Vermeidung inhibierender Substratkonzentrationen bei geringen Biotrockenmassekonzentrationen unter 0,5 g L^{-1} sinnvoll, den CO-Partialdruck im Prozess zu regeln. Da keine Möglichkeit zur CO-Partialdruckregelung bestand, wurde der CO-Partialdruck durch regelmäßige Überprüfung der Differenz zwischen dem CO-Partialdruck p_{CO} und dem CO-Eingangspartialdruck $p_{CO,ein}$ manuell durch Anpassung des Eingangspartialdrucks eingestellt.

7.2.1 Chemostat

Bei einer Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} wurde versucht einen Sollwert von 18 mbar CO im Chemostaten einzustellen. Für die übrigen Prozessparameter wurden die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. In Abbildung 7.6 A - H sind die Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen, der abgeschätzten volumetrischen und zellspezifischen Acetatbildungsraten (r_{Acetat}, q_{Acetat}), der volumetrischen und zellspezifischen CO-Aufnahmeraten (r_{CO}, q_{CO}), des CO-Partialdrucks (p_{CO}) sowie der CO_2-Aufnahmerate und des CO_2-Partialdrucks (r_{CO_2}, p_{CO_2}) dargestellt.

Bis zum Erreichen einer Biotrockenmassekonzentration von 0,5 g L^{-1} nach 1,6 τ wurde für die exponentielle Phase eine spezifische Wachstumsrate von 0,22 h^{-1} ermittelt. Anschließend sank die Wachstumsrate und die Biotrockenmassekonzentration stieg bis Prozessende nach 5,9 τ auf 1,6 g L^{-1} an. Acetat akkumulierte während des Prozesses auf einen Wert von 2,8 g L^{-1}, wobei diese Konzentration für mindestens 2,5 τ im Fließgleichgewicht war. Die abgeschätzte volumetrische Acetatbildungsrate zeigte einen Maximalwert von 0,37 g L^{-1} h^{-1} nach 2,6 τ. Anschließend sank diese leicht, sodass eine konstante volumetrische Acetatbildungsrate beziehungsweise eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,33 g L^{-1} h^{-1} erreicht wurde. Die abgeschätzte zellspezifische Acetatbildungsrate stieg nach 1,6 τ zunächst auf einen maximalen Wert von 0,48 g g^{-1} h^{-1} an. Im weiteren Verlauf sank die zellspezifische Acetatbildungsrate bis Prozessende auf einen Wert von 0,21 g g^{-1} h^{-1}. Für die spezifische Wachstumsrate μ wurde bis zu einer Prozesszeit von 1,6 τ auf Basis der nichtlinearen Regression der Biotrockenmassekonzentration ein konstanter Wert von 0,22 h^{-1} abgeschätzt.

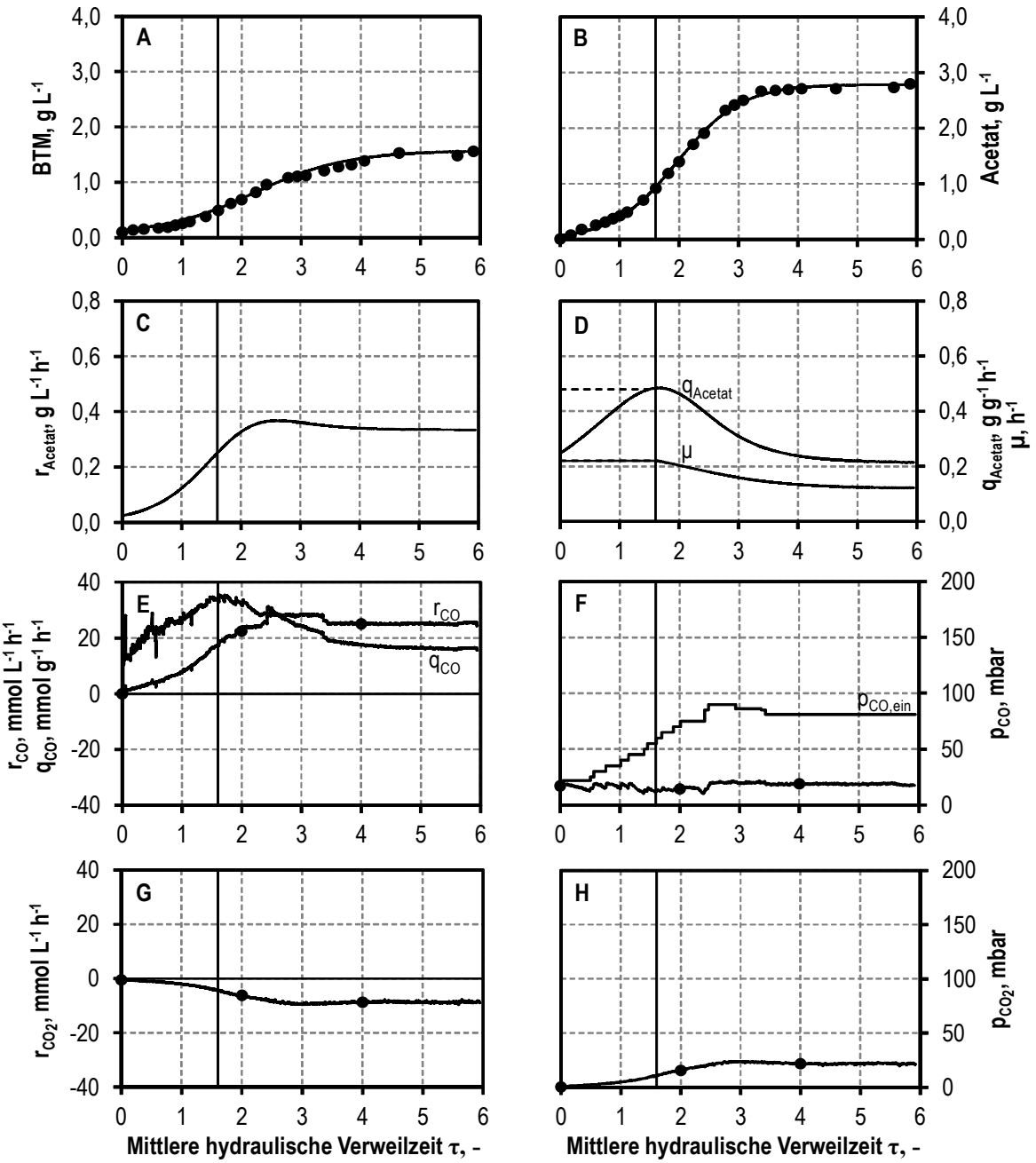

Abbildung 7.6: Autotropher kontinuierlicher CO-Prozess im kontrollierten Rührkesselreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen im Chemostaten mit manuell kontrolliertem konstantem CO-Partialdruck p_{CO} und der Verdünnungsrate D = 0,12 h^{-1}. Die Vertikale kennzeichnet den Gültigkeitsbereich der Inhibierungskinetik (c_X < 0,5 g L^{-1}), durchgezogene Linien in A, B, C und D resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, die gestrichelten Horizontalen in D kennzeichnen die auf der identifizierten Inhibierungskinetik basierenden erwarteten spezifischen Raten q_{Acetat} und μ. Exemplarische Symbole in E, F, G und H dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}, D = 0,12 h^{-1}).

Im weiteren Verlauf sank diese auf einen nahezu konstanten Wert von 0,12 h^{-1} zu Prozessende. Während des gesamten Prozesses konnten Formiat- und Ethanol-konzentrationen lediglich am Rande der Nachweisgrenze ermittelt werden (Daten nicht

gezeigt). Für die volumetrische CO-Aufnahmerate wurde nach 2,5 τ ein Maximum von ~29 mmol L^{-1} h^{-1} ermittelt. Anschließend nahm die Aufnahmerate r_{CO} einen konstanten Wert von knapp 25 mmol L^{-1} h^{-1} an. Die mit Hilfe der nichtlinearen Regression für die Biotrockenmassekonzentration abgeschätzte zellspezifische CO-Aufnahmerate q_{CO} erreichte nach etwa 1,6 τ einen maximalen Wert von ~35 mmol g^{-1} h^{-1}. Im weiteren Prozessverlauf sank diese auf einen Wert von knapp 16 mmol g^{-1} h^{-1} ab. Während der ersten 2,4 τ wurde der CO-Partialdruck durch manuelle Anpassung des CO-Eingangspartialdrucks bis zu $p_{CO,ein}$ = 85 mbar bei 15,5 ± 2,2 mbar gehalten. Bei einem konstanten CO-Eingangspartialdruck von 81 mbar verblieb der CO-Partialdruck bei ~18 mbar konstant. Die Bildung von CO_2 konnte während des gesamten Prozesses gemessen werden. Dabei wurde eine maximale Bildungsrate von ~10 mmol L^{-1} h^{-1} ermittelt. Der CO_2-Partialdruck stieg bis Prozessende auf einen nahezu konstanten Wert von 22 mbar. Im Fließgleichgewicht betrug der CO-Umsatz ~80 %.

Diskussion

Der Gültigkeitsbereich der identifizierten Substratüberschussinhibierungskinetik von *C. aceticum* lag in kontrollierten Satzprozessen bei einer Biotrockenmassekonzentration bis zu 0,5 g L^{-1}. Diese Konzentration wurde im Chemostaten nach 1,6 τ erreicht. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte eine spezifische Wachstumsrate von 0,22 h^{-1} ermittelt werden, welche genau der erwarteten Wachstumsrate bei dem vorliegenden mittleren CO-Partialdruck von 18 mbar entsprach. Ebenso entsprach die maximale zellspezifische Acetatbildungsrate mit 0,48 g g^{-1} h^{-1} dem Erwartungswert der identifizierten Kinetik. Anschließend sanken die zellspezifischen Raten erwartungsgemäß, sodass sich Fließgleichgewichte für die Biotrockenmasse- (1,6 g L^{-1}) und Acetatkonzentrationen (2,7 g L^{-1}) einstellten. Für die spezifische Wachstumsrate folgte dementsprechend $\mu = D = 0{,}12$ h^{-1} sowie für die Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat 0,33 g L^{-1} h^{-1}. Das Maximum der abgeschätzten zellspezifischen CO-Aufnahmerate fiel dabei mit dem Erreichen der Biotrockenmassekonzentration von 0,5 g L^{-1} zusammen und nahm anschließend ab. Für die volumetrischen CO-Aufnahme- sowie CO_2-Bildungsraten konnte ebenfalls das Einstellen konstanter Gleichgewichtsraten festgestellt werden.

Im Chemostaten wird die spezifische Wachstumsrate μ durch die Verdünnungsrate D bestimmt ($\mu = D$, siehe Abschnitt 3.4.3). Bei einer CO-Substratüberschussinhibierung wird die spezifische Wachstumsrate wiederum durch CO kontrolliert ($\mu = f(c_{CO})$). Unter der Annahme einer CO-Massentransferlimitierung sowie konstanter CO-Massentransferrate stellt sich für die Biomasse, wie beobachtet, ein Fließgleichgewicht mit $\mu(c_{CO}) = D$ ein. Der stabile Betriebspunkt

stellt sich bei Substratüberschussinhibierung im Chemostaten jedoch nur ein, sofern die CO-Konzentration kleiner als die kritische CO-Konzentration ist ($c_{CO} < c_{CO,krit}$, siehe Abbildung 3.11). Da die CO-Gelöstkonzentrationen nicht messbar waren wurden mit Hilfe der identifizierten kinetischen Parameter der Substratüberschussinhibierung (siehe Abschnitt 6.4.1) die korrespondierenden CO-Gleichgewichtspartialdrücke der Flüssigphase für $\mu = 0{,}12\ h^{-1}$ zu $p_{CO,1} = 0{,}24$ mbar und $p_{CO,2} = 108{,}13$ mbar abgeschätzt. Da der CO-Partialdruck auf 18 mbar kontrolliert wurde muss der theoretische CO-Gleichgewichts-partialdruck der Flüssigphase $p_{CO,1} = 0{,}24$ mbar betragen. Mit den bestimmten kinetischen Parametern ergibt sich zudem $p_{CO,krit} = 5{,}4$ mbar. Da somit die Bedingung eines stabilen Betriebspunktes erfüllt ist, stellt dieser Partialdruck den stabilen Betriebspunkt bei der Verdünnungsrate $D = 0{,}12\ h^{-1}$ im Chemostaten für *C. aceticum* dar.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *at-line*-Kontrolle des CO-Partialdrucks durch manuelle CO-Eingangspartialdruckkontrolle auch bei geringem p_{CO}-Sollwert möglich war. Anhand der ermittelten Wachstumsrate konnte bestätigt werden, dass hierbei auch während der exponentiellen Phase keine limitierenden Bedingungen auftraten.

7.2.2 Membranbioreaktor

Unter massentransferlimitierten Bedingungen stellt der Chemostat bei Substratüberschuss-inhibierung keine stabile Prozessoption dar, da eine zu starke Erhöhung des CO-Partialdrucks aufgrund der damit verbundenen Erhöhung der CO-Massentransferrate bei konstanter Verdünnungsrate leicht zu einem instabilen Betriebspunkt führen würde (siehe Abschnitt 3.4.3). Dies hätte das Auswaschen der Zellen aus dem Reaktor zur Folge. Im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung ist dies nicht der Fall.

Variation der Verdünnungsrate

Im Membranbioreaktor mit CO als alleinigem Substrat (CO/N_2) wurde die Verdünnungsrate nach Erreichen des Fließgleichgewichts um 50 % von $0{,}12\ h^{-1}$ auf $0{,}18\ h^{-1}$ erhöht. Der CO-Partialdruck wurde durch Kontrolle des Eingangspartialdrucks für den gesamten Prozess konstant auf ~ 20 mbar gehalten. Für die übrigen Prozessparameter wurden die zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; $u = 2{,}4\ 10^{-4}\ m\ s^{-1}$; $P\ V^{-1} = 6{,}8\ W\ L^{-1}$) gewählt. Die resultierenden Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen, der CO- und CO_2-Aufnahme- und Bildungsraten (r_{CO}, r_{CO_2}) sowie der zugehörigen Partialdrücke (p_{CO}, p_{CO_2}) sind in Abbildung 7.7 A - F dargestellt.

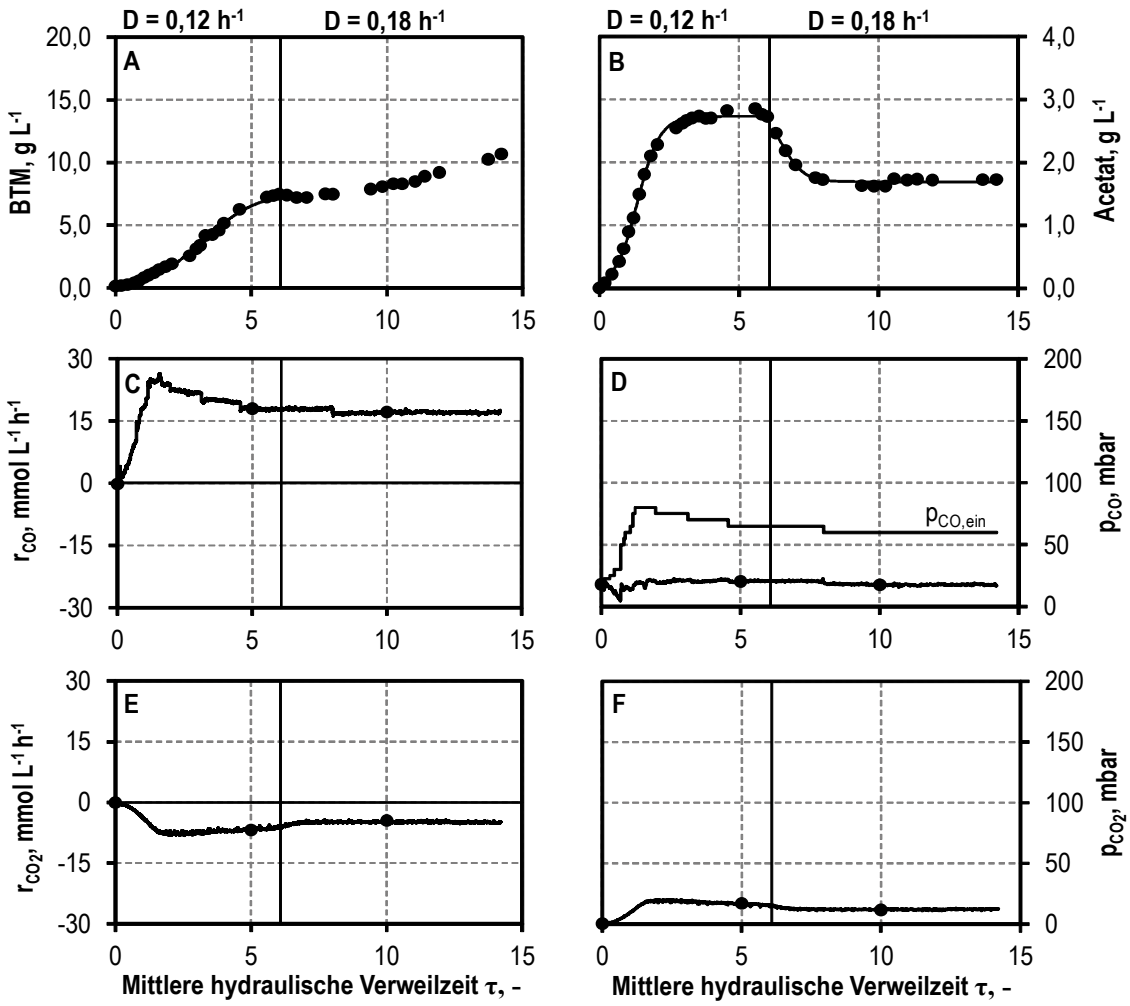

Abbildung 7.7: Autotropher kontinuierlicher CO-Prozess mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit manuell kontrolliertem konstantem CO-Partialdruck p_{CO} und den Verdünnungsraten D = 0,12 h^{-1} und D = 0,18 h^{-1}. Die Vertikale kennzeichnet das Umschalten der Verdünnungsrate von D = 0,12 h^{-1} auf D = 0,18 h^{-1} nach 6 τ. Durchgezogene Linien in A und B resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in C, D, E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Bis zu einer Prozesszeit von 6 τ wurde mit einer Verdünnungsrate von D = 0,12 h^{-1} kultiviert. Dabei stieg die Biotrockenmassekonzentration auf 7,4 g L^{-1} an. Für Acetat stellte sich ein Fließgleichgewicht von 2,7 g L^{-1} ein. Dies entsprach bei dieser Verdünnungsrate einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,32 g L^{-1} h^{-1}. Die CO-Aufnahmerate zeigte nach 1,5 τ einen Maximalwert von 26 mmol L^{-1} h^{-1}. Anschließend sank die Aufnahmerate bis 6 τ auf ~18 mmol L^{-1} h^{-1}. Zur Aufrechterhaltung eines CO-Partialdrucks von ~20 mbar wurde der Eingangspartialdruck auf maximal 80 mbar erhöht. Bis zur Umstellung der Verdünnungsrate wurde der Eingangspartialdruck wieder auf 65 mbar reduziert. Die CO_2-Bildungsrate wies nach 2,5 τ einen Maximalwert von etwa 8 mmol L^{-1} h^{-1} auf. Bis zum Ende der ersten Prozessphase mit

D = 0,12 h^{-1} stellte sich eine Bildungsrate von ~6 mmol L^{-1} h^{-1} ein. Der CO_2-Partialdruck stieg nach Inokulation zunächst bis auf 20 mbar, fiel zum Ende der ersten Prozessphase jedoch auf 15 mbar ab.

Nach dem Umstellen der Verdünnungsrate auf 0,18 h^{-1} stieg die Biotrockenmassekonzentration innerhalb von 8,2 τ auf 10,7 g L^{-1} an. Die Acetatkonzentration im Reaktionsmedium fiel dabei binnen 3,4 τ auf ein neues Fließgleichgewicht von 1,7 g L^{-1}. Mit einer Verdünnungsrate von 0,18 h^{-1} entsprach dies einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,32 g L^{-1} h^{-1}. Die CO-Aufnahmerate in der zweiten Prozessphase blieb nahezu konstant und zeigte lediglich nach 8 τ eine geringfügige Abnahme von 18 mmol L^{-1} h^{-1} auf ~17 mmol L^{-1} h^{-1}, welche bis Prozessende erreicht wurde. Dies korrelierte zeitlich mit der Reduktion des CO-Eingangspartialdrucks von 65 mbar auf 60 mbar. Der finale CO-Partialdruck betrug ~18 mbar. Für CO_2 stellte sich bei einer Verdünnungsrate von 0,18 h^{-1} eine konstante Bildungsrate von 5 mmol L^{-1} h^{-1} sowie ein konstanter Abgaspartialdruck von 12 mbar ein.

Diskussion

Mit der ersten Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} stellte sich für das Produkt Acetat ein Fließgleichgewicht von 2,7 g L^{-1} ein. Dabei resultierte bei vorherigen Prozessen mit Verweilzeitentkopplung der Biotrockenmasse im kontinuierlichen Membranbioreaktor, derselben Durchflussrate und CO-Eingangspartialdrücken $p_{CO,ein}$ = 100 mbar sowohl bei reiner CO-Begasung als auch mit CO/CO_2 dieselbe Raum-Zeit-Ausbeute. Die Erhöhung der Verdünnungsrate reduzierte erwartungsgemäß die Acetatgleichgewichtskonzentration. Dabei wurde mit der um 50 % erhöhten Verdünnungsrate dieselbe Raum-Zeit-Ausbeute erzielt. Nach Erhöhung der Medienzu- und abfuhr konnte eine kurzzeitige Verzögerung der Zunahme der Biotrockenmassekonzentration beobachtet werden. Dasselbe Phänomen wurde zuvor bereits bei den unabhängigen kontinuierlichen CO/CO_2- sowie den CO_2/H_2-Prozessen im Membranbioreaktor mit unterschiedlichen Verdünnungsraten (D = 0,06 h^{-1}, D = 0,12 h^{-1} und D = 0,18 h^{-1}) beobachtet (siehe Abschnitte 7.1.1 und 7.1.2). Eine Hypothese hierfür war, dass bei niedrigerer Verdünnungsrate die Aufenthaltsdauer von Medienkomponenten zum Biomasseaufbau erhöht ist.

Die trotz steigender Biotrockenmassekonzentration von der Verdünnungsrate unabhängigen konstanten Gasaufnahme- sowie volumetrischen Acetatbildungsraten sind unter der Annahme einer CO-Massentransferlimitierung sowie konstanter CO-Transferrate wiederum mit der Reduktion der CO-Konzentration in der Kernströmung und der damit verbundenen

Verringerung der spezifischen Wachstums- und Produktbildungsraten bei Substratüberschussinhibierung ($c_{CO} < c_{CO,opt}$) erklärbar.

Die Verringerung des CO-Partialdrucks, etwa im Prozesszeitraum zwischen 1,5 τ und 6 τ sowie nach 8 τ, führte hingegen zur Verringerung der CO-Aufnahmerate. Unter der Annahme einer CO-Massentransferlimitierung kann dies dadurch erklärt werden, dass die Verringerung des treibenden Konzentrationsgefälles ($p_{CO}^* - p_{CO,l}$) bei ansonsten konstanten Prozessbedingungen zur Reduktion der CO-Transferrate sowie der CO-Aufnahmerate geführt hatte ($r_{CO} = COTR = k_La \cdot (p_{CO}^* - p_{CO,l})$, siehe Abschnitt 3.4.4). Eine Steigerung der CO-Transferrate ist demnach durch Erhöhung des Partialdrucks möglich, wobei eine Erhöhung des CO-Partialdrucks aufgrund der Substratüberschussinhibierung und der nicht messbaren CO-Konzentrationen kontrolliert vorgenommen werden muss.

Partialdruckerhöhung im Membranreaktor

Der anfängliche p_{CO}-Sollwert im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor bei D = 0,12 h^{-1} betrug 18 mbar. Die weiteren Sollwerte wurden auf 45 mbar CO sowie 95 mbar CO festgelegt. Die übrigen Prozessparameter wurden gemäß der zuvor ermittelten und festgelegten Standardwerte (T = 30 °C; pH 8,0; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}) gewählt. Die resultierenden Verläufe der Biotrockenmasse- (BTM) und Acetatkonzentrationen, der Aufnahme- und Bildungsraten für CO- und CO_2 (r_{CO}, r_{CO_2}) sowie der zugehörigen Partialdrücke (p_{CO}, p_{CO_2}) sind in Abbildung 7.8 A - F dargestellt.

Bis zu einer Prozessdauer von 5,6 τ wurde der CO-Eingangspartialdruck bis auf einen Wert von 60 mbar gesteigert um einen p_{CO} von ~18 mbar aufrechtzuerhalten. Tatsächlich lag der gemessene CO-Partialdruck während dieses Prozessintervalls jedoch deutlich niedriger. Während der ersten hydraulischen Verweilzeit lag der gemessene CO-Partialdruck lediglich bei 10 ± 2,1 mbar. In dieser ersten hydraulischen Verweilzeit konnte die exponentielle Phase mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0,21 h^{-1} ermittelt werden. Bis zur Erhöhung des CO-Partialdrucks stieg die Biotrockenmassekonzentration auf 6,57 g L^{-1}, während sich für Acetat ein Fließgleichgewicht von 2,3 g L^{-1} einstellte, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,28 g L^{-1} h^{-1} entsprach. Am Ende der ersten Phase lag demnach eine zellspezifische Acetatbildungsrate von ~0,04 g g^{-1} h^{-1} vor. Eine konstante CO-Aufnahmerate von ~17 mmol L^{-1} h^{-1} konnte während dem Prozessintervall zwischen 2,7 τ und 5,6 τ ermittelt werden, wobei hier ein CO-Partialdruck von 13,4 ± 1,2 mbar vorlag. Bis 5,6 τ stellte sich eine konstante CO_2-Bildungsrate von ~6 mmol L^{-1} h^{-1} ein, wobei ein Partialdruck von knapp 15 mbar resultierte.

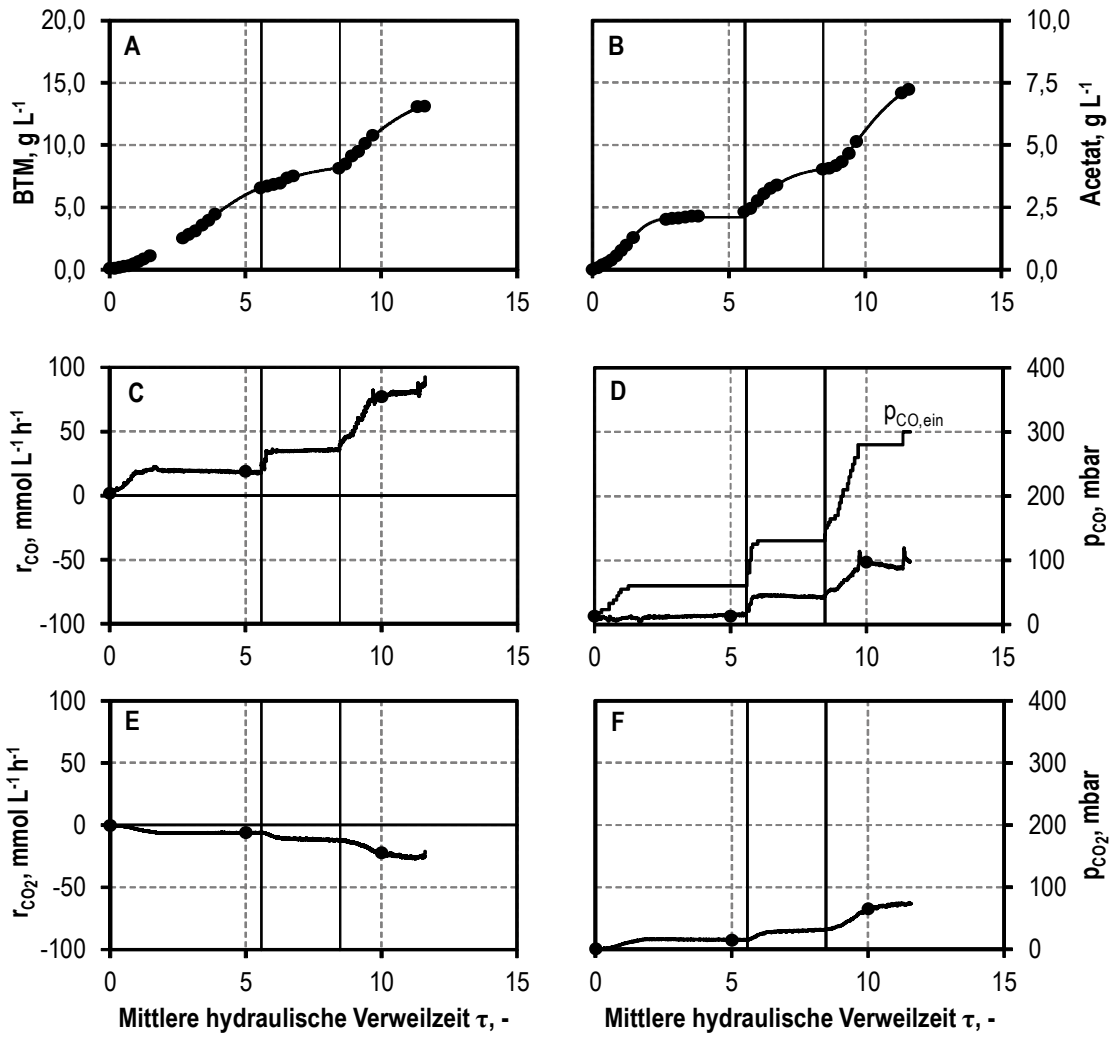

Abbildung 7.8: Autotropher kontinuierlicher CO-Prozess mit totaler Zellrückhaltung im kontrollierten Membranbioreaktor mit *C. aceticum* unter Standardbedingungen mit manuell kontrolliertem CO-Partialdruck p_{CO} und der Verdünnungsrate D = 0,12 h^{-1}. Die Vertikalen kennzeichnen die Erhöhung des CO-Partialdrucks nach 5,6 τ sowie 8,5 τ. Durchgezogene Linien in A und B resultieren aus nichtlinearer Regression für die Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen, exemplarische Symbole in C, D, E und F dienen zusätzlich der erleichterten Visualisierung (T = 30 °C; pH 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}; D = 0,12 h^{-1}).

In der zweiten Prozessphase, welche zwischen 5,6 τ bis 8,5 τ andauerte, betrug der CO-Sollwert 45 mbar. In dieser Phase stieg die Biotrockenmassekonzentration von 6,6 g L^{-1} auf 8,2 g L^{-1} an. Die Gleichgewichtskonzentration für Acetat erhöhte sich trotz konstanter Verdünnungsrate sichtlich auf 4,0 g L^{-1}, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,48 g L^{-1} h^{-1} entsprach. Am Ende der zweiten Phase lag demnach eine zellspezifische Acetatbildungsrate von ~0,06 g g^{-1} h^{-1} vor. Die CO-Aufnahmerate erhöhte sich ebenfalls auf einen nahezu konstanten Wert von 36 mmol L^{-1} h^{-1}. Für CO resultierte durch die Erhöhung des Eingangspartialdrucks auf 130 mbar ein Partialdruck von 44,2 ± 1,3 mbar. Sowohl die CO_2-

Bildungsrate als auch der CO_2-Partialdruck erhöhten sich in dieser Prozessphase auf knapp 12 mmol L^{-1} h^{-1} und 32 mbar.

In der letzten Prozessphase betrug der Sollwert des CO-Partialdrucks 95 mbar. Sowohl die Biotrockenmasse- als auch die Acetatkonzentration stiegen hierdurch auf 13,1 g L^{-1} sowie 7,2 g L^{-1} an. Zwar stellte sich aufgrund der kurzen Prozesszeit noch kein Fließgleichgewicht für Acetat ein, aufgrund der gemessenen Acetatkonzentration ist jedoch eine Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 0,86 g L^{-1} h^{-1} erzielt worden. Am Ende der letzten Phase lag demnach eine zellspezifische Acetatbildungsrate von ~0,07 g g^{-1} h^{-1} vor. Die CO-Aufnahmerate erreichte einen finalen Wert von 85 mmol L^{-1} h^{-1}. Der CO-Partialdruck in dieser Prozessphase betrug abweichend vom Sollwert 93,7 ± 5,0 mbar, wobei der CO-Eingangspartialdruck bis auf einen Wert von 280 mbar gesteigert wurde. Für CO_2 konnte eine Steigerung der Bildungsrate sowie des Partialdrucks auf etwa 26 mmol $L^{-1}h^{-1}$ sowie 73 mbar beobachtet werden. Über den gesamten Prozessverlauf wurde die Leistung der Ablaufpumpe stetig automatisch erhöht um das Reaktionsvolumen konstant zu halten. Nach einer Prozesszeit von 11,6 τ und einer Biotrockenmassekonzentration von 13,1 g L^{-1} betrug die Pumpleistung 100 %. Eine weitere Steigerung des Partialdrucks war anschließend aufgrund des zu erwartenden Anstiegs des Reaktionsvolumens und der somit verändernden Prozessbedingungen nicht möglich. Während des gesamten Prozesses konnte weder die Bildung von Formiat noch von Ethanol beobachtet werden.

Diskussion

In der ersten Prozessphase fielen im Vergleich zum Chemostatprozess (siehe Abschnitt 7.2.1) die reduzierten Wachstums- und Acetatbildungsraten während der exponentiellen Phase sowie die leicht verringerte Raum-Zeit-Ausbeute auf. Die Ursache hierfür lag in dem verringerten mittleren CO-Partialdruck, welcher aufgrund der Ungenauigkeit der manuellen Partialdruckkontrolle, basierend auf der *at-line*-Abgasanalytik, zu Abweichungen vom Sollwert des CO-Partialdrucks geführt hatte. Im weiteren Prozessverlauf war jeweils als Folge der Erhöhung des CO-Partialdrucks eine Steigerung der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen sowie der CO-Aufnahmeraten möglich. Bei einem mittleren CO-Partialdruck von ~44 mbar resultierte eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,48 g L^{-1} h^{-1}. Im Vergleich zur ersten Phase resultierte damit aus der Erhöhung des CO-Partialdrucks eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 1,7. In der dritten Prozessphase war bei einem mittleren CO-Partialdruck von ~94 mbar im Vergleich zur ersten Phase eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute auf mindestens 0,86 g L^{-1} h^{-1} beziehungsweise um den Faktor 3,1 möglich. Weiterhin konnten die zellspezifischen Acetatbildungsraten am Ende der jeweiligen Prozessphasen durch die CO-Partialdruckerhöhung gesteigert werden. Unter der Annahme

einer CO-Massentransferlimitierung sind diese Steigerungen der Produktivität durch die Erhöhung der CO-Massentransferraten, welche aus den Partialdruckerhöhungen resultierten, erklärbar. Hierdurch ließen sich sowohl die beobachteten höheren volumetrischen CO-Aufnahmeraten als auch die beobachtete Steigerung der zellspezifischen Wachstums- und Produktbildungsraten in Folge der Erhöhung der CO-Konzentration im Reaktionsmedium erklären.

Im Vergleich aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierungsprozesse konnte somit die Raum-Zeit-Ausbeute für die Umsetzung von CO zu Acetat durch geeignete Prozessführung im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung und CO-Partialdruckkontrolle deutlich gesteigert und nahezu Acetat-Raum-Zeit-Ausbeuten der Umsetzung von CO_2/H_2 erzielt werden. Weiterhin konnten hierdurch die höchsten bisher berichteten CO-Aufnahmeraten mit *C. aceticum* erreicht werden. Dabei wurde jedoch eine geringfügige Reduktion des CO-Umsatzes von 78 ± 5 % bei $p_{CO,ein}$ = 60 mbar auf 67 ± 1 % bei $p_{CO,ein}$ = 130 mbar und auf 70 ± 2 % bei $p_{CO,ein}$ = 280 mbar beobachtet.

Allerdings wurde auch ersichtlich, dass die manuelle Partialdruckkontrolle basierend auf der *at-line*-Abgasanalytik ungenau und in jedem Fall diskret ist. Die *online*-Regelung des CO-Partialdrucks ist jedoch auch bei totzeitbehafteten, diskreten Messwerten, beispielsweise durch Verwendung sogenannter Beobachter wie erweiterte Kalman-Filter, möglich und könnte zur Verbesserung der Genauigkeit der Partialdruckregelung beitragen (Weuster-Botz et al., 1994; Weuster-Botz et al., 1997).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Chemostaten durch Verweilzeitentkopplung im kontinuierlichen Membranbioreaktor die stabile Prozessführung auch bei stark inhibierenden CO-Partialdrücken möglich ist, wodurch höhere Biotrockenmasse- und Raum-Zeit-Ausbeuten ermöglicht wurden. Theoretisch ist mittels dieser Prozessoption die inhibierungsfreie Bildung von hohen Biotrockenmassekonzentrationen von *C. aceticum* möglich, wodurch letzten Endes ein CO-Eingangspartialdruck bis zu $p_{CO,ein}$ = 1000 mbar mit weiter gesteigerten Raum-Zeit-Ausbeuten möglich sein wird. Aufgrund der Verblockung des Membranmoduls durch die hohe Biotrockenmassekonzentration konnte der Partialdruck in diesem Experiment jedoch nicht weiter gesteigert werden. Um noch höhere Biotrockenmassekonzentrationen und somit längere Prozesszeiten im Membranbioreaktor zu ermöglichen müsste entweder die effektive Membranfläche des Membranmoduls erhöht oder die Biofilmbildung auf dem Membranmodul verhindert werden. Im Vergleich zu kontinuierlichen Prozessen mit totaler Zellrückhaltung im Membranbioreaktor mit *Acetobacterium woodii* (CO_2/H_2) konnten bei selber Verdünnungsrate ähnliche Biotrockenmassekonzentrationen bei ähnlichen Prozesszeiten erzielt werden.

8 Zusammenfassung

Die Gasfermentation zur Produktion von Biokraftstoffen und Basischemikalien aus $CO/CO_2/H_2$-haltigem Synthesegas oder industriellen Ab- und Prozessgasen stellt eine vielversprechende, nachhaltige und ökologische Alternative zu etablierten, auf fossilen Rohstoffen oder zuckerhaltiger Biomasse basierenden Produktionsprozessen dar. Dabei wird die chemolithoautotrophe Stoffwechselleistung von acetogenen Mikroorganismen zur Kohlenstofffixierung aus CO_2 genutzt, wobei als Produkte insbesondere Acetat aber teils auch Ethanol, Butanol, Butyrat und sogar Hexanol gebildet werden (Phillips et al., 2015; Ragsdale & Pierce, 2008). Daher stieg in den vergangenen Jahren das Interesse von Wissenschaft und Industrie an Gasfermentationsprozessen, wobei kommerzielle Produktionsanlagen noch nicht realisiert sind. Das liegt unter anderem daran, dass bisher nur wenige acetogene Mikroorganismen im Hinblick auf eine technische Anwendung quantitativ charakterisiert sind und deren Potential für Gasfermentationen somit noch ungeklärt ist.

Zu den bislang wenig untersuchten acetogenen Mikroorganismen zählt auch der erste isolierte acetogene Mikroorganismus *Clostridium aceticum*, der nach seiner Entdeckung 1936 verloren ging (Wieringa, 1936, 1940). Aufgrund dessen wurden nur einige biochemische Untersuchungen durchgeführt, weshalb eine quantitative Charakterisierung und Einordnung dieses Stammes im Hinblick auf technische Gasfermentationsprozesse von Interesse ist (Adamse, 1980). Daher war ein Ziel dieser Arbeit die quantitative Charakterisierung der chemolithoautotrophen Stoffwechselleistung von *C. aceticum* in Bezug auf sein Potential für technische Gasfermentationen unter vollständig kontrollierten Bedingungen im Labormaßstab.

Weiterhin bedingt die geringe Löslichkeit von CO und H_2 in Wasser und wässrigen Medien den kontinuierlichen Eintrag dieser Substrate über die Gasphase, weshalb der Massentransfer aus der Gas- in die Flüssigphase den limitierenden Faktor bei Gasfermentationen darstellen kann. Zur Erhöhung der Löslichkeit und des Massentransfers werden in technischen Gasfermentationsprozessen hohe Reaktoren mit entsprechend hohen hydrostatischen Drücken am Boden des Reaktors eingesetzt. Da Wachstum und Produktbildung einiger acetogener Mikroorganismen durch hohe CO- und/oder H_2-Konzentrationen inhibiert werden, kann dies die Effizienz der Synthesegasverwertung reduzieren. Daher ist die Kenntnis über die Toleranz gegenüber hohen Substratkonzentrationen wichtig bei der Beurteilung der Eignung eines acetogenen Mikroorganismus für technische Gasfermentationen. Da für *C. aceticum* keine Informationen über tolerierte Substratkonzentrationen unter kontrollierten Reaktionsbedingungen vorliegen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die quantitative

Aufklärung möglicher Substratinhibierungen durch CO und H_2 (Wachstums- und Produktbildungskinetik).

Zunächst wurden in anaeroben Parallelansätzen und in kontrollierten Satzprozessen im kontinuierlich begasten 1L-Rührkesselreaktor in Voruntersuchungen geeignete Standardbedingungen für reaktionstechnische Charakterisierungsexperimente zur Maximierung der Wachstumsrate identifiziert und festgelegt (T = 30 °C; pH 8,0;). Durch Verdopplung der Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen konnte zudem die stationäre Phase in Satzprozessen verlängert werden. Da bei definiertem Medium eine ausgeprägte und nicht reproduzierbare Verzögerungsphase auftrat, wurde die Hefeextraktkonzentration auf 1,0 g L^{-1} festgelegt. Für das Hauptstoffwechselprodukt Acetat konnte bereits für Konzentrationen unter 10 g L^{-1} Produktinhibierung festgestellt werden.

Durch Variation des Leistungseintrages auf bis zu ~11,7 W L^{-1} konnte eine Scherempfindlichkeit von *C. aceticum* im untersuchten Leistungseintragsbereich ausgeschlossen werden. Aufgrund der Steigerung der Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen bis zu einem Leistungseintrag von ~6,8 W L^{-1} in Satzprozessen wurde dieser Leistungseintrag als Standardwert für alle weiteren Untersuchungen festgelegt.

Weiterhin wurde die chemolithoautotrophe Stoffwechselleistung der Umsetzung unterschiedlicher Gase quantitativ charakterisiert. Hierzu wurde bei den zuvor identifizierten Standardbedingungen in unabhängigen kontrollierten Satzprozessen im 1L-Rührkesselreaktor die Gaszusammensetzung variiert und die reaktionstechnischen Zustandsgrößen der Umsetzung von CO, CO_2/H_2, CO/CO_2 sowie $CO/CO_2/H_2$ quantitativ ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die genutzte Elektronenquelle, CO oder H_2, zu deutlichen Unterschieden bei den resultierenden Zustandsgrößen führte (normiert in Abbildung 8.1).

Bei den Gasmischungen CO/CO_2 und $CO/CO_2/H_2$ wurde bevorzugt CO als Substrat genutzt, sodass stets eine stöchiometrische CO_2-Nettobildung und keine simultane H_2-Verwertung beobachtet wurden. Daher ist die Verwertungseffizienz $CO/CO_2/H_2$-haltiger Gase durch *Clostridium aceticum* eingeschränkt. Der Vergleich der unterschiedlichen Substrate erbrachte ebenfalls, dass die erzielbaren spezifischen Wachstumsraten in Prozessen mit CO (0,13 h^{-1}) im Vergleich zum CO_2/H_2-Prozess (0,06 h^{-1}) mehr als doppelt so hoch waren. Im Gegensatz hierzu war die höchste zellspezifische Acetatbildungsrate bei Nutzung von CO_2/H_2 (0,60 g g^{-1} h^{-1}) im Vergleich zum CO-Prozess (0,31 g g^{-1} h^{-1}) fast doppelt so hoch. Mit CO/CO_2 (0,36 g g^{-1} h^{-1}) und $CO/CO_2/H_2$ (0,35 g g^{-1} h^{-1}) lagen die zellspezifischen Acetatbildungsraten im Bereich des CO-Prozesses. Die unterschiedliche Stoffwechselleistung wurde insbesondere durch Bestimmung und Vergleich der zellspezifischen Acetatausbeutekoeffizienten $Y_{Acetat,X}$ deutlich. Mit CO_2/H_2 (10,0 g g^{-1}) lag der zellspezifische Acetatausbeutekoeffizient um den

Faktor 3,6 - 4,2 höher als für CO-Prozesse (2,4 g g^{-1} h^{-1}). In kontrollierten Satzprozessen konnte bei Begasung mit CO mit *C. aceticum* erstmalig die Bildung geringer Mengen Ethanol im Anschluss an die exponentielle Wachstumsphase beobachtet werden. Für die Ethanolbildung spielte es dabei keine Rolle, ob der pH geregelt oder ungeregelt war. Mit CO_2/H_2 war hingegen keine Ethanolbildung möglich.

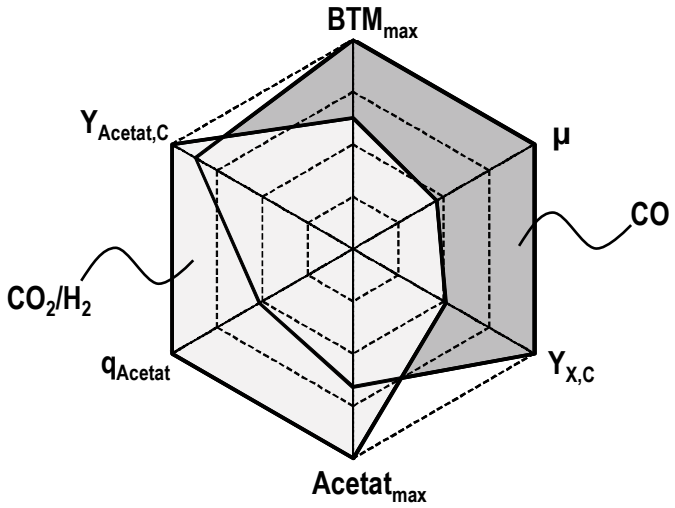

Abbildung 8.1: Vergleich autotropher Satzprozesse mit CO (dunkelgrau) und CO_2/H_2 (hellgrau). Normierte Zustandsgrößen: maximale Biotrockenmassekonzentration BTM_{max}; spezifische Wachstumsrate μ; substratspezifischer Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,C}$; maximale Acetatkonzentration $Acetat_{max}$; zellspezifische Acetatbildungsrate q_{Acetat}; substratspezifischer Acetatausbeutekoeffizient $Y_{Acetat,C}$.

Weiterhin wurde für *C. aceticum* ein Na^+-abhängiges Wachstum beobachtet, wobei die höchsten Biotrockenmasse- und Acetatkonzentrationen in kontrollierten Satzprozessen zwischen 30 - 90 mM Na^+ erzielt wurden. Mittels selektiver Na^+- und H^+-Ionophoren konnte zudem ermittelt werden, dass *C. aceticum* zur Energiekonservierung einen Protonengradienten nutzt. Durch Einstellen der optimalen Na^+-Konzentration im Reaktionsmedium kann somit die Prozessleistung in Bezug auf Biomasse- und Produktbildung verbessert werden.

Durch Variation der CO-Partialdrücke in kontrollierten Satzprozessen wurde zunächst der Einfluss dieses Substrats auf das Wachstums- und Produktbildungsverhalten von *C. aceticum* beobachtet. Da keine Möglichkeit zur quantitativen *online*-Messung der CO-Gelöstkonzentration bestand, wurden zur Identifizierung der zugrundeliegenden Inhibierungskinetik für Biotrockenmassekonzentration unter 0,5 g L^{-1} die korrespondierenden mittleren CO-Partialdrücke verwendet. Es wurde eine starke CO-Substratüberschussinhibierung beobachtet. Durch nichtlineare Regressionsanalyse konnte ein Inhibierungsmodell identifiziert

werden (siehe Abbildung 8.2). Dabei zeigte die Halbsättigungskonstante K_S = 0,3 mbar CO eine äußerst hohe Substrataffinität an. Die Inhibierungskonstante K_I = 86,7 mbar CO hingegen verdeutlichte die hohe Sensitivität und früh einsetzende Inhibierung durch das gasförmige Substrat, sodass sich ein optimaler CO-Partialdruck $p_{CO,opt}$ = 5,4 mbar CO ableiten ließ. Die optimalen Wachstums- und Acetatbildungsraten wurden zu μ_{opt} = 0,24 h^{-1} und $q_{Acetat,opt}$ = 0,52 g g^{-1} h^{-1} abgeleitet. Für H_2 konnte ebenfalls eine Reduktion der Wachstumsrate bei Partialdrücken über 478 mbar beobachtet werden.

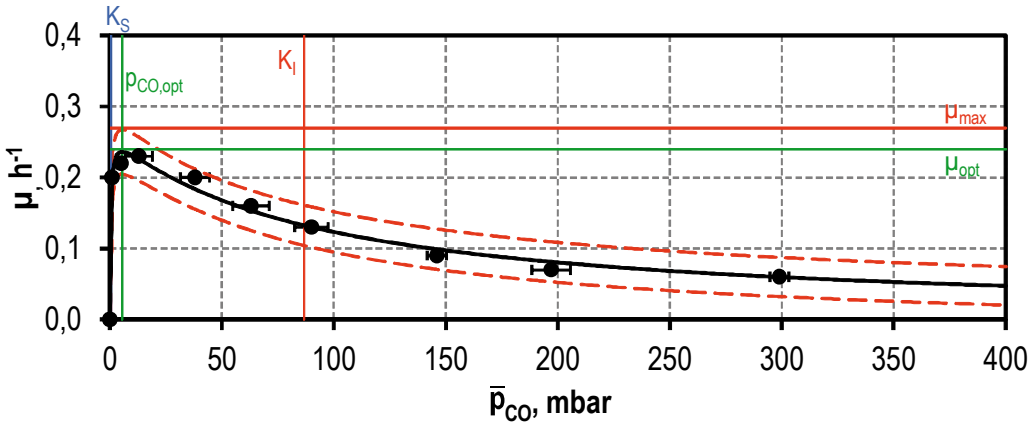

Abbildung 8.2: Ermittelte spezifische Wachstumsrate von *C. aceticum* über die korrespondierenden mittleren CO-Partialdrücke $\bar{p}_{CO}$ mit Standardabweichungen, nichtlinearer Regression gemäß dem kinetischen Substratüberschussinhibierungsmodell nach Andrews (schwarze Linien) mit 95 % Konfidenzintervallen (rot gestrichelte Linien). Halbsättigungskonstante K_S = 0,3 mbar (blaue Vertikale); Inhibierungskonstante K_I = 86,7 mbar (rote Vertikale); maximale zellspezifische Wachstumsrate μ_{max} = 0,27 h^{-1} (rote Horizontale); optimaler CO-Partialdruck $p_{CO,opt}$ = 5,4 mbar (grüne Vertikale) und optimale zellspezifische Wachstumsrate μ_{opt} = 0,24 h^{-1} (grüne Horizontale) (c_X < 0,5 g L^{-1}; T = 30 °C; pH = 8,0; P V^{-1} = 6,8 W L^{-1}; u = 2,4 10^{-4} m s^{-1}).

Durch kontinuierliche Prozessführung im Chemostaten (D = 0,06 h^{-1}) konnte die Raum-Zeit-Ausbeute für Acetat bei der Umsetzung von CO im Vergleich zum Satzprozess um den Faktor ~1,7 gesteigert werden. Zur weiteren Steigerung der Verdünnungsrate wurde wegen der geringen Wachstumsraten die Verweilzeitentkopplung der Biomasse vom Reaktionsmedium im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung realisiert. Bei konstanten CO-Eingangspartialdrücken und steigenden Biotrockenmassekonzentrationen wurden unabhängig von der Verdünnungsrate konstante Acetat-Raum-Zeit-Ausbeuten von 0,33 g L^{-1} h^{-1} beobachtet, was auf den konstanten CO-Eintrag zurückzuführen ist. Mit CO_2/H_2 konnte bei einer Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} hingegen die höchste für *C. aceticum* berichtete Acetat-Raum-Zeit-Ausbeute von 1,84 g L^{-1} h^{-1} erzielt werden. Zudem deuteten die

Verläufe der Acetatkonzentrationen mit Gleichgewichtskonzentrationen von über 10 g L^{-1} auf eine mögliche Adaption an inhibierende Produktkonzentrationen hin.

In einem zweiphasigen Prozess im kontinuierlich betriebenen Membranbioreaktor wurden in einer ersten Prozessphase durch CO-Begasung hohe Biotrockenmassekonzentrationen erzielt. In der zweiten Prozessphase wurde bei Änderung der Gaszusammensetzung zur verstärkten Acetatbildung mit CO_2/H_2 eine Adaptionsphase beobachtet, weshalb im Vergleich zum reinen CO_2/H_2-Prozess keine Steigerung der Acetat-Raum-Zeit-Ausbeute möglich war.

Da CO aufgrund der identifizierten Substratüberschussinhibierung Wachstum und Produktbildung von *C. aceticum* kontrolliert und keine Möglichkeit zur Quantifizierung der Gelöstkonzentration bestand, wurde als geeignete Prozessführungsstrategie zur Vermeidung einer Substratinhibierung die Kontrolle des Partialdrucks gewählt. Bei einer Verdünnungsrate von 0,12 h^{-1} konnte im Chemostaten bei Kontrolle des CO-Partialdrucks auf 18 mbar ein stabiler Betriebspunkt mit einer Acetat-Raum-Zeit-Ausbeute von 0,33 g L^{-1} h^{-1} erreicht werden.

Um die weitere Steigerung der Acetat-Raum-Zeit-Ausbeute bei kontinuierlicher Prozessführung mit CO zu ermöglichen, muss aufgrund der Massentransferlimitierung der CO-Partialdruck erhöht werden. Da der Chemostat bei Substratüberschussinhibierung keine stabile Prozessoption darstellt, wurde zur Erhöhung des CO-Partialdrucks der kontinuierliche Membranbioreaktor verwendet. Durch schrittweise Erhöhung des CO-Partialdrucks auf über 95 mbar konnte durch totale Zellrückhaltung nicht nur die Substratüberschussinhibierung vermieden, sondern auch die Acetat-Raum-Zeit-Ausbeute mit CO auf 0,86 g L^{-1} h^{-1} und somit im Vergleich zum Chemostaten um den Faktor 2,6 gesteigert werden. Bei langen Prozesszeiten und hohen Biotrockenmassekonzentrationen sind somit die inhibierungsfreie Nutzung von reinem CO sowie die weitere Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten möglich, weshalb diese Prozessoption besonders für den technischen Einsatz acetogener Mikroorganismen mit Substratüberschussinhibierung geeignet ist.

9 Ausblick

Durch die Identifikation einer durch Acetat ausgelösten Produktinhibierung bei Acetatkonzentrationen über 10 g L^{-1} ist davon auszugehen, dass die Prozessleistung nach Erreichen dieser Produktkonzentrationen abnimmt. Andererseits wurden in kontinuierlichen Prozessen mit CO_2/H_2 höhere Gleichgewichtskonzentrationen erreicht, wobei hier eine Adaption an die hohen Acetatkonzentrationen vermutet werden konnte. Zur weiteren Steigerung der Prozessleistung sollte daher zunächst die Ursache der Inhibierungswirkung auf Enzyme oder Homöostase identifiziert und anschließend die Adaptionsfähigkeit von *C. aceticum* untersucht werden. Dabei könnte nach Verifikation die natürliche Adaptionsfähigkeit genutzt und die Toleranz gegenüber Acetat durch molekularbiologische Methoden gezielt gesteigert werden.

Das für die industrielle Produktion von Biokraftstoffen interessantere Produkt Ethanol konnte mit dem Wildtypstamm von *C. aceticum* bislang nur zu geringen Konzentrationen in Satzprozessen mit CO gebildet werden. Um den Stamm für industrielle Gasfermentations-prozesse interessanter zu machen müsste die Untersuchung der Ethanolbildung auf metabolischer als auch prozesstechnischer Ebene intensiviert werden. Da der Stamm gemäß Genomsequenzierung bereits über multiple Alkoholdehydrogenasen verfügt könnte durch gentechnische Modifikation der Kohlenstofffluss ausgehend vom Acetyl-CoA durch Überexpression der entsprechenden Enzyme hin zu einer gesteigerten Ethanolbildung verstärkt werden (Poehlein et al., 2015).

Die Bildung weiterer nichtnatürlicher aber industriell interessanter Produkte, etwa Butanol oder Butandiol, ist nur über die gentechnische Modifikation des Wildtypstammes möglich. Obwohl in der Literatur für *C. aceticum* bereits die Modifikation mit heterologen Enzymen zur Bildung von Aceton berichtet wird ist die gentechnische Modifikation derzeit noch schwierig (Becker et al., 2012; Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Weiterhin waren auch genetische Modifikationen für andere acetogene Mikroorganismen erfolgreich, die das Potential acetogener Wildtypstämme erweitern (Liew et al., 2016). Dabei konnte beispielsweise durch Einbringen heterologer Enzyme das Produktspektrum erweitert oder durch Überexpression von Wildtyp-Genen die Produktspezifität erhöht werden, wie z.B. in *C. ljungdahlii* oder *C. autoethanogenum* (Köpke, Nagaraju et al., 2014; Köpke, Gerth et al., 2014; Liew et al., 2017; Ueki et al., 2014).

Trotz der ermittelten niedrigen Toleranz gegenüber CO konnte durch die geeignete Prozessführungsstrategie in einem Membranbioreaktor bei massentransferlimitierten

Bedingungen und der schrittweisen Erhöhung des CO-Partialdrucks eine CO-Inhibierung vermieden werden. Aufgrund der Limitierungen durch das zur totalen Zellrückhaltung verwendete Membranmodul bei hohen Biotrockenmassekonzentrationen konnte der CO-Partialdruck jedoch nur bis 95 mbar erhöht werden. Bei erhöhter effektiver Membranfläche sollte eine weitere Steigerung des CO-Partialdrucks auch im Druckreaktor in Betracht gezogen werden, um eine weitere Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten zu ermöglichen. Da generell die Toleranz von acetogenen Mikroorganismen gegenüber CO für Gasfermentationsprozesse äußerst wichtig ist sollte die in dieser Arbeit für *C. aceticum* angewendete Methode zur Identifikation der CO-Inhibierungskinetik mittels gemittelter CO-Partialdrücke auch für weitere acetogene Stämme durchgeführt werden, um deren Eignung und Potential für technische Gasfermentationsprozesse vergleichen zu können.

Abschließend wäre der Vergleich der Prozessleistung von *C. aceticum* in anderen Reaktorkonfigurationen, beispielsweise im Blasensäulenreaktor oder im Festbettreaktor, interessant, da hier durch das Fehlen des mechanischen Leistungseintrages geringere Massentransferraten und somit bereits bei niedrigeren Biotrockenmassekonzentrationen Substratlimitierung zu erwarten wären.

10 Literaturverzeichnis

Abrini, J., Naveau, H. & Nyns, E.-J. (1994). *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of Microbiology, 161* (4), 345–351. https://doi.org/10.1007/BF00303591

Abubackar, H. N., Veiga, M. C. & Kennes, C. (2011). Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 5* (1), 93–114. https://doi.org/10.1002/bbb.256

Abubackar, H. N., Fernández-Naveira, Á., Veiga, M. C. & Kennes, C. (2016). Impact of cyclic pH shifts on carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum*. *Fuel, 178,* 56–62. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.03.048

Acharya, B., Roy, P. & Dutta, A. (2015). Review of syngas fermentation processes for bioethanol. *Biofuels,* 1–14. https://doi.org/10.1080/17597269.2014.1002996

Adamse, A. D. (1980). New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). *Antonie van Leeuwenhoek, 46,* 523–531.

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* P7T. *Biomass and Bioenergy, 30* (7), 665–672. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.01.007

Ahmed, A. & Lewis, R. S. (2007). Fermentation of biomass-generated synthesis gas: Effects of nitric oxide. *Biotechnology and Bioengineering, 97* (5), 1080–1086. https://doi.org/10.1002/bit.21305

Andreesen, J. R., Gottschalk, G. & Schlegel, H. G. (1970). *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Archieves of Microbiology, 72,* 154–174. https://doi.org/10.1007/BF00409521

Andrews, J. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering, 10* (6), 707–723. https://doi.org/10.1002/bit.260100602

Antranikian, G. (Hrsg.). (2006). *Angewandte Mikrobiologie. Mit 69 Tabellen*. Berlin: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-29456-2

Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I. & Homma, M. (2003). Ion-coupling Determinants of Na^+-driven and H^+-driven Flagellar Motors. *Journal of Molecular Biology, 327* (2), 453–463. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00096-2

Atkins, P. W. & Paula, J. d. (2012). *Physikalische Chemie* (4., vollst. überarb. Aufl., 2. Nachdr). Weinheim: Wiley-VCH.

Balat, M. & Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy, 86* (11), 2273–2282. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015

Balch, W., Schoberth, S., Tanner R. & Wolfe, R. (1977). *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaereobic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology, 27* (4), 355–361. https://dx.doi.org/10.1099/00207713-27-4-355

Barker, H. A. & Kamen, M. D. (1945). Carbon Dioxide Utilization in the Synthesis of Acetic Acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 31* (8), 219–225. https://doi.org/10.1073/pnas.31.8.219

Baronofsky, J. J., Schreurs, W. J. & Kashket, E. R. (1984). Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of and Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology, 48* (6), 1134–1139.

Becker, U., Grund, G., Orschel, M., Doderer, K., Löhden, G., Brand, G. et al. (2012), EP 2421960 A1.

Bengelsdorf, F., Straub, M. & Dürre, P. (2013). Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental Technology, 34* (13-14), 1639–1651. https://doi.org/10.1080/09593330.2013.827747

Bengelsdorf, F. R., Beck, M. H., Erz, C., Hoffmeister, S., Karl, M. M., Riegler, P. et al. (2018). Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO_2 + H_2 Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.002

Bennett, B., Lemon, B. J. & Peters, J. W. (2000). Reversible Carbon Monoxide Binding and Inhibition at the Active Site of the Fe-Only Hydrogenase. *Biochemistry, 39* (25), 7455–7460. https://doi.org/10.1021/bi992583z

Bernalier, A. (1996). Acetogenesis from H_2 and CO_2 by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology, 19* (3), 193–202. https://doi.org/10.1016/0168-6496(96)00004-9

Bertsch, J. & Müller, V. (2015). Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria. *Biotechnology for biofuels, 8,* 210. https://doi.org/10.1186/s13068-015-0393-x

Biegel, E. & Müller, V. (2011). A Na^+-translocating pyrophosphatase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *The Journal of biological chemistry, 286* (8), 6080–6084. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192823

Biegel, E., Schmidt, S., Gonzalez, J. & Müller, V. (2011). Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS, 68* (4), 613–634. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0555-8

Biegel, E., Schmidt, S. & Müller, V. (2009). Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environmental microbiology, 11* (6), 1438–1443. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01871.x

Booth, I. R. (1985). Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological Reviews, 49* (4), 359–378.

Bott, M., Eikmanns, B. & Thauer, R. (1986). Coupling of carbon monoxide oxidation to CO_2 and H_2 with the phosphorylation of ADP in acetate-grown *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry, 159* (2), 393–398. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09881.x

Bouaifi, M., Hebrard, G., Bastoul, D. & Roustan, M. (2001). A comparative study of gas hold-up, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas–liquid reactors and bubble columns. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 40* (2), 97–111. https://doi.org/10.1016/S0255-2701(00)00129-X

Braun, K. & Gottschalk, G. (1981). Effect of Molecular Hydrogen and Carbon Dioxide on Chemo-Organotrophic Growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Archieves of Microbiology, 128,* 294–298.

Braun, M., Mayer, F. & Gottschalk, K. (1981). *Clostridium aceticum* (Wieringa), a Microorganism Producing Acetic Acid from Molecular Hydrogen and Carbon Dioxide. *Archives of Microbiology, 128,* 288–293.

Braun, M. & Gottschalk, G. (1982). *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, 3* (3), 368–376. https://doi.org/10.1016/S0721-9571(82)80017-3

Bredwell, M. D., Srivastava, P. & Worden, M. R. (1999). Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. *Biotechnology Progress, 15* (5), 834–844. https://doi.org/10.1021/bp990108m

Bredwell, M. D. & Worden, M. R. (1998). Mass-Transfer Properties of Microbubbles. 1. Experimental Studies. *Biotechnology progress, 14* (1), 31–38. https://doi.org/10.1021/bp970133x

Bruno-Barcena, J. M., Chinn, M. S. & Grunden, A. M. (2013). Genome Sequence of the Autotrophic Acetogen *Clostridium autoethanogenum* JA1-1 Strain DSM 10061, a Producer of Ethanol from Carbon Monoxide. *Genome Announcements, 1* (4), 1–2. https://doi.org/10.1128/genomeA.00628-13

Bugg, T., Ahmad, M., Hardiman, E. & Singh, R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current Opinion in Biotechnology, 22* (3), 394–400. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.009

Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe. (2017). *BGR Energiestudie 2017.* Daten und Entwicklung der deutschen und globalen Energieversorgung (Andruleit, H., Blumenber, M., Kus, J., Meßner, J., Pein, M. & Rebscher, D., et al., Hrsg.). Zugriff am 16.03.2018: https://www.bgr.bund.de/DE/Themen/Energie/Downloads/energiestudie_2017.pdf;jsessionid=04DE550BA54F6FD4590410E8C8464A2F.1_cid331?__blob=publicationFile&v=5

Carpenter, C. E. & Broadbent, J. R. (2009). External Concentration of Organic Acid Anions and pH. Key Independent Variables for Studying How Organic Acids Inhibit Growth of Bacteria in Mildly Acidic Foods. *Journal of food science, 74* (1), R12-5. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00994.x

Carstensen, F., Apel, A. & Wessling, M. (2012). In situ product recovery: Submerged membranes vs. external loop membranes. *Journal of Membrane Science, 394-395,* 1–36. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.11.029

Chang, I., Kim, B., Lovitt, R. & Bang, J. (2001). Effect of CO partial pressure on cell-recycled continuous CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Process Biochemistry, 37* (4), 411–421. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00227-8

Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik, 3. Auflage:* Springer-Verlag.

Christen, D. (2005). *Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik. Handbuch für Chemiker und Verfahrensingenieure* (Verfahrenstechnik). Berlin: Springer.

Clearfield, M. (2008). Another inconvenient truth. Combining the risks from obesity and metabolic syndrome with global warming. *Current Atherosclerosis Reports, 10* (4), 273–276. https://doi.org/10.1007/s11883-008-0041-z

Collins, M., Lawson, P., Willems, A., Cordoba, J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P. et al. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology, 44* (4), 812–826. https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812

Dahmen, N., Henrich, E., Dinjus, E. & Weirich, F. (2012). The bioliq® bioslurry gasification process for the production of biosynfuels, organic chemicals, and energy. *Energy, Sustainability and Society, 2* (1), 3. https://doi.org/10.1186/2192-0567-2-3

Daniel, S., Hsu, T., Dean, S. & Drake, H. (1990). Characterization of the H_2 and CO-dependent Chemolithotrophic Potentials of the Acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *Journal of Bacteriology, 172* (8), 4464–4471.

Daniell, J., Köpke, M. & Simpson, S. (2012). Commercial Biomass Syngas Fermentation. *Energies, 5* (12), 5372–5417. https://doi.org/10.3390/en5125372

Das, A., Fu, Z., Tempel, W., Liu, Z., Chang, J., Chen, L. et al. (2007). Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Proteins, 67* (1), 167–176. https://doi.org/10.1002/prot.21094

Das, A. & Ljungdahl, L. (1997). Composition and Primary Structure of the F_1F_0 ATP Synthase from the Obligately Anaerobic Bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology, 179* (11), 3746–3755.

Datar, R. P., Shenkman, R. M., Cateni, B. G., Huhnke, R. L. & Lewis, R. S. (2004). Fermentation of Biomass-Generated Producer Gas to Ethanol. *Biotechnology and Bioengineering, 86* (5), 587–594. https://doi.org/10.1002/bit.20071

Davis, B. H. (2009). Fischer–Tropsch Synthesis. Reaction mechanisms for iron catalysts. *Catalysis Today, 141* (1-2), 25–33. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.03.005

Demler, M. & Weuster-Botz, D. (2011). Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnology and Bioengineering, 108* (2), 470–474. https://doi.org/10.1002/bit.22935

Devarapalli, M., Lewis, R. & Atiyeh, H. (2017). Continuous Ethanol Production from Synthesis Gas by *Clostridium ragsdalei* in a Trickle-Bed Reactor. *Fermentation, 3* (2), 23. https://doi.org/10.3390/fermentation3020023

Díaz, M. E., Montes, F. J. & Galán, M. A. (2008). Experimental study of the transition between unsteady flow regimes in a partially aerated two-dimensional bubble column. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 47* (9-10), 1867–1876. https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.10.012

Diekert, G. & Thauer, R. (1978). Carbon Monoxide Oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of Bacteriology, 136* (2), 597–606.

Diekert, G. & Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek, 66,* 209–221. https://doi.org/10.1007/BF00871640

Doan, H., Wu, J. & Eyvazi, M. J. (2008). Effect of liquid distribution on the organic removal in a trickle bed filter. *Chemical Engineering Journal, 139* (3), 495–502. https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.08.018

Doran, P. M. (2004). *Bioprocess engineering principles* (Reprint). Amsterdam: Elsevier/Acad. Press.

Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (Eds.). (2007). *Food microbiology. Fundamentals and frontiers* (3rd ed.). Washington, D.C: ASM Press.

Drake, H. (Hrsg.). (1994). *Acetogenesis*. New York, London: Chapman & Hall.

Drake, H. & Daniel, S. (2004). Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Research in microbiology, 155* (10), 869–883. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.002

Drake, H., Gößner, A. & Daniel, S. (2008). Old Acetogens, New Light. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1125,* 100–128. https://doi.org/10.1196/annals.1419.016

Drake, H. L., Daniel, S., Küsel, K., Matthies, C., Kuhner, C. & Braus-Strimeyer, S. (1997). Acetogenic bacteria: what are the *in situ* consequences of their diverse metabolic versatilities? *BioFactors, 6,* 13–24. https://doi.org/10.1002/biof.5520060103

Drake, H. L., Küsel, K. & Matthies, C. (2006). Acetogenic Prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Hrsg.), *The Prokaryotes* (S. 354–420). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_13

Dry, M. E. (2002). The Fischer–Tropsch process. 1950–2000. *Catalysis Today, 71* (3-4), 227–241. https://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00453-9

Duddridge, J. E., Kent, C. A. & Laws, J. F. (1982). Effect of Surface Shear Stress on the Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to Stainless Steel under Defined Flow Conditions. *Biotechnology and bioengineering, 24* (8), 1930. https://doi.org/10.1002/bit.260240825

Dürre, P. & Eikmanns, B. (2015). C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. *Current Opinion in Biotechnology, 35,* 63–72. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.008

Eden, G. & Fuchs, G. (1982). Total synthesis of acetyl coenzyme a involved in autotrophic CO_2 fixation in *Acetobacterium woodii*. *Archives of Microbiology, 133* (1), 66–74. https://doi.org/10.1007/BF00943772

Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S. & Hawthorne, P. (2008). Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science (New York, N.Y.), 319* (5867), 1235–1238. https://doi.org/10.1126/science.1152747

Fernández-Naveira, Á., Veiga, M. C. & Kennes, C. (2017). H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 92* (4), 712–731. https://doi.org/10.1002/jctb.5194

Fischer, F., Lieske, R. & Winzer, K. (1932). Biologische Gasreaktionen. II: Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure mit Wasserstoff zu Methan. *Biochemische Zeitschrift, 245,* 2–12.

Friedlingstein, P., Andrew, R. M., Rogelj, J., Peters, G. P., Canadell, J. G., Knutti, R. et al. (2014). Persistent growth of CO_2 emissions and implications for reaching climate targets. *Nature Geoscience, 7* (10), 709–715. https://doi.org/10.1038/ngeo2248

Fuchs, G. (1986). CO_2 fixation in acetogenic bacteria: variations on a theme. *FEMS Microbiology Reviews, 39,* 181–213. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01859.x

Fuchs, G. (Hrsg.). (2014). *Allgemeine Mikrobiologie* (9., vollständig überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag.

Ganigué, R., Sánchez-Paredes, P., Bañeras, L. & Colprim, J. (2016). Low Fermentation pH Is a Trigger to Alcohol Production, but a Killer to Chain Elongation. *Frontiers in microbiology, 7,* 702. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00702

Garcia-Briones, M. & Chalmers, J. J. (1992). Cell-Bubble Interactions. Mechanisms of Suspended Cell Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences, 665,* 219–229. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb42586.x

Geerligs, G., Schönheit, P. & Diekert, G. (1989). Sodium dependent acetate formation from CO_2 in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). *FEMS Microbiology Letters, 57* (2), 253–257. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb14091.x

Genthner, B. R. & Bryant, M. P. (1982). Growth of *Eubacterium limosum* with Carbon Monoxide as the Energy Source. *Applied and Environmental Microbiology, 43* (1), 70–74.

Graber, J. R., Leadbetter, J. R. & Breznak, J. A. (2004). Description of *Treponema azotonutricium* sp. nov. and *Treponema primitia* sp. nov., the First Spirochetes Isolated from Termite Guts. *Applied and Environmental Microbiology, 70* (3), 1315–1320. https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1315–1320.2004

Greco, C., Bruschi, M., Heimdal, J., Fantucci, P., Gioia, L. & Ryde, U. (2007). Structural insights into the active-ready form of FeFe-hydrogenase and mechanistic details of its inhibition by carbon monoxide. *Inorganic chemistry, 46* (18), 7256–7258. https://doi.org/10.1021/ic701051h

Griffin, D. W. & Schultz, M. A. (2012). Fuel and chemical products from biomass syngas. A comparison of gas fermentation to thermochemical conversion routes. *Environmental Progress & Sustainable Energy, 31* (2), 219–224. https://doi.org/10.1002/ep.11613

Groher, A. & Weuster-Botz, D. (2016a). General medium for the autotrophic cultivation of acetogens. *Bioprocess and biosystems engineering, 39* (10), 1645–1650. https://doi.org /10.1007/s00449-016-1634-5

Groher, A. & Weuster-Botz, D. (2016b). Comparative reaction engineering analysis of different acetogenic bacteria for gas fermentation. *Journal of Biotechnology, 228,* 82–94. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.032

Hao, O. J., Richard, M. G., Jenkins, D. & Blanch, H. W. (1983). The half-saturation coefficient for dissolved oxygen. A dynamic method for its determination and its effect on dual species competition. *Biotechnology and Bioengineering, 25* (2), 403–416. https://doi.org/ 10.1002/bit.260250209

Havlík, P., Schneider, U., Schmid, E., Böttcher, H., Fritz, S., Skalský, R. et al. (2011). Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. *Energy Policy, 39* (10), 5690–5702. https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030

Hedderich, R. & Forzi, L. (2005). Energy-Converting [NiFe] Hydrogenases: More than Just H_2 Activation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology, 10,* 92–104. https://doi.org/10.1159/000091557

Heise, R., Müller, V. & Gottschalk, G. (1989). Sodium Dependence of Acetate Formation by the Acetogenic Bacterium *Acetobacterium woodii*. *Journal of Bacteriology, 171* (10), 5473–5478.

Heise, R., Reidlinger, J., Müller, V. & Gottschalk, G. (1991). A sodium-stimulated ATP synthase in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *FEBS Letters, 295,* 119–122. https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81400-3

Henstra, A. M., Sipma, J., Rinzema, A. & Stams, A. J. M. (2007). Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology, 18* (3), 200–206. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.008

Herrero, A. A. (1983). End-product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends in Biotechnology, 1* (2), 49–53. https://doi.org/10.1016/0167-7799(83)90069-0

Hess, V., Gallegos, R., Jones, A., Barquera, B., Malamy, M. & Müller, V. (2016). Occurrence of ferredoxin:NAD(+) oxidoreductase activity and its ion specificity in several Gram-positive and Gram-negative bacteria. *PeerJ, 4,* e1515. https://doi.org/10.7717/peerj.1515

Hess, V., Schuchmann, K. & Müller, V. (2013). The Ferredoxin:NAD^+ Oxidoreductase (Rnf) from the Acetogen *Acetobacterium woodii* Requires Na^+ and Is Reversibly Coupled to the Membrane Potential. *The Journal of biological chemistry, 288* (44), 31496–31502.

Hoffmeister, S., Gerdom, M., Bengelsdorf, F., Linder, S., Flüchter, S., Öztürk, H. et al. (2016). Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*. *Metabolic engineering, 36,* 37–47. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.03.001

Hu, P., Bowen, S. H. & Lewis, R. S. (2011). A thermodynamic analysis of electron production during syngas fermentation. *Bioresource Technology, 102* (17), 8071–8076. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.080

Hungate, R. (1976). A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In J. Norris (Ed.), *Methods in microbiology* (3rd ed., pp. 117–132). London: Academic Press.

Hurst, K. & Lewis, R. (2010). Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 48* (2), 159–165. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.004

Imkamp, F. & Müller, V. (2002). Chemiosmotic Energy Conservation with Na^+ as the Coupling Ion during Hydrogen-Dependent Caffeate Reduction by *Acetobacterium woodii*. *Journal of Bacteriology, 184* (7), 1947–1951. https://dx.doi.org/10.1128%2FJB.184.7.1947-1951.2002

Imkamp, F. & Müller, V. (2007). Acetogenic Bacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Jiang, B., Henstra, A.-M., Paulo, P. L., Balk, M., van Doesburg, W. & Stams, A. J. M. (2009). Atypical one-carbon metabolism of an acetogenic and hydrogenogenic *Moorella thermoacetica* strain. *Arch Microbiol, 191* (2), 123–131. https://doi.org/10.1007/s00203-008-0435-x

Johnston, G., Kalik, Z. & Johnston, C. G. (2016). Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on microbial activity and polycyclic aromatic hydrocarbons

(PAH) degradation in contaminated river sediments. *Environmental Earth Sciences, 75* (9), 419. https://doi.org/10.1007/s12665-016-5568-7

Jonczyk, P., Takenberg, M., Hartwig, S., Beutel, S., Berger, R. G. & Scheper, T. (2013). Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. *Journal of Biotechnology, 167* (4), 370–376. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.018

Kadic, E. & Heindel, T. J. (2014). *An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer* (1. Aufl.). s.l.: Wiley. https://doi.org/10.1002/9781118869703

Kane, M. D., Brauman, A. & Breznak, J. A. (1991). *Clostridium mayombei* sp. nov., an H_2/CO_2 acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Archives of Microbiology, 156* (2), 99–104. https://doi.org/10.1007/BF00290980

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research, 44* (D1), D457-62. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070

Kantzow, C. (2015, 2. Dezember). *Prozessintensivierung der Gasfermentation mit Acetobacterium woodii in Rührkesselreaktoren*. Dissertation, Technische Universität München. München. https://mediatum.ub.tum.de/doc/1277421/1277421.pdf

Kantzow, C., Mayer, A. & Weuster-Botz, D. (2015). Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *Journal of Biotechnology, 212,* 11–18. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.07.020

Kantzow, C. & Weuster-Botz, D. (2016). Effects of hydrogen partial pressure on autotrophic growth and product formation of *Acetobacterium woodii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 39* (8), 1325–1330. https://doi.org/10.1007/s00449-016-1600-2

Karlsson, J. L., Volcani, B. E. & Barker, H. A. (1948). The Nutritional Requirements of *C. aceticum*. *Journal of Bacteriology, 56,* 781–782.

Karnholz, A., Küsel, K., Gößner, A., Schramm, A. & Drake, H. (2002). Tolerance and Metabolic Response of Acetogenic Bacteria toward Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology, 68* (2), 1005–1009. https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.1005-1009.2002

Kellum, R. & Drake, H. (1986). Effects of carbon monoxide on one-carbon enzymes and energetics of *Clostridium thermoaceticum*. *FEMS Microbiology Letters, 34* (1), 41–45. https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90267-3

Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C. & Gaddy, J. L. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel, 70* (5), 605–614. https://doi.org/10.1016/0016-2361(91)90174-9

Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A. et al. (2010). *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107* (29), 13087–13092. https://doi.org/10.1073/pnas.1004716107

Köpke, M. & Liew, F. (2011). LanzaTech New Zealand Limited, US 2011236941 A1.

Köpke, M., Gerth, M. L., Maddock, D. J., Mueller, A. P., Liew, F., Simpson, S. D. et al. (2014). Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology, 80* (11), 3394–3403. https://doi.org/10.1128/AEM.00301-14

Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J. et al. (2011). 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology, 77* (15), 5467–5475. https://doi.org/10.1128/AEM.00355-11

Köpke, M., Nagaraju, S. & Chen, W. Y. (2014). Lanza Tech, US 2014/0206901 A1.

Köpke, M., Mihalcea, C., Bromley, J. C. & Simpson, S. D. (2011). Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Current Opinion in Biotechnology, 22* (3), 320–325. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.005

Kotsyurbenko, O. R., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N., Zhilina, T. N., Bolotina, N. P., Lysenko, A. M. et al. (1995). New species of psychrophilic acetogens. *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Archives of Microbiology, 163* (1), 29–34. https://doi.org/10.1007/BF00262200

Kresta, S. M. & Wood, P. E. (1993). The flow field produced by a pitched blade turbine. Characterization of the turbulence and estimation of the dissipation rate. *Chemical Engineering Science, 48* (10), 1761–1774. https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80346-R

Kundiyana, D. K., Huhnke, R. L. & Wilkins, M. R. (2010). Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: design and process considerations. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 109* (5), 492–498. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.022

Kundiyana, D. K., Wilkins, M. R., Maddipati, P. & Huhnke, R. L. (2011). Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by "*Clostridium ragsdalei*". *Bioresource Technology, 102* (10), 5794–5799. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.032

Lambert, R. & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology, 86,* 157–164. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x

(LanzaTech, Hrsg.). (2018). *LanzaTech Executive Summary. Overview Overview Jan 2018,* LanzaTech. Zugriff am 06.03.2018. http://www.lanzatech.com/wp-content/uploads /2018/01/LanzaTech_Overview_Jan_2018.pdf

Latif, H., Zeidan, A. A., Nielsen, A. T. & Zengler, K. (2014). Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology, 27,* 79–87. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.001

Leclerc, M., Elfoul-Bensaid, L. & Bernalier, A. (1998). Effect of Yeast Extract on Growth and Metabolism of H_2-Utilizing Acetogenic Bacteria from the Human Colon. *Current Microbiology, 37* (3), 166–171. https://doi.org/10.1007/s002849900358

Leigh, J. A., Mayer, F. & Wolfe, R. S. (1981). *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. *Archives of Microbiology, 129* (4), 275–280. https://doi.org/10.1007/BF00414697

Liew, F., Köpke, M. & Simpson, S. (2013). Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. In Z. Fang (Hrsg.), *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques.* InTech. https://doi.org/10.5772/52164

Liew, F. M., Henstra, A. M., Köpke, M., Winzer, K., Simpson, S. D. & Minton, N. P. (2017). Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production. *Metabolic engineering, 40,* 104–114. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.007

Liew, F. M., Martin, M. E., Tappel, R. C., Heijstra, B. D., Mihalcea, C. & Köpke, M. (2016). Gas Fermentation-A Flexible Platform for Commercial Scale Production of Low-Carbon-Fuels and Chemicals from Waste and Renewable Feedstocks. *Frontiers in microbiology, 7,* 694. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00694

Linke, H. (1969). CO_2-Fixierung durch *Clostridium aceticum*: $^{14}CO_2$-Kurzzeiteinbau und Pyruvatstoffwechsel. *Archieves of Microbiology, 64,* 203–214.

Liou, J. S.-C., Balkwill, D. L., Drake, G. R. & Tanner, R. S. (2005). *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 55* (5), 2085–2091. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63482-0

Liu, H., Wang, G. & Zhang, J. (2013). The Promising Fuel-Biobutanol. In Z. Fang (Hrsg.), *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques.* InTech. https://doi.org/10.5772/52535

Ljungdahl, L. (1986). The Autotrophic Pathway of Acetate Synthesis in Acetogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology, 40* (1), 415–450. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.40.1.415

Ljungdahl, L. & Wood, H. (1965). Incorporation of C^{14} From Carbon Dioxide into Sugar Phosphates, Carboxylic Acids, and Amino Acids by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology, 89* (4), 1055–1064.

Ljungdahl, L. & Wood, H. (1969). Total synthesis of acetate from CO_2 by heterotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology, 23,* 515–538. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.23.100169.002503

Lorowitz, W. & Bryant, M. (1984). *Peptostreptococcus productus* Strain That Grows Rapidly with CO as the Energy Source. *Applied and Environmental Microbiology, 47* (5), 961–964.

Lowicki, D. & Huczynski, A. (2013). Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and its Derivatives: Summary of the Achievements. *BioMed research international, 2013,* 1–14. https://doi.org/10.1155/2013/742149

Lux, M. F. & Drake, H. L. (1992). Re-examination of the metabolic potentials of the acetogens *Clostridium aceticum* and *Clostridium formicoaceticum*: chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth. *FEMS Microbiology Letters, 95,* 49–56. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05341.x

Maiti, R. N. & Nigam, K. D. P. (2007). Gas−Liquid Distributors for Trickle-Bed Reactors. A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research, 46* (19), 6164–6182. https://doi.org/10.1021/ie070255m

Maitlis, P. & Klerk, A. d. (2013). *Greener Fischer-Tropsch Processes for Fuels and Feedstocks*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/9783527656837

Matsumoto, T., Kabe, R., Nonaka, K., Ando, T., Yoon, K., Nakai, H. et al. (2011). Model study of CO inhibition of [NiFe]hydrogenase. *Inorganic chemistry, 50* (18), 8902–8906. https://doi.org/10.1021/ic200965t

Matthies, C., Freiberger, A. & Drake, H. L. (1993). Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum*. *Archieves of Microbiology, 160,* 273–278. https://doi.org/10.1007/BF00292076

McGlade, C. & Ekins, P. (2015). The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2 °C. *Nature, 517* (7533), 187–190. https://doi.org/10.1038/nature14016

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. *Bioresource Technology, 83,* 55–63. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00120-1

McMurry, J., Begley, T. P. & Beifuss, K. (2006). *Organische Chemie der biologischen Stoffwechselwege* (1. Aufl.). München: Elsevier Spektrum Akad. Verl.

Meier, T., Ferguson, S., Cook, G., Dimroth, P. & Vonck, J. (2006). Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *Journal of Bacteriology, 188* (22), 7759–7764. https://doi.org/10.1128/JB.00934-06

Mohammadi, M., Najafpour, G., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M. & Mohamed, A. (2011). Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15* (9), 4255–4273. https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.124

Mohammadi, M., Younesi, H., Najafpour, G. & Mohamed, A. R. (2012). Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 87* (6), 837–843. https://doi.org/10.1002/jctb.3712

Mollenhauer, H. H., James Morré, D. & Rowe, L. D. (1990). Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1031* (2), 225–246. https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90008-Z

Mondal, P., Dang, G. S. & Garg, M. O. (2011). Syngas production through gasification and cleanup for downstream applications — Recent developments. *Fuel Processing Technology, 92* (8), 1395–1410. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.03.021

Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology, 3,* 371–394. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

Müller, V. & Bowien, S. (1995). Differential effects of sodium ions on motility in the homoacetogenic bacteria *Acetobacterium woodii* and *Sporomusa sphaeroides*. *Archives of Microbiology, 164* (5), 363–369. https://doi.org/10.1007/BF02529984

Müller-Erlwein, E. (2007). *Chemische Reaktionstechnik* (Chemie in der Praxis, 2., überarb. und erw. Aufl.). Wiesbaden: Teubner.

Munasinghe, P. C. & Khanal, S. K. (2010a). Syngas fermentation to biofuel. Evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (k_La) in different reactor configurations. *Biotechnology progress, 26* (6), 1616–1621. https://doi.org/10.1002/btpr.473

Munasinghe, P. C. & Khanal, S. K. (2010b). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology, 101* (13), 5013–5022. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.098

Munk, K. (Hrsg.). (2008). *Mikrobiologie* (Taschenlehrbuch Biologie). Stuttgart: Thieme.

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels. A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14* (2), 578–597. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003

Najafpour, G. & Younesi, H. (2006). Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme and Microbial Technology, 38* (1-2), 223–228. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.008

Nielsen, J. H., Villadsen, J. & Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles* (2. ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publ.

Nogueira, E. S., Pinto, J. C. & Vianna, A. S. (2012). Analysis of energy dissipation in stirred suspension polymerisation reactors using computational fluid dynamics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering, 90* (4), 983–995. https://doi.org/10.1002/cjce.20611

Ollivier, B., Cordruwisch, R., Lombardo, A. & Garcia, J.-L. (1985). Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology, 142* (3), 307–310. https://doi.org/10.1007/BF00693409

Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria. New insights. *Biochimica et biophysica acta, 1717* (2), 67–88. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010

Peralta-Yahya, P. P., Zhang, F., del Cardayre, Stephen B. & Keasling, J. D. (2012). Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature, 488* (7411), 320–328. https://doi.org/10.1038/nature11478

Perez, J. M., Richter, H., Loftus, S. E. & Angenent, L. T. (2013). Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. *Biotechnology and bioengineering, 110* (4), 1066–1077. https://doi.org/10.1002/bit.24786

U.S. Department of Energy & U.S. Department of Agriculture. (2005). *Biomass as Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply*. Washington, D.C. http://www.osti.gov/bridge

Peters, V., Janssen, P. H. & Conrad, R. (1999). Transient Production of Formate During Chemolithotrophic Growth of Anaerobic Microorganisms on Hydrogen. *Current Microbiology, 38* (5), 285–289. https://doi.org/10.1007/PL00006803

Phillips, J. R., Atiyeh, H. K., Tanner, R. S., Torres, J. R., Saxena, J., Wilkins, M. R. et al. (2015). Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technology, 190,* 114–121. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.043

Phillips, J. R., Clausen, E.C. & Gaddy, J.L. (1994). Synthesis gas as substrate for the biological production of fuels and chemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 45-46* (1), 145–157. https://doi.org/10.1007/BF02941794

Phillips, J. R., Klasson, K.T., Clausen, E. C. & Gaddy, J. L. (1993). Biological Production of Ethanol from Coal Synthesis Gas. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (39/40), 559–571. https://doi.org/10.1007/BF02919018

Pierce, E., Xie, G., Barabote, R., Saunders, E., Han, C., Detter, J. et al. (2008). The Complete Genome Sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environmental microbiology, 10* (10), 2550–2573. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01679.x

Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A., Goenrich, M., Vollmers, J., Thurmer, A. et al. (2012). An Ancient Pathway Combining Carbon Dioxide Fixation with the Generation and Utilization of a Sodium Ion Gradient for ATP synthesis. *PLoS ONE, 7* (3), 1–8. https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0033439

Poehlein, A., Cebulla, M., Ilg, M. M., Bengelsdorf, F. R., Schiel-Bengelsdorf, B., Whited, G. et al. (2015). The Complete Genome Sequence of *Clostridium aceticum*: a Missing Link between Rnf- and Cytochrome-Containing Autotrophic Acetogens. *mBio, 6* (5), 1–9. https://doi.org/10.1128/mBio.01168-15

Poston, J., Kuratomi, K. & Stadtman, E. (1964). Methyl-Vitamin B_{12} As a Source Of Methyl Groups For The Synthesis Of Acetate By Cell-free Extracts Of *Clostridium thermoaceticum*. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 112,* 804–806. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb45057.x

Ragsdale, S. (1997). The Eastern and Western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the East and West were won. *BioFactors, 6,* 3–11. https://doi.org/10.1002/biof.5520060102

Ragsdale, S. (2004). Life with carbon monoxide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 39* (3), 165–195. https://doi.org/10.1080/10409230490496577

Ragsdale, S. (2008). Enzymology of the Wood-Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1125* (1), 129–136. https://doi.org/10.1196/annals.1419.015

Ragsdale, S., Ljungdahl, L. & DerVartanian, D. (1983). Isolation of Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and Comparison of Its Properties with Those of the *Clostridium thermoaceticum* Enzyme. *Journal of Bacteriology, 155* (3), 1224–1237.

Ragsdale, S. & Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO_2 fixation. *Biochimica et biophysica acta, 1784* (12), 1873–1898. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012

Rahlfs, S., Aufurth, S. & Müller, V. (1999). The Na^+-F_1F_0-ATPase Operon from *Acetobacterium woodii*. *Journal of Biological Chemistry, 274* (48), 33999–34004. https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33999

Rajagopalan, S., Datar, R. P. & Lewis, R. S. (2002). Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biomass and Bioenergy, 23* (6), 487–493. https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00071-5

Ramió-Pujol, S., Ganigué, R., Bañeras, L. & Colprim, J. (2015). How can alcohol production be improved in carboxydotrophic clostridia? *Process Biochemistry, 50* (7), 1047–1055. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.019

Redl, S., Diender, M., Jensen, T., Sousa, D. & Nielsen, A. (2017). Exploiting the potential of gas fermentation. *Industrial Crops and Products, 106,* 21–30. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.015

Ribeiro, C. P. (2008). On the estimation of the regime transition point in bubble columns. *Chemical Engineering Journal, 140* (1-3), 473–482. https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.11.029

Richardson, Y., Blin, J. & Julbe, A. (2012). A short overview on purification and conditioning of syngas produced by biomass gasification. Catalytic strategies, process intensification and new concepts. *Progress in Energy and Combustion Science, 38* (6), 765–781. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2011.12.001

Richter, H., Martin, M. & Angenent, L. (2013). A Two-Stage Continuous Fermentation System for Conversion of Syngas into Ethanol. *Energies, 6* (8), 3987–4000. https://doi.org/10.3390/en6083987

Roe, A. J., McLaggan, D., Davidson, I., O`Byrne, C. & Booth, I. R. (1998). Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids. *Journal of Bacteriology, 180* (4), 767–772.

Rosencrantz, D., Rainley, F. & Janssen, P. (1999). Culturable Population of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology, 65* (8), 3526–3533.

Rytter, E. & Holmen, A. (2015). Deactivation and Regeneration of Commercial Type Fischer-Tropsch Co-Catalysts—A Mini-Review. *Catalysts, 5* (2), 478–499. https://doi.org/10.3390/catal5020478

Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P. & Takors, R. (2013). *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin: Springer Spektrum. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67426-6

Sander, R. (1999). *Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry:* Max-Planck Institute of Chemistry, Air Chemistry Department Mainz, Germany. Zugriff am 02.03.2015. http://enviromap.utah.gov/businesses/E/EnSolutions/depleteduranium/performassess/compliancereport/docs/2014/07Jul/supinfo/appreferences/Sander1999.pdf

Savage, M., Zhongren, W., Daniel, S., Lundie, L. & Drake, H. (1987). Carbon Monoxide-Dependent Chemolithotrophic Growth of *Clostridium thermoautotrophicum*. *Applied and Environmental Microbiology, 53* (8), 1902–1906.

Saxena, J. & Tanner, R. S. (2011). Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38* (4), 513–521. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0794-6

Saxena, S. (2015). *Applied Microbiology*. New Delhi: Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2259-0

Schiel-Bengelsdorf, B. & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters, 586* (15), 2191–2198. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.043

Schink, B. (1984). *Clostridium magnum* sp. nov., a non-autotrophic homoacetogenic bacterium. *Archives of Microbiology, 137* (3), 250–255. https://doi.org/10.1007/BF00414553

Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M. et al. (1993). Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsalatus*. A putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase.

MGG Molecular & General Genetics, 241-241 (5-6), 602–615. https://doi.org/10.1007/BF00279903

Schmidt, S., Biegel, E. & Müller, V. (2009). The ins and outs of Na^+ bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. *Biochimica et biophysica acta, 1787* (6), 691–696. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2008.12.015

Schuchmann, K. & Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology, 12* (12), 809–821. https://doi.org/10.1038/nrmicro3365

Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J. et al. (2008). Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science (New York, N.Y.), 319* (5867), 1238–1240. https://doi.org/10.1126/science.1151861

Seedorf, H., Fricke, F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A. et al. (2008). The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105* (6), 2128–2133. https://doi.org/10.1073/pnas.0711093105

Shen, Y., Brown, R. & Wen, Z. (2014). Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. *Biochemical Engineering Journal, 85,* 21–29. https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.01.010

Silvester, N. R. & Sleigh, M. A. (1985). The forces on microorganisms at surfaces in flowing water. *Freshwater Biology, 15,* 433–448. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1985.tb00213.x

Sim, J., Kamaruddin, A. & Long, W. (2008). Biocatalytic conversion of CO to acetic acid by *Clostridium aceticum*-Medium optimization using response surface methodology (RSM). *Biochemical Engineering Journal, 40* (2), 337–347. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.006

Sim, J., Kamaruddin, A., Long, W. & Najafpour, G. (2007). *Clostridium aceticum* - A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology, 40* (5), 1234–1243. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.017

Sim, J. H. & Kamaruddin, A. H. (2008). Optimization of acetic acid production from synthesis gas by chemolithotrophic bacterium--*Clostridium aceticum* using statistical approach. *Bioresource Technology, 99* (8), 2724–2735. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.004

Sims, R., Mabee, W., Saddler, J. & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology, 101* (6), 1570–1580. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046

Slobodkin, A., Reysenbach, A. L., Mayer, F. & Wiegel, J. (1997). Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology, 47* (4), 969–974. https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-969

Smith, C. & Song, W. (1996). Comparative nutrition of pantothenic acid. *Nutritional Biochemistry, 7,* 312–321. https://doi.org/10.1016/0955-2863(96)00034-4

Sun, X., Atiyeh, H., Kumar, A. & Zhang, H. (2018). Enhanced ethanol production by *Clostridium ragsdalei* from syngas by incorporating biochar in the fermentation medium. *Bioresource Technology, 247,* 291–301. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.060

Suresh, S., Srivastava, V. C. & Mishra, I. M. (2009). Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Critical reviews in biotechnology, 29* (4), 255–278. https://doi.org/10.3109/07388550903062314

Tang, I., Okos, M. & Yang, S. (1989). Effects of pH and Acetic Acid on Homoacetic Fermentation of Lactate by *Clostridium formicoaceticum*. *Biotechnology and Bioengineering, 34,* 1063–1074. https://doi.org/10.1002/bit.260340807

Tanner, R., Miller, L. & Yang, D. (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *International Journal of Systematic Bacteriology, 43,* 232–236. https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-232

Thauer, R., Jungermann, K. & Decker, K. (1977). Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological Reviews, 41* (1), 100–180.

Tremblay, P., Zhang, T., Dar, S., Leang, C. & Lovley, D. (2012). The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin:NAD^+ Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth. *mBio, 4* (1), 1–8. https://doi.org/10.1128/mBio.00406-12

U.S. Global Change Research Program. (2017). *Climate Science Special Report: Fourth National Climate Assessment, Volume I. Fourth National Climate Assessment, Volume I* (Wuebbles, D. J., Fahey, D. W., Hibbard, K. A., Dokken, D. J., Stewart, B. C. & Maycock, T. K., Hrsg.). https://doi.org/10.7930/J0J964J6

Ueki, T., Nevin, K., Woodard, T. & Lovley, D. (2014). Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii*. *mBio, 5* (5), e01636-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01636-14

United Nations. (2015). *Adoption of the Paris Agreement.* Zugriff am 16.03.2018. http://unfccc.int/files/essential_background/convention/application/pdf/english_paris_agreement.pdf

Van Steen, E. & Claeys, M. (2008). Fischer-Tropsch Catalysts for the Biomass-to-Liquid (BTL)-Process. *Chemical Engineering & Technology, 31* (5), 655–666. https://doi.org/10.1002/ceat.200800067

Vega, J., Holmberg, V., Clausen, E. & Gaddy, J. (1988). Fermentation parameters of *Peptostreptococcus productus* on gaseous substrates (CO, H_2/CO_2). *Archives of Microbiology, 151* (1), 65–70. https://doi.org/10.1007/BF00444671

Vega, J. L., Clausen, E. C. & Gaddy, J. L. (1989). Study of gaseous substrate fermentations: carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch culture. *Biotechnology and bioengineering, 34* (6), 774–784. https://doi.org/10.1002/bit.260340607

Verma, D., Singla, A., Lal, B. & Sarma, P. M. (2016). Conversion of biomass-generated syngas into next-generation liquid transport fuels through microbial intervention. Potential and current status. *Curr Sci, 110* (3), 329–336. https://doi.org/10.18520/cs/v110/i3/329-336

Wang, L., Bradstock, P., Li, C., McInerney, M. & Krumholz, L. (2016). The role of Rnf in ion gradient formation in *Desulfovibrio alaskensis*. *PeerJ, 4,* e1919. https://doi.org/10.7717/peerj.1919

Welte, C., Krätzer, C. & Deppenmeier, U. (2010). Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*. *The FEBS journal, 277* (16), 3396–3403. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07744.x

Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, M. & Wandrey, C. (1997). Substrate Controlled Fed-Batch Production of L-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Progress, 13* (4), 387–393. https://doi.org/10.1021/bp970034j

Weuster-Botz, D. (2011). *Stationäre biologische Reaktionen in Modell-Bioreaktoren*. Version 2.11. Bioreaktoren und ihre Auslegung.

Weuster-Botz, D., Paschold, H., Striegel, B., Gieren, H., Kula, M.-R. & Wandrey, C. (1994). Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale. *Chemical Engineering & Technology, 17* (2), 131–137. https://doi.org/10.1002/ceat.270170211

Wieringa, K. (1936). Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek, 3,* 263–273.

Wieringa, K. (1940). The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, 6,* 251–262. https://doi.org/10.1007/BF02146190

Willis, A. (1976). Techniques for the Study of Anaerobic, Spore-forming Bacteria. In J. Norris (Ed.), *Methods in microbiology* (3rd ed., Bd. 3, pp. 79–115). London: Academic Press.

Wood, H. (1952). Fermentation of 3,4-C^{14}- and 1-C^{14}-labeled Glucose by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Biological Chemistry, 199*.

Wood, H., Ragsdale, S. & Pezacka, E. (1986). The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiology Reviews, 39* (4), 345–362. https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90022-4

Worden, M. R. & Bredwell, M. D. (1998). Mass-Transfer Properties of Microbubbles. 2. Analysis Using a Dynamic Model. *Biotechnology Progress, 14* (1), 39–46. https://doi.org/10.1021/bp970131c

Xu, D., Tree, D. R. & Lewis, R. S. (2011). The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels. *Biomass and Bioenergy, 35* (7), 2690–2696. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.005

Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S. & Ljungdahl, L. (1983). Purification and Properties of NADP-dependent Formate Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a Tungsten-Selenium-Iron Protein. *The Journal of biological chemistry, 258* (3), 1826–1832.

Yang, H. & Drake, H. (1990). Differential Effects of Sodium on Hydrogen- and Glucose-Dependent Growth of the Acetogenic Bacterium *Acetogenium kivui*. *Applied and Environmental Microbiology, 56* (1), 81–86.

Yasin, M., Jeong, Y., Park, S., Jeong, J., Lee, E. Y., Lovitt, R. W. et al. (2015). Microbial synthesis gas utilization and ways to resolve kinetic and mass-transfer limitations. *Bioresource Technology, 177,* 361–374. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.022

Zhang, J., Taylor, S. & Wang, Y. (2016). Effects of end products on fermentation profiles in *Clostridium carboxidivorans* P7 for syngas fermentation. *Bioresource Technology, 218,* 1055–1063. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.071

11 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Definition
[CH]≡THF	Methenyl-Tetrahydrofolat
$[CH_2]$=THF	Methylen-Tetrahydrofolat
$[CH_3]$-CoFeS-P	Methyl-CoFeS-P
$[CH_3]$-THF	Methyl-Tetrahydrofolat
[CHO]-THF	Formyl-Tetrahydrofolat
[H]	Reduktionsäquivalent
° C	Grad Celsius
A. woodii	*Acetobacterium woodii*
$Acetat_{max}$	maximale Acetatkonzentration
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
BTM	Biotrockenmassekonzentration
BTM_{max}	maximale Biotrockenmassekonzentration
C. carboxidivorans	*Clostridium carboxidivorans*
C. aceticum	*Clostridium aceticum*
C. ljungdahlii	*Clostridium ljungdahlii*
C. ragsdalei	*Clostridium ragsdalei*
$C_{10}H_8$	Naphtalin
C_2H_4	Ethen
C_2H_6	Ethan
$C_6H_{12}O_6$	Hexose
C_6H_6	Benzen
$c_{Acetat,0}$	Acetatkonzentration zum Zeitpunkt t = 0
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CH_3COOH	Essigsäure
CH_4	Methan
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoFeS-P	Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
e^-	Elektron
Ech	engl.: *Energy conserving hydrogenase*, energiekonservierende Hydrogenase
ETH2120	*N,N,N',N'*-Tetracyclohexyl-1,2-phenylenedioxydiacetamid
Fd	Ferredoxin, oxidiert
Fd^{2-}	Ferredoxin, reduziert
Fe	Eisen
g	Gramm
h	Stunde
H^+	Proton
H_2	Wasserstoff
H_2O	Wasser
H_2S	Schwefelwasserstoff
HCl	Salzsäure
HCN	Cyanwasserstoff

Abkürzung	Definition
HEPA	engl.: *High Efficiency Particulate Air filter*, Schwebstofffilter
HPLC	engl.: *High Performance Liquid Chromatography*, Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie
HSCoA	Coenzym A
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Datenbank
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
KOH	Kaliumhydroxid
konst.	konstant
L	Liter
L-Cys-HCl	L-Cystein-Hydrochlorid
M	molar, mol L^{-1}
m^3	Kubikmeter
mbar	Millibar
min	Minute
mL	Milliliter, 10^{-3} L
mm	Millimeter, 10^{-3} m
mmol	Millimol, 10^{-3} mol
mol_C	mol Kohlenstoff
n. a.	nicht angegeben
Na^+	Natrium-Kation
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH_3	Ammoniak
Ni	Nickel
nm	Nanometer, 10^{-9} m
NO_X	Stickoxide
OD	optische Dichte
P	Produkt
$P\ V^{-1}$	volumetrischer Leistungseintrag, W L^{-1}
PBS	engl.: *Phosphate Buffered System*, phosphatgepufferte Salzlösung
P_i	Monophosphat
pK_S	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PPG	Polypropylenglycol
rcf	engl.: *relative centrifugal force*, relative Zentrifugalkraft
Rnf	engl.: *Rhodobacter* nitrogen fixation, Ferredoxin-NAD:Oxidoreduktase
rpm	engl.: rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
S	Substrat
S. ovata	*Sporomusa ovata*
SO_2	Schwefeldioxid
THF	Tetrahydrofolat
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
W	Watt
X	Biotrockenmasse
κ	Reduktionsgrad
µ-GC	Mikro-Gaschromatograph
µL	Mikroliter, 10^{-6} L
µm	Mikrometer, 10^{-6} m
µM	Mikromolar, 10^{-6} mol L^{-1}

Symbol	Definition
$\bar{p}_S$	mittlerer Abgaspartialdruck Gas S, mbar
$\dot{V}_{g,ein}$	volumetrischer Eingangsgasstrom, L h^{-1}
$\bar{c}_i$	Konzentration der Komponente i im Fließgleichgewicht, g L^{-1}
$\dot{n}$	Stofftransferrate, mol s^{-1}
$\dot{V}$	Medienvolumenstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_{aus}$	Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_B$	Biomasseablaufstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_{ein}$	Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_{g,aus}$	volumetrischer Abgasvolumenstrom, L h^{-1}
$\dot{V}_P$	Permeatvolumenstrom, L h^{-1}
$\Delta\mu_i$	chemiosmotischer Gradient
$\Delta G^{0'}$	freie Standardenthalpie, kj mol^{-1}
A	Phasengrenzfläche, m^2
c_i	Konzentration Komponente i im Reaktionsvolumen, g L^{-1}
$c_{i,aus}$	Konzentration Komponente i im Ablauf, g L^{-1}
$c_{i,ein}$	Konzentration Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
$c_{i,l}$	Gelöstkonzentration in der Kernströmung, mol L^{-1}
$c_{i,l}^*$	gasseitige Gleichgewichtskonzentration, mol L^{-1}
COTR	engl.: *Carbon Monoxide Transfer Rate*, Kohlenstoffmonoxidtransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
c_P	Produktkonzentration, g L^{-1}
c_S	Substratkonzentration, g L^{-1}
$c_{S,opt}$	optimale Substratkonzentration, g L^{-1}
CTR	engl.: *Carbon Dioxide Transfer Rate*, Kohlenstoffdioxidtransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
c_X	Biotrockenmassekonzentration, g L^{-1}
$c_{X,0}$	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t = 0, g L^{-1}
D	Verdünnungsrate, h^{-1}
D_{ij}	binärer Diffusionskoeffizient der Komponente i in j, m^2 s^{-1}
D_{opt}	optimale Verdünnungsrate, h^{-1}
F(t)	Verweilzeitsummenkurve, -
f_x	OD_{600}-BTM-Korrelationsfaktor, g L^{-1} OD^{-1}
$G_{f,S}$	Gaskonversionsfaktor der Gaskomponente S, %
He_i	Henry-Koeffizient der Komponente i, mol L^{-1} mbar
HTR	engl.: *Hydrogen Transfer Rate*, Wasserstofftransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
K_I	Inhibierungskonstante, g L^{-1}
k_La_i	volumenbezogener Stofftransportkoeffizient der Komponente i, h^{-1}
K_S	Halbsättigungskonstante, g L^{-1}
MGK	Mischgaskonversionsfaktor, -
m_i	Masse der Komponente i, g
MTR	Massentransferrate, mol L^{-1} h^{-1}
n	Generationenzahl, -
OD_{600}	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm, -
p	Druck, mbar
pH_0	pH zum Zeitpunkt t = 0, -
pH_{opt}	optimaler pH, -
ppm	engl.: *parts per million*, 10^{-6}
p_i	Partialdruck Komponente i in der Gasphase, mbar
p_i^*	gasseitiger Gleichgewichtspartialdruck Komponente i, mbar
$p_{S,0}$	Partialdruck Gas S zum Zeitpunkt t = 0, mbar
p_S	Partialdruck Gas S, mbar

Symbol	Definition
$p_{S,ein}$	Eingangspartialdruck Gas S, mbar
$p_{S,opt}$	optimaler Partialdruck Gas S, mbar
q_i	zellspezifische Reaktionsrate Komponente i, g g^{-1} h^{-1}
q_P	zellspezifische Produktbildungsrate, g g^{-1} h^{-1}
$q_{P,max}$	maximale zellspezifische Produktbildungsrate, g g^{-1} h^{-1}
$q_{P,opt}$	optimale zellspezifische Produktbildungsrate, g g^{-1} h^{-1}
q_S	zellspezifische Substrataufnahmerate, g g^{-1} h^{-1}
q_X	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
R	Rezirkulationsverhältnis, -
R	universelle Gaskonstante, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}
r_i	volumetrische Reaktionsgeschwindigkeit Komponente i, g L^{-1} h^{-1}
r_P	volumetrische Produktbildungsrate, g L^{-1} h^{-1}
r_S	volumetrische Substrataufnahmerate, g L^{-1} h^{-1}
r_X	volumetrische Wachstumsrate, g L^{-1} h^{-1}
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, g L^{-1} h^{-1}
T	Prozesstemperatur, °C
t	Prozesszeit, h
T_{opt}	optimale Prozesstemperatur, °C
u	Gasleerrohrgeschwindigkeit, m s^{-1}
V_R	Reaktionsvolumen, L
y_S	Volumenanteil Gaskomponente S, %
$Y_{i,j}$	Ertragskoeffizient Komponente i bezogen auf Komponente j, g g^{-1}
$Y_{X,P}$	produktspezifischer Biomasseausbeutekoeffizient, g g^{-1}
$Y_{X,S}$	substratspezifischer Biomasseausbeutekoeffizient, g g^{-1}
μ	spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
τ	mittlere hydraulische Verweilzeit, h
%w/v	engl.: % *weight per volume*, Gewichtsprozent

12 Anhang

12.1 Medien, Vitamine und Spurenelemente

Vitaminlösung

Tabelle A. 1: Zusammensetzung der verwendeten Vitaminlösung.

Chemikalie	Konzentration
Biotin	2,0 mg L^{-1}
Folsäure	2,0 mg L^{-1}
Pyridoxin-HCl	10,0 mg L^{-1}
Thiamin-HCl × 2 H_2O	5,0 mg L^{-1}
Riboflavin	5,0 mg L^{-1}
Nicotinsäure	5,0 mg L^{-1}
D-Ca-Pantothenat	5,0 mg L^{-1}
Vitamin B_{12}	0,1 mg L^{-1}
p-Aminobenzoesäure	5,0 mg L^{-1}
Liponsäure	5,0 mg L^{-1}

Spurenelementlösung

Tabelle A. 2: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung.

Chemikalie	Konzentration
$CaCl_2$ × 2 H_2O	0,10 g L^{-1}
$CoSO_4$ × 7 H_2O	0,18 g L^{-1}
$CuSO_4$ × 5 H_2O	0,01 g L^{-1}
$FeSO_4$ × 7 H_2O	0,10 g L^{-1}
H_3BO_3	0,01 g L^{-1}
$KAl(SO_4)$ × 12 H_2O	0,02 g L^{-1}
$MgSO_4$ × 7 H_2O	3,00 g L^{-1}
$MnSO_4$ × H_2O	0,50 g L^{-1}
Na_2MoO_4 × 2 H_2O	0,01 g L^{-1}
Na_2SeO_3	0,30 mg L^{-1}
Na_2WO_4 × 2 H_2O	0,40 mg L^{-1}
NaCl	1,00 g L^{-1}
$NiCl_2$ × 6 H_2O	0,03 g L^{-1}
Nitrilotriessigsäure	1,50 g L^{-1}
$ZnSO_4$ × 7 H_2O	0,18 g L^{-1}

Phosphatgepufferte Salzlösung

Tabelle A. 3: Zusammensetzung der verwendeten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS).

Chemikalie	Konzentration
KCl	0,20 g L^{-1}
KH_2PO_4	0,24 g L^{-1}
Na_2HPO_4	1,44 g L^{-1}
NaCl	8,00 g L^{-1}

Vorkulturmedium

Tabelle A. 4: Zusammensetzung des verwendeten Vorkulturmediums.

Chemikalie	Konzentration
Hefeextrakt, mikrogranuliert	2,00 g L^{-1}
K_2HPO_4	0,45 g L^{-1}
KH_2PO_4	0,33 g L^{-1}
L-Cystein-HCl	0,50 g L^{-1}
$MgSO_4$ * 7 H_2O	0,10 g L^{-1}
$NaHCO_3$	10,0 g L^{-1}
NH_4CL	1,00 g L^{-1}
Spurenelementlösung	20 mL L^{-1}
Vitaminlösung	20 mL L^{-1}

Prozess-/Zulaufmedium

Tabelle A. 5: Zusammensetzung des verwendeten Prozess-/Zulaufmediums.

Chemikalie	Konzentration
Hefeextrakt, mikrogranuliert	1,00 g L^{-1}
K_2HPO_4	0,45 g L^{-1}
KH_2PO_4	0,33 g L^{-1}
L-Cystein-HCl	0,50 g L^{-1}
$MgSO_4$ * 7 H_2O	0,10 g L^{-1}
NaCl	6,96 g L^{-1}
$NaHCO_3$	10,0 g L^{-1}
NH_4CL	1,00 g L^{-1}
Spurenelementlösung	40 mL L^{-1}
Vitaminlösung	40 mL L^{-1}

12.2 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle A. 6: Verwendete Chemikalien, deren CAS-Nummern und Bezugsquellen.

Chemikalie	CAS-Nr.	Händler
Biotin	58-85-5	Carl Roth
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10035-04-8	MercK KGaA
$CHNaO_2$	141-53-7	Sigma-Aldrich
$C_2H_3NaO_2$ x 3 H_2O	6131-90-4	Carl Roth
D-Fructose	57-48-7	Carl Roth
C_2H_5OH	64-17-5	Carl Roth
Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)	555-60-2	Sigma Aldrich
$CoSO_4$ x $7H_2O$	10026-24-1	MercK KGaA
$CuSO_4$ x $5H_2O$	7758-99-8	MercK KGaA
Cyanocobalamin	68-19-9	Carl Roth
D-Ca-Pantothenat	137-08-6	Carl Roth
$FeSO_4$ x $7H_2O$	7782-63-0	MercK KGaA
Folsäure	59-30-3	Carl Roth
H_3BO_3	10043-35-3	MercK KGaA
K_2HPO_4	7758-11-4	neoLab
$KAl(SO_4)$ x $12H_2O$	7784-24-9	Carl Roth
KH_2PO_4	7778-77-0	Carl Roth
$KHCO_3$	298-14-6	Carl Roth
Biotin	58-85-5	Carl Roth
Liponsäure	1077-28-7	Carl Roth
$MgSO_4$ x $7H_2O$	10034-99-8	Carl Roth
$MnSO_4$ x H_2O	10034-96-5	MercK KGaA
Monensin Natriumsalz	22373-78-0	Bio Techne GmbH
N,N,N',N'-Tetracyclohexyl-1,2-phenylenedioxydiacetamid (ETH2120)	81686-22-8	Sigma Aldrich
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	10102-40-6	MercK KGaA
Na_2SeO_3	10102-18-8	Sigma Aldrich
Na_2WO_4 x $2H_2O$	10213-10-2	Sigma Aldrich
NaCl	7647-14-5	Carl Roth
$NaHCO_3$	144-55-8	Carl Roth
NH_4CL	12125-02-9	neoLab
$NiCl_2$ x $6H_2O$	7791-20-0	MercK KGaA
Nicotinsäure	59-67-6	MercK KGaA
Nitrilotriessigsäure	139-13-9	Carl Roth
p-Aminobenzoesäure	150-13-0	MercK KGaA
Polypropylenglycol	25322-69-4	Sigma Aldrich
Pyridoxin-HCl	58-56-0	Carl Roth
Riboflavin	83-88-5	Carl Roth
Thiamin-HCl	67-03-8	Sigma Aldrich
Hefeextrakt, mikrogranuliert	8013-01-2	Carl Roth
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	7446-20-0	MercK KGaA

Tabelle A. 7: Komponenten der HPLC.

Komponente	Typ	Bedingungen	Hersteller
Manager	Smartline 5000	-	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Autosampler	HPLC-Autosampler Plus	-	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Säulenofen	Jet Stream 5-85 °C	60 °C	Knauer
Pumpe	HPLC LC Pump Plus	0,6 mL min^{-1}	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
RI-Detektor	HPLC-RI-Detector	60 °C	Finnigan Surveyor, Thermo Fischer
Vorsäule	Micro-Guard Cation H Cartridge (125-0129)	H_2SO_4, 5 mM	Bio-Rad
Trennsäule	Aminex HPX-87H, 300x7, 8 mm (125-0140)	H_2SO_4, 5 mM	Bio-Rad
Software	Agilent EZChrom Elite	-	Agilent

Tabelle A. 8: Komponenten und Peripherie des Rührkesselreaktors.

Komponente	Typ	Hersteller
Laborrührkesselreaktor mit Steuereinheit	Labfors 3, Glasreaktor mit Doppelmantel, 2L	Infors HT
Schikanenkorb	3 Strömungsbrecher	Infors HT
Rührer	2 6-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen)	Infors HT
Begasungsfritte	-	Infors HT
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toldeo
Software	IrisNT Pro Balance, Version 5.3	Infors HT
Waage	QC35EDE-S	Sartorius AG
Massendurchflussmesser	F-111B-1K0-RGD-33-E	Bronkhorst High-Tech B.V.
Massendurchflussregler	F-201CV-500_RGD-33-V	Bronkhorst High-Tech B.V.
Peristaltikpumpe	REGLO Digital MS-4/12	Cole-Parmer
Mikro-Gaschromatograph	490 µ-GC	Agilent Technologies
Mikrofiltrationsmodul	eigener Umbau von: Start AXM Microfiltration Cross Flow Cartridge CFP-4-E-2U	GE Healthcare

Tabelle A. 9: Verwendete Reinstgase und deren Bezugsquellen.

Gas	Produktnummer	Händler
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
Kohlenstoffmonoxid N37 40 L, 200 bar	P0752L40R2A001	Air liquide

Tabelle A. 10: Komponenten der Anaerobkammer.

Komponente	Typ	Hersteller
Anaerobkammer	Typ A, Vinyl, 2 Rundschleusen	Coy Laboratory Products
HEPA-Filter	-	Coy Laboratory Products
Lüftergehäuse unbeheizt	unbeheizt, inkl. Trockenmittel und Palladiumkatalysator	Coy Laboratory Products
Trockenofen	UNB 100	Memmert
Vakuumpumpe	G608NGX	Coy Laboratory Products
Wasserstoff-Analyzer	-	Coy Laboratory Products

Tabelle A. 11: Komponenten des Mikro-Gaschromatographen.

Komponente	Typ	Bedingungen	Hersteller
Mikro-Gaschromatograph	490 µ-GC, 2 Kanäle, Thermalleitfähigkeitsdetektor		Agilent Technologies
Kanal 1	1 m Cox HI	80 °C, 200 kPa	Agilent Technologies
Kanal 2	8 m 5CB HI	40 °C, 150 kPa	Agilent Technologies
Software	EZ		Agilent Technologies

Tabelle A. 12: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller/Händler
Abluftfilter	Acro 50-Belüftungsfilter, PTFE, 0,2 µm	Pall Corporation
Butylgummisepten	GL45	Glasgerätebau Ochs
Einmalkanülen, steril	0,6 x 30 mm; 0,9 x 70 mm	B. Braun
Einwegspritzen, steril	Omnifix-F, 1 mL	B. Braun
Einwegspritzen, steril	1 mL; 5 mL; 10 mL	B. Braun
Einwegspritzen, steril	BD Discardit II (5 mL; 10 mL; 20 mL)	Becton Dickinson GmbH
Einwegspritzen, steril	Norm-Ject (5 mL; 10 mL)	Henke Sass Wolf
HPLC-Rollrandflaschen	ND11, Bördelkappen mit Septum	VWR
Kulturröhrchen, anaerob	Hungate Typ, 16 x 25 mm	Dunn Labortechnik
Küvetten	Halbmikro	Ratiolab
Laborglasflaschen	Duran protect, GL45, 50 mL; 250 mL; 500 mL; 1000 mL	Duran
Laborglasflaschen	GL45, Borosilikatglas (100 mL; 250 mL; 500 mL; 1000 mL; 2000 mL; 5000 mL)	Schott
Lochkappen	GL45	Glasgerätebau Ochs
Mikrozentrifugiergefäße	2 mL	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	200 µL; 1000 µL	Gilson
Pipettenspitzen	10 mL	Brand
Silikonkleber	TFC Silikon Kautschup 6	Troll Factory
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Sterilfilter	Minisart, CA-Membrane, 0,2 µm	Sartorius
Zentrifugenbecher	Centrifuge Bottle 1000 mL	Nalge Company
Zentrifugenröhrchen	Falcon-Typ, 15 mL; 50 mL	Greiner Bio-One
Zuluftfilter	Midisart 2000, PTFE 17805, 0,2 µm	Sartorius