

## Synthetische Ko-Kultivierung von *Clostridium carboxidivorans* mit *Clostridium kluyveri* zur Synthesegasverwertung

Miriam Rebecca Bäumlér

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung einer  
Doktorin der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Petra Mela

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 27.06.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 14.09.2023 angenommen.



*The secret of getting ahead is getting started.*

Mark Twain (1835 - 1910)





## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München. Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Art und Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

In erster Linie möchte ich Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung sowie die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Forschungsvorhabens danken. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die konstruktiven Anregungen und Diskussionen sowie die mir zur Verfügung gestellten Freiräume bei der Bearbeitung des Projektes. Außerdem möchte ich mich für den sehr verständnisvollen Umgang und das allzeit offene Ohr während der Abfassung meiner Arbeit bedanken.

Bei dem Ko-Referenten Prof. Dr. Wolfgang Liebl sowie der Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Petra Mela möchte ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe bedanken.

Auch bei meinen Projektpartnern des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Technischen Universität München, Prof. Dr. Wolfgang Liebl, Dr. Armin Ehrenreich sowie Martina Schneider möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und dem stets offenen Wissensaustausch bedanken. Prof. Dr. Ralf Takors sowie Dr. Martina Rehnert möchte ich für die anregende Zusammenarbeit und den spannenden Austausch in dem vielschichtigen Verbundprojekt Interzell danken. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung des Forschungsvorhabens.

Bei Patrick, Markus und Nelson möchte ich mich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Belangen bedanken.

Ein großer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die stets gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Es ist nicht selbstverständlich in einem Team arbeiten zu können, bei dem so viel Zusammenhalt und Unterstützung gegeben wird wie hier. Mein Dank gilt dabei auch der Gasfermentationsgruppe für jede Stunde der geduldigen Einarbeitung sowie jede Minute der vielen spannenden Diskussionen. Ein großer Dank gebührt allen Studierenden (Philipp, Fabienne, Fabian, Veronika, Julian), die mit tatkräftiger Unterstützung und zuverlässiger Arbeit zum Gelingen dieses Forschungsvorhabens beigetragen haben! Danke, dass aus Kollegen Freunde wurden!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt und die immerwährende Unterstützung bedanken.

...und bei meinem Mann Martin – dafür gibt es einfach nicht genug Worte!



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>9</b>
3.1. Biologische Grundlagen - <i>Clostridium carboxidivorans</i> .....	9
3.1.1. Heterotropher Metabolismus .....	10
3.1.2. Autotropher Metabolismus .....	11
3.1.3. Produktbildung und Produktinhibierung.....	13
3.2. Biologische Grundlagen - <i>Clostridium kluyveri</i> .....	18
3.2.1. Kettenverlängerung via umgekehrter $\beta$ -Oxidation .....	19
3.2.2. Energiekonservierung .....	21
3.2.3. Produktbildung und Produktinhibierung.....	24
3.2.4. Ko-Kultivierung mit acetogenen Mikroorganismen .....	27
3.3. Bioprozesstechnik .....	28
3.3.1. Kinetik von Wachstum und Produktbildung .....	28
3.3.2. Stoffbilanz im idealen Rührkesselreaktor .....	32
3.3.3. Gas-Flüssig Massentransfer im idealen Rührkesselreaktor.....	38
<b>4. Materialien und Methoden</b> .....	<b>42</b>
4.1 Anaerobtechnik .....	42
4.2. Reaktionsmedien – Zusammensetzung und Herstellung.....	43
4.3. Kultivierung von Clostridien.....	47
4.3.1. Stammhaltung.....	47
4.3.2. Vorkulturherstellung und Zellernte .....	47
4.3.3. Parallelkultivierung in Anaerobflaschen.....	47
4.3.4. Kultivierung im Rührkesselreaktor.....	48
4.3.5. Kaskadenkultivierung im Rührkesselreaktor.....	52

4.4. Analytische Methoden .....	55
4.4.1. Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration mittels Extinktionsmessung und Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung in Kombination mit Durchflusszytometrie.....	55
4.4.2. Produktbestimmung mittels HPLC.....	60
4.4.3. Produktbestimmung mittels GC.....	61
4.4.4. Bestimmung der Wachstums- und Produktbildungsraten .....	62
4.4.5. Abgasanalytik zur Bestimmung von Gasaufnahmeleistungen .....	62
<b>5. Reaktionstechnische Charakterisierung von <i>C. kluyveri</i>.....</b>	<b>65</b>
5.1. Vergleichende Analyse verschiedener <i>C. kluyveri</i> Isolate.....	65
5.2. Variation des pH.....	67
5.3. Inhibierungsstudien mit Kohlenmonoxid .....	72
5.4. Ethanol:Acetat-Verhältnis in Gegenwart von CO .....	78
<b>6. Synthetische Ko-Kultur von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. kluyveri</i> im Satzverfahren .....</b>	<b>81</b>
6.1. <i>In solution</i> Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH) - Flow Cytometry (FC).... .....	81
6.2. Verwertung verschiedener Gaszusammensetzungen.....	83
6.2.1. Variation des Eingangs-CO-Partialdrucks .....	83
6.2.2. Variation des Gasvolumenstroms .....	95
6.2.3. Zusätzliche Wasserstoffbereitstellung .....	102
6.3. Kontinuierliche Sulfidzugabe .....	106
6.3.1. Sulfidzugabe bei niedrigem CO-Partialdruck.....	106
6.3.2. Sulfidzugabe bei hohem CO-Partialdruck.....	114
<b>7. Kontinuierliche Gasfermentation in zwei Rührkesselreaktoren in Serie .....</b>	<b>117</b>
7.1. Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren.....	117

---

7.2. Zusätzliche Sulfidbereitstellung .....	122
7.3. Reduktion der hydraulischen Verweilzeit .....	125
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>10. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>11. Anhang .....</b>	<b>161</b>
11.1. Vitamine, Spurenelemente und Medien .....	161
11.2. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	165
11.3. Weiterführende Ergebnisse .....	172
11.3.1. Kontinuierliche Schwefelbereitstellung mit <i>C. kluyveri</i> .....	172



# 1. Einleitung

Eine der größten Herausforderungen der heutigen Zeit und der nahen Zukunft liegt in der Substitution der aus fossilen Ressourcen, wie Erdöl und Erdgas, hergestellten Grundchemikalien und Energieträger durch klimafreundliche und -neutrale Alternativen. Die bis jetzt bekannten verfahrenstechnisch realisierten Prozesse bieten hierbei jedoch Konfliktpotential, da der Anbau von nachwachsenden Rohstoffen zur Nutzung als Energieträger oft in direkter Konkurrenz zur Nahrungsmittelerzeugung steht. Die daraus folgende Verknappung der Anbauflächen und der vorhandenen Ressourcen führt zu Preiserhöhungen im Nahrungsmittelsektor und kann wie 2007 in Mexiko zu sozialpolitischen Problemen führen (Lais Thomaz und Carlos Eduardo Ferreira de Carvalho 2011). Deshalb erscheint die Forschung an alternativen, umweltfreundlichen und nachhaltigen Methoden zur Herstellung von Energieträgern und Grundchemikalien als wertvoller Beitrag zur Loslösung von fossilen Energieträgern und petrochemisch hergestellten Produkten.

Eine Möglichkeit der nachhaltigen Produktion von Energieträgern und Grundchemikalien besteht in der Etablierung biotechnologischer Prozesse zur Verwertung von Synthesegas. Diese Gasmischung besteht hauptsächlich aus Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ), Kohlenstoffmonoxid ( $\text{CO}$ ) und Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ) und kann aus der thermischen Behandlung (Verbrennung/ Vergasung) von kohlenstoffhaltigen Abfällen oder als Abgas aus der Stahlindustrie stammen (Quicker et al.; Molitor et al. 2016). Der Einsatz chemolithoautotropher Mikroorganismen spielt hier eine zentrale Rolle, da diese in der Lage sind, das vorgelegte Synthesegas zu organischen Molekülen umzuwandeln (Kottenhahn et al. 2021; Köpke et al. 2011). Diese nachhaltige biotechnologische Anwendung wird auch als Gasfermentation bezeichnet und bietet auf lange Sicht die Möglichkeit, fossile Energieträger und petrochemisch hergestellte Produkte zu ersetzen.

Strikt anaerobe, acetogene Mikroorganismen können unter autotrophen Bedingungen  $\text{CO}_2$  mit  $\text{H}_2$  über den sogenannten Wood-Ljungdahl-Weg zu dem Stoffwechselzwischenprodukt Acetyl-CoA reduzieren und somit  $\text{CO}_2$ -basierte Chemikalien in wässrigen Medien mit hoher energetischer Effizienz von bis zu 70-90 % produzieren (Claassens et al. 2019). Natürliche Produkte sind Acetat und Ethanol, gefolgt von Butyrat, Butanol, 2,3-Butandiol, Hexanoat und Hexanol, wobei die Bildung der C4- und C6-Produkt eher gering ausfällt. Die prinzipielle Möglichkeit für die rekombinante Produktion von Aceton, Isopropanol, 3-Hydroxypropionat, Mevalonat, Isopren, Farnesen, Butansäurebutylester, Methylethylketon und Isobutanol wurde bereits mit ausgewählten acetogenen Mikroorganismen im Labormaßstab nachgewiesen (Bengelsdorf et al. 2018).





## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Der Klimawandel hervorgerufen durch intensive Nutzung fossiler Ressourcen macht eine Reduktion der Treibhausgasemission erforderlich. Aus diesem Grund hat die Europäische Kommission im September 2020 im Rahmen des Europäischen Green Deals empfohlen, die Emissionen bis 2030 um mindestens 55 % gegenüber 1990 zu reduzieren, um Europa zum ersten klimaneutralen Kontinent zu machen (European Commission et al. 2021). Es besteht daher ein besonderes Interesse an der Entwicklung von Produktionsverfahren, die auf der Verwendung von erneuerbaren Rohstoffen oder sogar Abfall (beispielsweise Gasemissionen) beruhen. Die Nutzung von industriellen Prozess- und Abgasen zur Herstellung von Kraftstoffen und Plattformchemikalien könnte vielversprechend sein (Kottenhahn et al. 2021). Die Gasfermentation mit Synthesegas bietet in diesem Zusammenhang sowohl eine nachhaltige als auch ökologische Lösung ohne den Verbrauch von fossilen Ressourcen oder landwirtschaftlichen Nutzflächen. Synthesegas, welches hauptsächlich aus Wasserstoff ( $H_2$ ), Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und Kohlenstoffmonoxid ( $CO$ ) besteht, fällt bei einer Vielzahl von industriellen Prozessen als Neben- oder Abfallprodukt an (Daniell et al. 2012). Bei der Stahlherstellung werden je nach Verfahren beispielsweise etwa 50 % des eingesetzten Kohlenstoffs als Kohlenmonoxid ( $CO$ ) wieder ausgestoßen (Bengelsdorf et al. 2018). Diese Gasgemische können jedoch von acetogenen Mikroorganismen umgesetzt werden. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren gelingt den Bakterien dies unter Umgebungsbedingungen sowie bei unterschiedlichsten Gaszusammensetzungen und Verunreinigungsgraden (Griffin und Schultz 2012). Strikt anaerobe acetogene Mikroorganismen wie Bakterien der Gattung *Clostridium* können dabei unter autotrophen Bedingungen Synthesegas über den sogenannten Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg im Wesentlichen zu C2-Produkten wie Essigsäure und Ethanol umsetzen. Die erste industrielle Gasfermentationsanlage zur Herstellung von Ethanol mit dem Mikroorganismus *Clostridium autoethanogenum* wurde 2018 mit einer Kapazität von 46.000 Jahrestonnen Ethanol von LanzaTech in China in Betrieb genommen (Weuster-Botz et al. 2020).

Die Gewinnung dieses wasserlöslichen Endprodukts durch Destillation ist jedoch mit viel Energieaufwand und hohen Kosten verbunden (Grootscholten et al. 2013). Zusätzlich sind die geringen Produktkonzentrationen sowie die geringe Wertschöpfung bei der Herstellung von Essigsäure und Ethanol ein grundlegendes Problem der biotechnologischen Anwendung von Gasfermentationsprozessen. Eine Alternative ist die Verlängerung der Kohlenstoffkette der gebildeten Produkte. Manche anaerobe Mikroorganismen sind auch in der Lage, das Synthesegas zu längererkettigen Fettsäuren und Alkoholen umzusetzen, wobei insbesondere die zukünftige industrielle Herstellung von längererkettigen Alkoholen

wie Butanol und Hexanol von Interesse ist. Diese sind aufgrund ihrer hohen Energiedichte sowie ihrer geringen hygroskopischen Aktivität attraktiv (Köpke et al. 2011) und könnten direkt als sogenannte „Drop-in“-Kraftstoffe, welche mit den aktuellen Verbrennungsmotorkonzepten kompatibel sind, Verwendung finden (Dürre und Eikmanns 2015). Ebenso eignen sich die Alkohole für die industrielle Lösungsmittelindustrie oder als Plattformchemikalien für die Umwandlung in Polymere (Abubackar et al. 2011). In diesem Zusammenhang scheint insbesondere der Stamm *Clostridium carboxidivorans* aufgrund seines breiten Produktspektrums interessant für die Gasfermentation zu sein. Dieser obligat anaerobe und acetogene Mikroorganismus zeigt ideales Wachstum bei 37 °C sowie pH 6,0 und ist in der Lage, über den autotrophen Acetyl-CoA-Stoffwechselweg aus Kohlenmonoxid neben den Hauptprodukten Acetat und Ethanol auch geringe Mengen an Buttersäure und Hexansäure sowie an den korrespondierenden Alkoholen Butanol und Hexanol zu bilden (Phillips et al. 2015; Liou et al. 2005).

*C. carboxidivorans* besitzt darüber hinaus ein biphasisches Prozessverhalten: Bei einem pH größer oder gleich pH 6,0 zeigt dieser Mikroorganismus sowohl Wachstum als auch die Bildung von organischen Säuren. In dieser acetogenen Phase sinkt der pH im wässrigen Medium aufgrund der Säurebildung, wobei das Wachstum nachlässt bis ein minimaler pH (meist zwischen pH 4,6 und pH 5,0) erreicht ist. Ab diesem Punkt setzt die solventogene Phase ein, welche sich durch Alkoholbildung auszeichnet. Hier werden zum einen die zuvor gebildeten organischen Säuren zu Alkoholen reduziert und zum anderen Alkohole aus den Gaskomponenten neu synthetisiert (Doll et al. 2018; Ukpong et al. 2012). Durch Hintereinanderschalten von zwei vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasteten und betriebenen Rührkesselreaktoren kann die Raum-Zeit-Ausbeute bei solchen zweiphasigen Gasfermentationsprozessen gesteigert werden. Hierbei erfolgt im ersten Reaktor Wachstum und Säurebildung bei einem höheren pH, während diese Säuren im zweiten Reaktor bei einem niedrigeren pH zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden und ebenfalls eine Alkoholneubildung stattfindet (Weuster-Botz et al. 2020).

Eine Monokultur von *C. carboxidivorans* erreichte bei der kontinuierlichen Umsetzung von CO in einer Rührkessel-Kaskade, bestehend aus zwei hintereinander geschalteten Rührkesselreaktoren mit pH 6,0 im ersten und pH 5,0 im zweiten Reaktor, um das Sechsfache erhöhte Raum-Zeit-Ausbeuten für die Alkohole im Vergleich zu den Ergebnissen bei einem Satzverfahren. Auch die Gleichgewichts-Konzentrationen konnten mit 6,1 g L<sup>-1</sup> Ethanol, 0,7 g L<sup>-1</sup> Butanol und 0,1 g L<sup>-1</sup> Hexanol im Durchschnitt um das Dreifache gesteigert werden (Doll et al. 2018).

Ein essentieller Bestandteil der Gasfermentation ist die ausreichende Bereitstellung der gasförmigen Substrate durch kontinuierliche Begasung, da oftmals von Stofftransportlimitierungen von der Gas- in die Flüssigphase aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von beispielsweise Kohlenmonoxid ausgegangen werden muss (Liew et al. 2016). Eine Möglichkeit zur Steigerung der Löslichkeit ist die Erhöhung der Partialdrücke der einzelnen Gase (Hurst und Lewis 2010; Kantzow und Weuster-Botz 2016). Jedoch kann diese Partialdruckerhöhung einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroorganismen zur Folge haben. Unterschiedlich angelegte Kohlenmonoxidpartialdrücke haben bei *C. carboxidivorans* gezeigt, dass eine geringe Sensitivität gegenüber hohen Partialdrücken besteht. Es wurde sogar ein geeigneter CO-Partialdruck von 600-800 mbar CO bei einem unkontrollierten pH bestimmt, da hier hohe spezifische Wachstumsraten sowie gute Alkohol-zu-Säure-Verhältnisse im Satzbetrieb erreicht werden konnten (Doll 2018).

Eine weitere Möglichkeit, die Produktkonzentrationen der längerkettigen Produkte (ohne gentechnische Modifizierung) zu steigern, ist die zusätzliche Verwendung eines sogenannten kettenverlängernden anaeroben Mikroorganismus in Kombination mit einem acetogenen Mikroorganismus. *Clostridium kluyveri* zeichnet sich durch seinen spezifischen Stoffwechsel, der umgekehrten  $\beta$ -Oxidation, aus. Hierbei wird vorgelegtes Acetat und Ethanol heterotroph durch Kettenverlängerung zu den C4- und C6-Verbindungen Butyrat und Hexanoat sowie geringen Mengen Octanoat und Wasserstoff umgesetzt (Spirito et al. 2014). Die Bedingungen für das ideale Wachstum dieses obligat anaeroben Mikroorganismus liegen bei 37 °C und pH 6,8 (Seedorf et al. 2008).

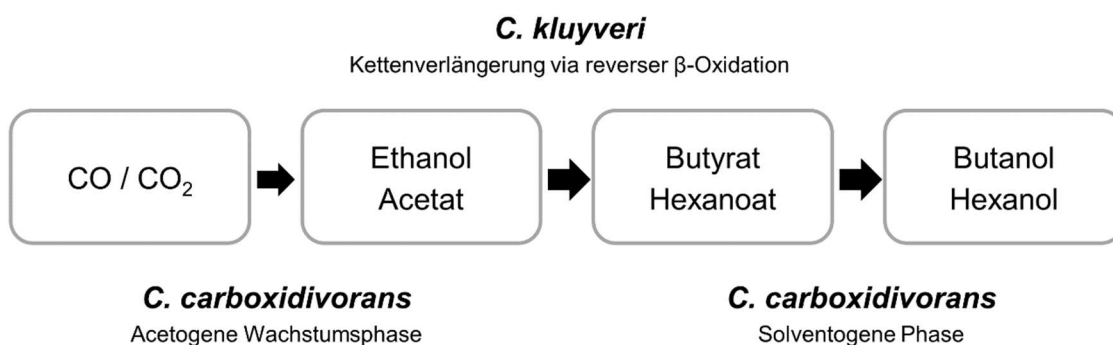
*C. kluyveri* zeigt eine Abhängigkeit von Wachstum und Produktbildung vom pH (Kenealy et al. 1995). Eine Erhöhung auf pH 7,5 hatte einen fast vollständigen Substratverbrauch sowie beinahe ausschließliche Hexanoatbildung zur Folge, während ein niedrigerer pH 5,5 zu einem verringerten Umsatz der Substrate Acetat und Ethanol sowie zu einer Verschiebung der Produktbildung in Richtung des kurzkettigen Produkts Butyrat geführt hat (Yu et al. 2019).

Auch die Verfügbarkeit der Substrate Acetat und Ethanol sowie das Substratverhältnis zueinander können Einfluss auf das Produktspektrum haben. Acetat wird zur Stimulation der Kettenverlängerung benötigt, sodass mit Ethanol als alleinigem Substrat keine längerkettigen Produkte gebildet werden können (Candry et al. 2018). Zwischen Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* sowie der vorliegenden Ethanolkonzentration gibt es eine starke Abhängigkeit, wobei die höchsten Hexanoatkonzentrationen von 21,4 g L<sup>-1</sup> mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol als Substrat im Rührkesselreaktor im Satzprozess erreicht werden

konnten (San-Valero et al. 2019). Das ideale Ethanol:Acetat-Verhältnis wird zu 2,5:1 formuliert (Seedorf et al. 2008).

Da kontinuierlich betriebene Bioprozesse eine Möglichkeit sind, die Raum-Zeit-Ausbeuten weiter zu erhöhen, wurde die Kettenverlängerung einer Monokultur von *C. kluyveri* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor untersucht. Als Zulauf diente hier die Fermentationsbrühe einer Synthesegasfermentation mit *C. autoethanogenum*. Der kontinuierliche Prozess führte zu einem Kohlenstoffumsatz von 90 % mit *C. kluyveri* bei pH 7,0 und erreichte eine Hexanoatproduktion mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Gildemyn et al. 2017).

Die von *C. kluyveri* gebildeten Produkte Butyrat und Hexanoat können von *C. carboxidivorans* in der solventogenen Phase wiederum zu den korrespondierenden Alkoholen Butanol und Hexanol reduziert werden, wodurch sich die Wertschöpfung der Fermentation von Synthesegas deutlich erhöhen würde (Ukpong et al. 2012) (Abb. 2-1).



**Abbildung 2-1** Schematische Darstellung der Produktion von Butanol und Hexanol aus CO und  $\text{CO}_2$  mit einer synthetischen Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*.

Die Verwendung von Ko-Kulturen bietet also Vorteile im Vergleich zu Monokulturen, wie beispielsweise der effizienten Umsetzung von komplexen Substraten und die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Produkten kombiniert mit hohen Produktausbeuten zu erzielen. Daher ist es nicht überraschend, dass auch die Zahl der untersuchten Ko-Kulturen mit Clostridien in den letzten 20 Jahren erheblich zugenommen hat (Du et al. 2020). Dennoch weisen die idealen Bedingungen für Wachstum und Produktbildung des acetogenen Mikroorganismus *C. carboxidivorans* und des heterotrophen kettenverlängernden Mikroorganismus *C. kluyveri* einige Unterschiede auf. Um die Umsetzung von Kohlenmonoxid zu längererkettigen Alkoholen durch eine Kultivierung beider Mikroorganismen gemeinsam in einem einzigen Rührkesselreaktor zu ermöglichen, müssen daher zunächst geeignete Reaktionsbedingungen identifiziert werden.

Zunächst werden hierfür einzelne Satzprozesse bei 37 °C in Rührkesselreaktoren mit einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* und CO/CO<sub>2</sub>-Zufuhr sowie mit einer Reinkultur von *C. kluyveri* unter Zufuhr von Acetat und Ethanol als Kohlenstoffquellen durchgeführt. Das Ziel ist dabei, eine gemeinsame Medienzusammensetzung sowie einen gemeinsamen pH für Wachstum und Produktbildung der beiden Stämme zu ermitteln, da bei dynamischen Prozessen viele Prozesskenntnisse in kurzer Zeit gewonnen werden können.

Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* wird eine starke Sensitivität von *C. kluyveri* gegenüber CO vermutet (Diender et al. 2016). Dieser Effekt wurde jedoch noch nicht genauer untersucht, weswegen im Rahmen dieser Arbeit eine Inhibierungsstudie mit variierenden CO-Partialdrücken mit *C. kluyveri* Reinkulturen in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren durchgeführt wird. Da das Produktspektrum von *C. carboxidivorans* abhängig vom Eingangs-CO-Partialdruck ist, wird auch der Einfluss variierender Substratverhältnisse von Ethanol zu Acetat auf die Kettenverlängerungsaktivität von *C. kluyveri* untersucht.

Daraufhin wird der Einfluss variierender Gaszusammensetzungen ebenfalls auf das Wachstum und die Produktbildung der Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* untersucht. Dabei soll ein CO-Partialdruck identifiziert werden, bei dem sowohl Wachstum beider Mikroorganismen möglich ist, als auch ein gutes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis der erzielten Produkte erreicht wird.

Die Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute durch eine räumlich entkoppelte, zweistufige Prozessführung wird im Zuge dieser Arbeit ebenfalls mit einer Ko-Kultur bestehend aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* untersucht. Durch die Anwesenheit von *C. kluyveri* sollen im ersten Bioreaktor vermehrt die längerkettigen Fettsäuren Butyrat und Hexanoat gebildet werden, welche anschließend im zweiten Reaktor bei einem niedrigeren pH von *C. carboxidivorans* zu den korrespondierenden Alkoholen Butanol und Hexanol reduziert werden sollen. Dadurch sollten sich die Raum-Zeit-Ausbeuten sowie die Produktkonzentrationen der längerkettigen Produkte durch die Verwendung einer synthetischen Ko-Kultur im kontinuierlichen, zweistufigen Prozess weiter verbessern lassen.



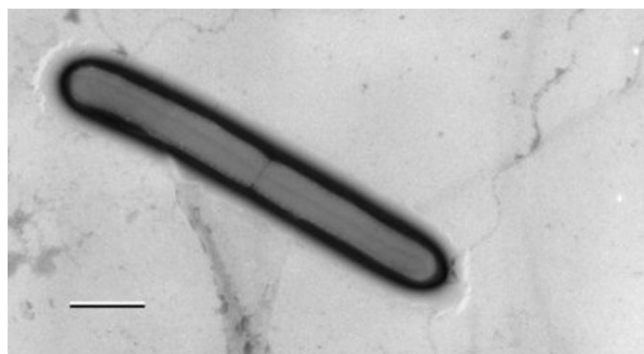
### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1. Biologische Grundlagen - *Clostridium carboxidivorans*

*Clostridium carboxidivorans* P7<sup>T</sup> (DSM 15243) ist ein obligat anaerober und acetogener Mikroorganismus, welcher aus dem Sediment in einem landwirtschaftlichen Klärteich isoliert wurde und einzeln oder in Paaren als grampositives Stäbchen (0,5 x 3 µm) vorkommt (s. Abb. 3-1). Dieser Mikroorganismus ist in der Lage, Sporen zu bilden und bewegt sich durch eine peritriche Begeißelung fort. Der für Wachstum optimale Temperaturbereich des mesophilen Bakteriums liegt zwischen 37-40 °C und bei pH 6,2, wobei Satzkultivierungen von 24°C bis 42°C beziehungsweise von pH 4,4 bis pH 7,2 möglich sind (Liou et al. 2005; Fernández-Naveira et al. 2016).

*C. carboxidivorans* kann mit zahlreichen heterotrophen Kohlenstoffquellen wie Ribose, Xylose, Glucose, Galactose, L-Arabinose, Mannose, Rhamnose und Sucrose wachsen, aber auch Alkohole wie Glycerin, Ethanol, Propanol, 2-Propanol und Butanol zum Wachstum nutzen. Eine weitere Möglichkeit des Wachstums stellen Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat, Histidin, Asparagin, Serin, Alanin sowie quartäre organische Ammoniumverbindungen wie Betain und Cholin dar (Liou et al. 2005).

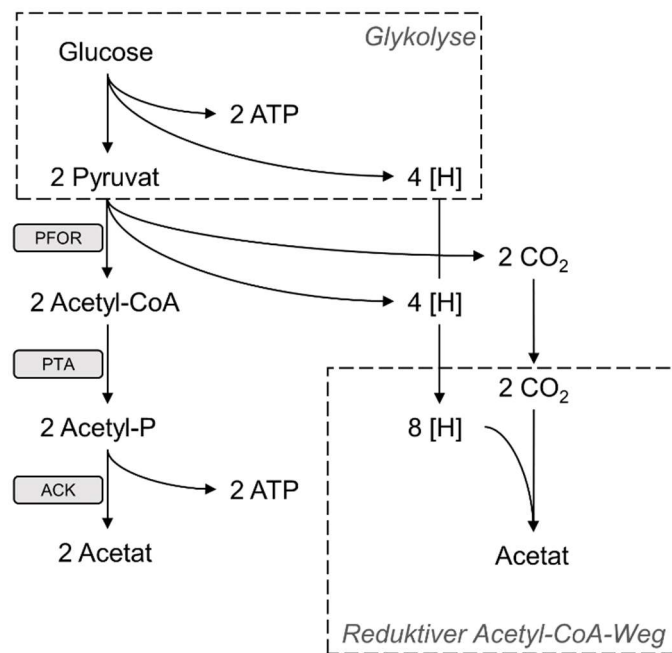
Weiterhin konnte auch autotrophes Wachstum über den Acetyl-CoA-Stoffwechselweg festgestellt werden. Hierbei wurden die Gaskomponenten Kohlenstoffmonoxid (CO) und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) sowie Wasserstoff (H<sub>2</sub>) verwendet. (Liou et al. 2005).



**Abbildung 3-1** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. carboxidivorans* durch Liou et al. (2005). Der gezeigte Balken entspricht einer Länge von 1 µm.

### 3.1.1. Heterotropher Metabolismus

Über den heterotrophen Stoffwechselweg (s. Abb. 3-2) ist *C. carboxidivorans* in der Lage, aus einem Mol Glucose zwei Mol Pyruvat unter Freisetzung von zwei Adenosintri-phosphat (ATP) und vier Reduktionsäquivalenten über Substratkettenphosphorylierung zu bilden (Drake et al. 2006). Durch das Enzym Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) werden zwei Mol Pyruvat zu zwei Mol Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) oxidiert, wobei hierbei 2 Mol  $\text{CO}_2$  und vier weitere Reduktionsäquivalente pro Molekül Glucose gebildet werden. Acetyl-CoA stellt den Verbindungspunkt zwischen Heterotrophie und Autotrophie dar, da dieses Zwischenprodukt im weiteren Verlauf mit den Enzymen Phosphotransacetylase und Acetatkinase über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgewandelt werden kann (Ljungdahl und Wood 1969; Ragsdale und Pierce 2008). Dabei werden wiederum 2 Moleküle ATP über Substratkettenphosphorylierung gewonnen.

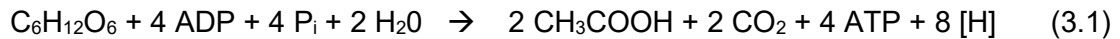


**Abbildung 3-2** Homoacetogene Verwertung von Glucose zu Acetat über die Glykolyse sowie den reduktiven Acetyl-Co-A-Weg. Enzyme: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR); Phosphotransacetylase (PTA); Acetatkinase (ACK). Abbildung abgeändert nach (Drake et al. 2008) sowie (Schuchmann und Müller 2014).

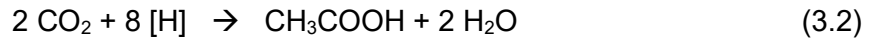
Die zuvor gewonnene zwei Mol  $\text{CO}_2$  und die acht Reduktionsäquivalente können zusätzlich über den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zu einem Mol Acetat reduziert werden. Dieser Mechanismus ist detailliert im folgenden Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Aus einem Mol Glucose können somit exergon drei Mol Acetat gebildet werden ( $\Delta G^0 = -311 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (Gleichung 3.1-3.3) (Müller et al. 2004).



Oxidation:



Reduktion:



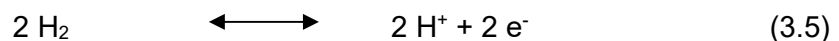
Netto:



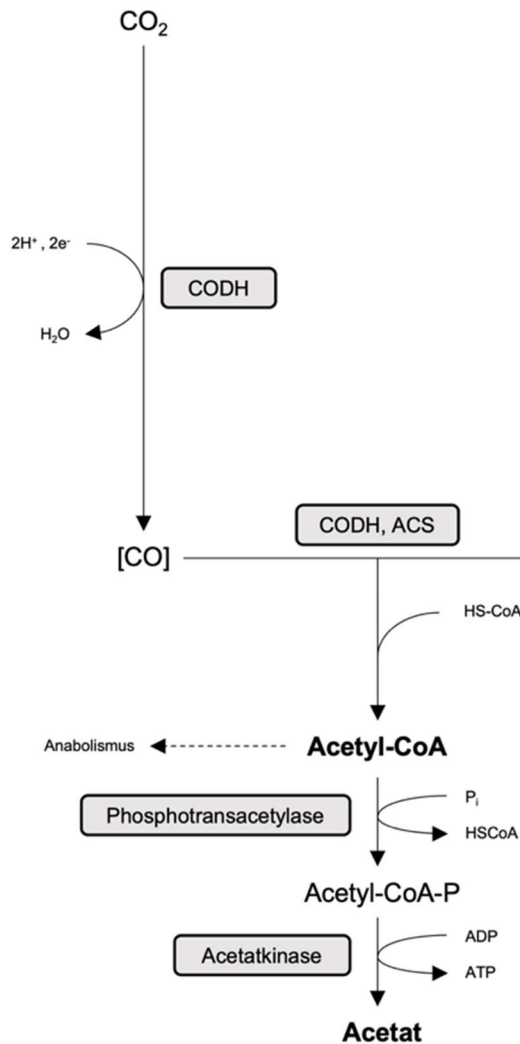
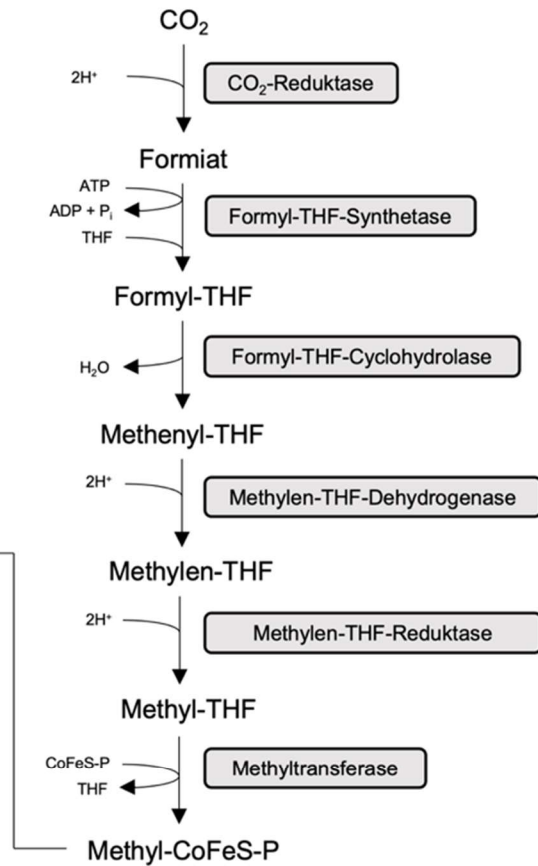
### 3.1.2. Autotropher Metabolismus

Zur Umsetzung autotropher Substrate verwenden Acetogene den reduktiven Acetyl-CoA-Weg zur Energiekonservierung und Kohlenstofffixierung. Nach ihren Entdeckern wird er auch als Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg bezeichnet (Ragsdale 2008). Der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg ermöglicht die schrittweise Reduktion von  $\text{CO}_2$  zum Acetyl-CoA und dient dabei der Kohlenstoffassimilierung (Drake et al. 2006; Drake et al. 2008).

Der autotrophe Acetyl-CoA-Stoffwechselweg ist graphisch in Abbildung 3-3 dargestellt und besteht aus zwei reduktiven linearen Reaktionsketten, dem Methyl-Zweig und dem Carbonyl-Zweig. Der Stoffwechselweg funktioniert sowohl mit den Substraten  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$ , als auch mit  $\text{CO}$  als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Abhängig von der Kohlenstoffquelle wird im Methylzweig entweder  $\text{CO}_2$  direkt eingespeist oder  $\text{CO}$  mittels einer bifunktionellen CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase durch die biologische Wassergas-Shift-Reaktion oxidiert, wobei die für die reduktiven Schritte benötigten Reduktionsäquivalente  $[\text{H}]$  generiert werden. Zur Generierung von Reduktionsäquivalenten  $[\text{H}]$  kann ebenfalls  $\text{H}_2$  als Energiequelle zusammen mit einer Hydrogenase verwendet werden (Gl. 3.4- und.5):



$\text{CO}_2$  wird im Methylzweig schrittweise enzymatisch reduziert, wobei es im ersten Schritt durch die Formiatdehydrogenase unter Aufwand zweier Reduktionsäquivalente zu Formiat reduziert wird. Anschließend wird Tetrahydrofolat (THF) unter ATP-Verbrauch mittels der Formyl-THF-Synthetase an das Formiat gebunden und es entsteht Formyl-THF. Unter der Abspaltung von Wasser wird Formyl-THF durch die Formyl-THF-Cyclohydro-lase zu Methenyl-THF umgewandelt

**Carbonyl-Zweig****Methyl-Zweig**

**Abbildung 3-3** Vereinfachte schematische Darstellung des reduktiven Acetyl-CoA-Weges mit Methyl- und Carbonyl-Zweig. Abkürzungen: CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (CODH/ACS); Adenosintri-phosphat (ATP); Tetrahydrofolat (THF); Coenzym A (HSCoA); Mono-phosphat ( $\text{P}_i$ ); Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeS-P). Abgeändert nach (Wilkins und Atiyeh 2011; Drake et al. 2008)

Im nächsten Schritt wird Methenyl-THF mittels der Methylen-THF-Dehydrogenase zunächst zu Methylen-THF und durch die Methylen-THF-Reduktase weiter zu Methyl-THF unter einem Gesamtverbrauch von 4 Reduktionsäquivalenten reduziert. Mittels der Methyltransferase wird im letzten Schritt des Methylzweiges die Methyl-Gruppe auf ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeS-P) übertragen, welches sich anschließend an die Untereinheit der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase anlagert. Im Carbonylzweig wird entweder  $\text{CO}_2$  unter dem Verbrauch zweier Reduktionsäquivalente zu CO reduziert oder CO direkt als Carbonyl-Gruppe verwendet. Zusammen mit der Methylgruppe aus dem Methylzweig wird mit Hilfe der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase das Acetyl-CoA gebildet. Dieses kann nun für den Aufbau von Biomasse und anderen anabolen

Reaktionen oder zur Bildung von Acetat über Acetyl-Phosphat verwendet werden, wobei zusätzlich ATP generiert wird und das CoA erneut zur Verfügung steht.

Aufgrund des Verbrauchs eines ATP durch die Bindung von Formiat an THF, liefert der Acetyl-CoA-Weg keinen Nettoenergiegewinn (Ljungdahl und Wood 1969; Drake et al. 2008; Ragsdale und Pierce 2008).

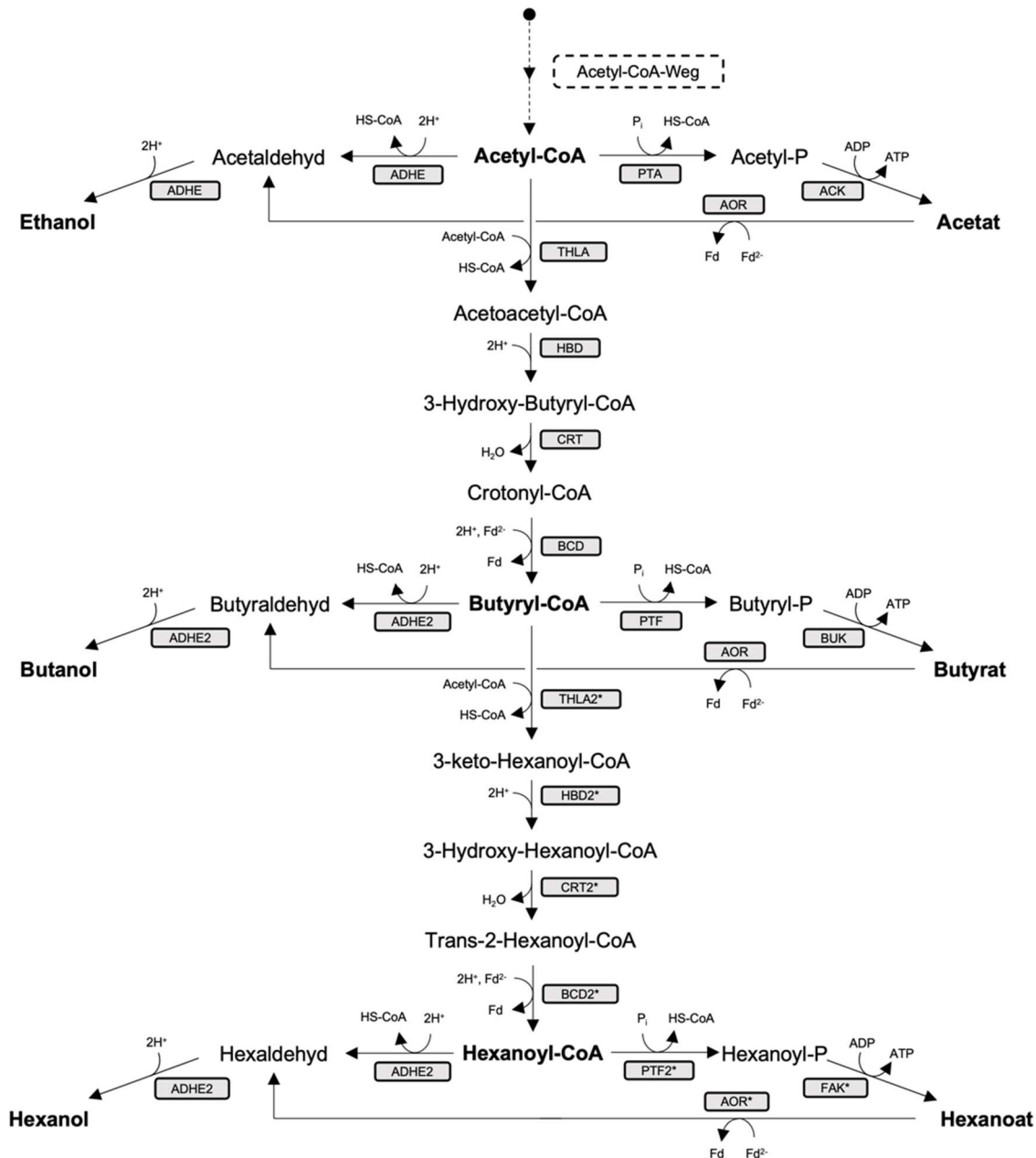
Wenn CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, wird eine Elektronenquelle wie H<sub>2</sub> oder CO benötigt. Einige Acetogene sind in der Lage, CO als alleiniges Substrat für den autotrophen Stoffwechsel zu nutzen, wohingegen andere acetogene Mikroorganismen dazu nicht in der Lage sind, sondern zusätzlich geringe Mengen CO<sub>2</sub> benötigen (Rajagopalan et al. 2002). Für *C. carboxidivorans* wurde sowohl die Notwendigkeit einer zusätzlichen CO<sub>2</sub>-Bereitstellung (Doll 2018) als auch eine Nutzung von CO als alleiniges Substrat beschrieben (Fernández-Naveira et al. 2016).

### 3.1.3. Produktbildung und Produktinhibierung

Neben Acetat kann *C. carboxidivorans* aus Acetyl-CoA auch längerkettige Produkte bilden. Hierzu zählen Butyrat, Butanol, Hexanoat und Hexanol (Liou et al. 2005; Fernández-Naveira et al. 2017). Der Stoffwechselweg ausgehend von Acetyl-CoA zu diesen Produkten ist in Abbildung 3-4 veranschaulicht.

Ethanol kann über zwei Wege gebildet werden. Dabei kann zum einen Acetyl-CoA über die Reduktion zu Acetaldehyd mittels bifunktionaler Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenasen (ADHE) weiter zu Ethanol reduziert werden, wobei insgesamt 4 Reduktionsäquivalente verbraucht werden. Zum anderen kann Acetat mittels einer Ferredoxinabhängigen Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten zu Acetaldehyd reduziert werden. Das Acetaldehyd kann dann wieder durch eine Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE) zu Ethanol reduziert werden, wobei erneut 2 Reduktionsäquivalente verbraucht werden.

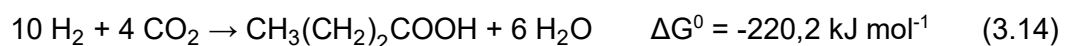
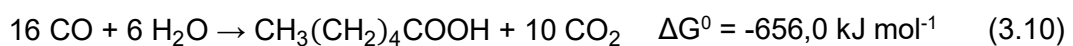
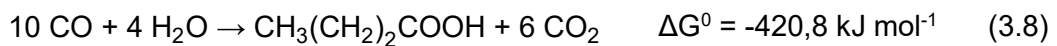
Unter der Verwendung der Enzyme Thiolase (THLA), 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase (HBD), Crotonase (CRT) und Butyryl-CoA-Dehydrogenase (BCD) kann Acetyl-CoA über die Intermediate Acetoacetyl-CoA, 3-Hydroxy-Butyryl-CoA und Crotonyl-CoA über vier weitere Reaktionsschritte zu Butyryl-CoA verlängert werden. Der letzte Reaktionsschritt ist hierbei Ferredoxin-abhängig und es werden insgesamt 4 Reduktionsäquivalente benötigt. Butyryl-CoA kann im Anschluss von einer Phosphotransferase (PTF) phosphoryliert werden und über eine Butyratkinase (BUK) unter Bildung von ATP zu Butyrat umgesetzt werden.



**Abbildung 3-4** Autotrophe Produktbildung von *C. carboxidivorans*, ausgehend von Acetyl-CoA mit folgenden Enzymen: ACK (Acetatkinase), ADH (Alkoholdehydrogenase), ADHE (Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase), ADHE2 (Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase), ALDH (Aldehyd-Dehydrogenase), AOR (Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase), BCD (Butyryl-CoA-Dehydrogenase), BUK (Butyratkinase), CRT (Crotonase), HBD (3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase), FAK (Fettsäurekinase), PTA (Phosphotransacetylase), PTF (Phosphotransferase), THLA (Thiolase). Enzyme, welche mit einem \* gekennzeichnet wurden, sind noch nicht vollständig charakterisiert worden. Acetyl-P: Acetyl-Phosphat, Butyryl-P: Butyryl-Phosphat, Hexanoyl-P: Hexanoyl-Phosphat. Abbildung nach (Daniell et al. 2012; Fernández-Naveira et al. 2017; Bengelsdorf et al. 2018; Lauer et al. 2022).

Analog zu der Umsetzung von Acetat zu Ethanol ist daraufhin eine Bildung von Butanol aus Butyrat möglich. Hierbei findet zunächst eine Ferredoxin-abhängige Reduktion zu Butyraldehyd über eine Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) statt. Anschließend lässt sich dieses unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten mit Hilfe einer bifunktionalen Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE2) zu Butanol reduzieren. Zusätzlich ist

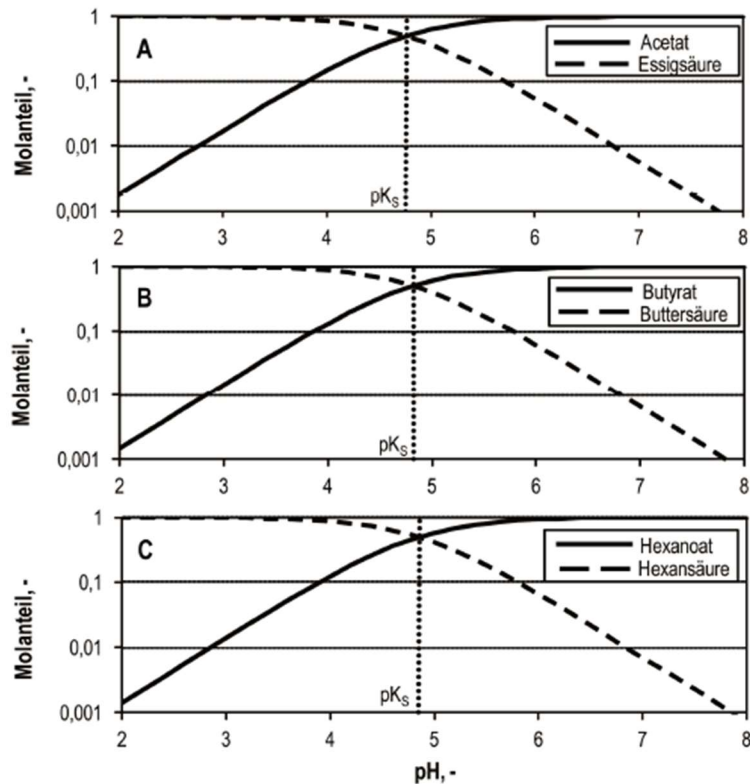
eine direkte Bildung von Butanol ausgehend vom Butyryl-CoA über die Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE2) und Butyraldehyd möglich. Hierbei werden vier Reduktionsäquivalente verbraucht. Von Butyryl-CoA aus erfolgt die Bildung der C6-Produkte Hexanoat und Hexanol durch Kondensation eines weiteren Acetyl-Coenzym A unter Abspaltung eines Coenzym A. Über die Intermediate 3-keto-Hexanoyl-CoA, 3-Hydroxy-Hexanoyl-CoA und trans-2-Hexanoyl-CoA wird Hexanoyl-CoA gebildet. Die hierfür notwendigen Enzyme sind jenen der Butyryl-CoA Synthese sehr ähnlich aber wurden jedoch noch nicht vollständig charakterisiert (Seedorf et al. 2008). Entsprechend der Bildung von Ethanol und Butanol wird davon ausgegangen, dass auch eine Hexanol Bildung über zwei Wege möglich ist. Zum einen kann Hexanoyl-CoA über Hexanoyl-Phosphat zu Hexanoat umgesetzt und Ferredoxin-abhängig zu Hexaldehyd reduziert werden. Anschließend kann hieraus Hexanol gebildet werden. Zum anderen ist eine direkte Umsetzung von Hexanoyl-CoA zu Hexaldehyd mit Hilfe einer Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase (ADHE2) möglich. Die Bildung der einzelnen Produkte sowie die freie Enthalpie ist stöchiometrisch in Gleichung (3.6) – (3.17) veranschaulicht. Hierbei wird CO als Substrat definiert (Daniell et al. 2012; Fernández-Naveira et al. 2017; Bengelsdorf et al. 2018; Lauer et al. 2022).



Bei acetogenen Clostridien wie *C. carboxidivorans* kann die Produktbildung in Satzprozesse ohne pH-Kontrolle in zwei Phasen unterteilt werden: die acetogene Phase, in der organische Säuren wie Acetat gebildet werden, und die solventogene Phase, in der die gebildeten organischen Säuren bei einem niedrigeren pH zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden (Ukpong et al. 2012; Hurst und Lewis 2010). Die in der acetogenen Phase gebildeten Säuren können aufgrund des höheren extrazellulären pH im Vergleich zum Cytoplasma durch Diffusion die Zellmembran durchdringen, im Inneren der Zelle deprotonieren und dabei den lebenswichtigen Protonen-Gradienten der Zelle im Laufe der Zeit stören (Herrero 1983; Bowles und Ellefson 1985). Eine Reduktion der Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen in der solventogenen Phase führt zu einem Anstieg des externen pH (Jones und Woods 1986) und kann daher als adaptive Antwort auf die inhibitorischen Effekte der gebildeten Säuren und somit als Überlebensmechanismus der Zellen angesehen werden (Dürre 2005; Kumar et al. 2014). Während der solventogenen Phase ist zusammen mit einem steigenden pH ein ausbleibendes Wachstum zu verzeichnen (Ukpong et al. 2012), wobei sich die Zellen durch diese Verhaltensweise selbst erhalten und Sporen bilden (Daniell et al. 2012).

Da der pH des Prozessmediums demnach einen nicht vernachlässigbaren Einfluss bei der Produktbildung hat (Abubackar et al. 2011), sind in Abbildung 3-5 die Dissoziationsgleichgewichte für Essigsäure/Acetat, Buttersäure/Butyrat und Hexansäure/Hexanoat dargestellt. Dabei sind die Anteile der protonierten und deprotonierten Säurespezies in Abhängigkeit des jeweiligen pH gezeigt, wodurch die Rolle des pH beim Vorliegen der Säureformen verdeutlicht wird. Der  $pK_S$ -Wert gibt dabei an, wie stark oder schwach eine Säure in wässriger Lösung ist.

Weiterhin spielen auch die gebildeten Produktkonzentrationen der Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol eine nicht vernachlässigbare Rolle bei der Kultivierung von *C. carboxidivorans*. Während erst bei einer vorgelegten Ethanolkonzentration von  $40 \text{ g L}^{-1}$  das Wachstum um 50 % reduziert war (Costa und Moreira 1983), waren bereits Konzentrationen zwischen  $7 \text{ g L}^{-1}$  und  $13 \text{ g L}^{-1}$  Butanol für denselben Effekt ausreichend (Jones und Woods 1986; Woods 1995). Es wird vermutet, dass, aufgrund der Integrität des hydrophoben Butanol in die Phospholipidmembran und der damit verbundenden Veränderung von Phospholipidmembrankomponenten, die erhöhte Toxizität von Butanol von einer erhöhten Zellmembranfluidität resultiert (Jones und Woods 1986; Bowles und Ellefson 1985; Vollherbst-Schneck et al. 1984). Der Effekt der erhöhten Membranfluidität aufgrund der niedrigeren Polarisierung der Moleküle nimmt hierbei mit der Kettenlänge der Alkohole zu (Fernández-Naveira et al. 2017).



**Abbildung 3-5** Darstellung der Dissoziationsgleichgewichte für Acetat/Essigsäure (A), Butyrat/Buttersäure (B) und Hexanoat/Hexansäure (C) mit den entsprechenden Molanteilen der protonierten und deprotonierten Säuren in reinem Wasser bei 25 °C in Abhängigkeit des pH. Die vertikalen Linien markieren die  $pK_s$ -Werte:  $pK_s$  (Acetat/Essigsäure): 4,76;  $pK_s$  (Butyrat/Buttersäure): 4,82;  $pK_s$  (Hexanoat/Hexansäure): 4,85. Abbildung nach (Doll 2018).

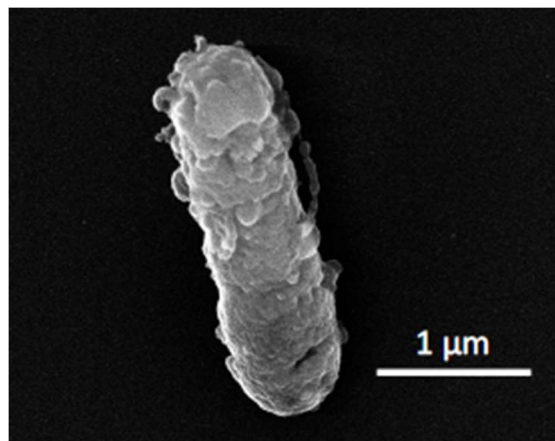
Aufgrund der Fähigkeit aus gasförmigen Substraten neben C2- auch C4- und C6-Alkohole bilden zu können, gilt *C. carboxidivorans* als ein vielversprechender Mikroorganismus für die Synthesegasfermentation. Die bisher maximal erzielten Konzentrationen liegen jedoch nur bei 5,55 g L<sup>-1</sup> Ethanol, 2,66 g L<sup>-1</sup> Butanol und 1,0 g L<sup>-1</sup> Hexanol (Phillips et al. 2015; Fernández-Naveira et al. 2016).

Biogene Synthesegase können Verunreinigungen wie beispielsweise NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und NO<sub>x</sub> enthalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere Stickoxide wie Nitrat und Nitrit negative Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* haben. Eine Bereitstellung von Sulfid in Form von Thioacetamid (1 g S L<sup>-1</sup>) hatte hingegen bei *C. carboxidivorans* in Satzprozessen ohne pH-Kontrolle zu einer Verdopplung der maximalen BTM- und Ethanolkonzentrationen geführt (Rückel et al. 2021). Eine kontinuierliche Zugabe von 0,05 mM L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Schwefel hatte bei *C. ragsdalei* bei einem kontrollierten pH 5,5 sogar eine dreifach erhöhte Ethanolkonzentration mit insgesamt verbesserten Alkohol:Säure-Verhältnissen zur Folge (Oliveira et al. 2022).

### 3.2. Biologische Grundlagen - *Clostridium kluyveri*

Bei *Clostridium kluyveri* handelt es sich um einen stäbchenförmigen, sporenbildenden und obligat anaeroben Mikroorganismus, der erstmals 1937 aus Klärschlamm eines Kanals in Delft (Barker und Taha 1941) und später aus dem Pansen großer Pflanzenfresser (Weimer und Stevenson 2012) isoliert wurde. Der ideale Temperaturbereich des mesophilen Organismus für Wachstum liegt zwischen 35°C und 37°C, wobei Wachstum auch zwischen 22°C und 45°C möglich war. Eine Satzkultivierung kann zwischen pH 4,8 bis pH 9,2 erfolgen wobei pH 6,8 optimal für das Wachstum ist (Kenealy und Waselefsky 1985; Barker und Taha 1941). Der Mikroorganismus besitzt ein zirkuläres Chromosom von 3,96 Mbp und ein zirkuläres 59-kb-Plasmid, dessen Funktion nicht bekannt ist (Seedorf et al. 2008).

*Clostridium kluyveri* gilt als Modellorganismus für die Kettenverlängerung von Carbonsäuren über den umgekehrten  $\beta$ -Oxidationsweg und diente in den 1950er Jahren als Grundlage für die Untersuchungen der Fettsäuresynthese und -oxidation (Seedorf et al. 2008). Die Stoffwechselwege der umgekehrten  $\beta$ -Oxidation, oder auch als Ethanol-Acetat-Fermentation bezeichnet, dienen der Energiegewinnung, wobei die Hauptsubstrate Ethanol und Acetat zu Butyrat und Hexanoat sowie Wasserstoff umgesetzt werden (Spirito et al. 2014; Li et al. 2008).



**Abbildung 3-6** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. kluyveri* (Bielzer 2019).

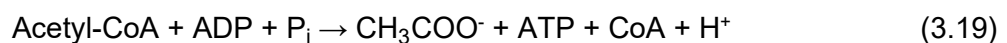
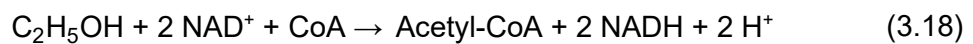
Weitere mögliche Substratmischungen sind Butyrat, Propionat oder Succinat zusammen mit Ethanol, sowie Acetat mit Propanol. Durch die Verwendung einer C3-Verbindung als Substrat kann eine ungerade Anzahl der Kohlenstoffatomkette erzeugt werden (Kenealy und Waselefsky 1985; Weimer und Stevenson 2012; Bornstein und Barker 1948a, 1948b; Zou et al. 2018).



### 3.2.1. Kettenverlängerung via umgekehrter $\beta$ -Oxidation

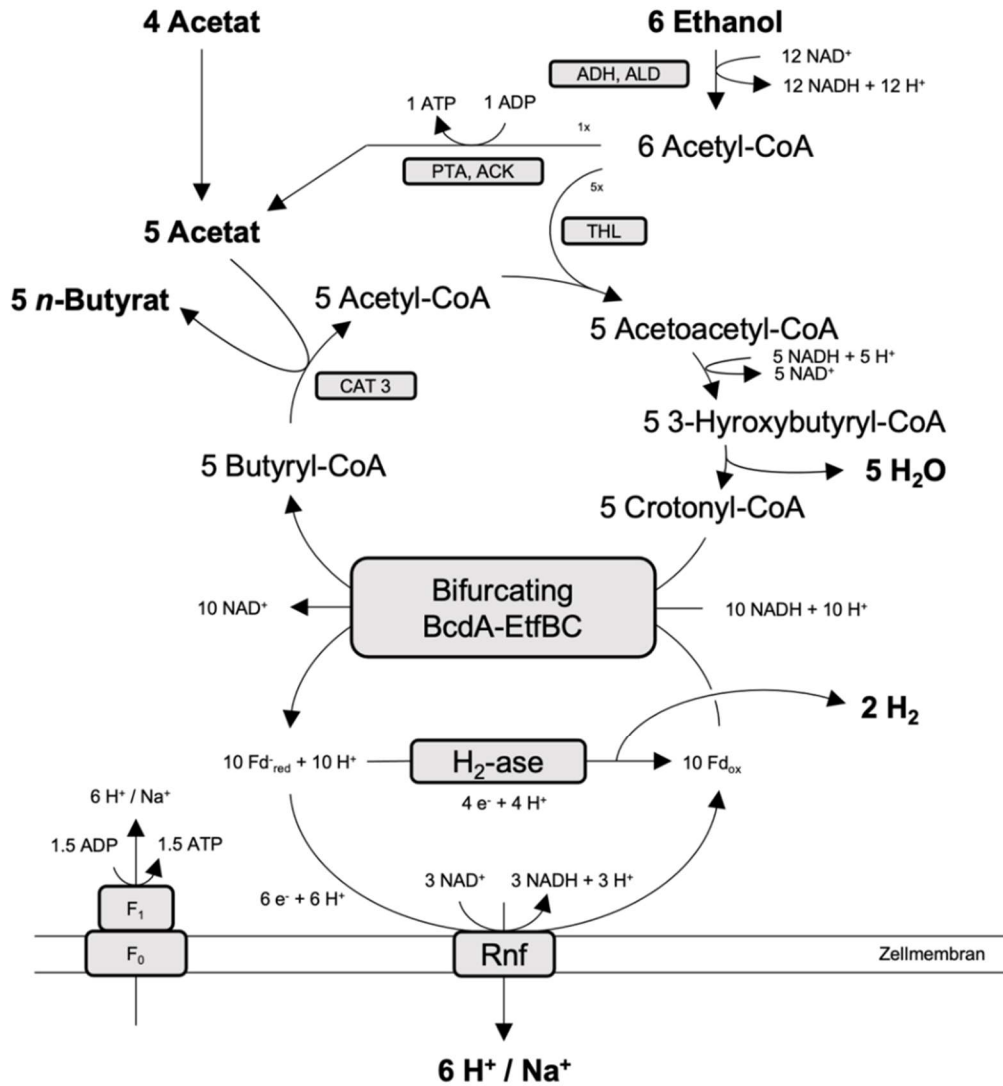
Die Kettenverlängerung von Acetat und Ethanol zu Butyrat und Hexanoat kann in drei Schritte aufgeteilt werden und ist in Abbildung 3-7 dargestellt:

Im ersten Schritt wird Ethanol mittels einer NAD-abhängigen Ethanoldehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert und anschließend mit Hilfe einer Aldehyd-Dehydrogenase (ALD) zu Acetyl-CoA umgesetzt, wodurch pro Mol Ethanol zwei Moleküle NADH generiert werden. Ein kleiner Teil des verfügbaren Ethanols wird, abhängig von den vorherrschenden thermodynamischen Bedingungen, für die Gewinnung von ATP verwendet, indem Acetyl-CoA mittels Phosphotransacetylase (PTA) und Acetatkinase (ACK) durch Substratkettenphosphorylierung zu Acetat umgesetzt wird (Gl. 3.18-3.19) (Angenent et al. 2016; Seedorf et al. 2008):



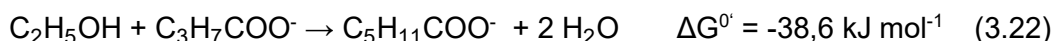
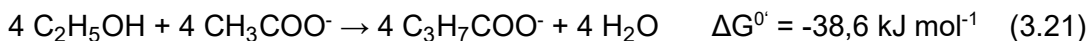
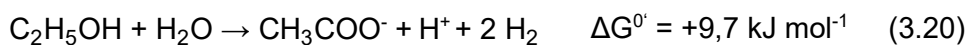
Dieser Stoffwechselweg dient der Kettenverlängerung der Kohlenstoffkette von Acetat um jeweils 2 Kohlenstoffatome zu Butyrat weswegen im zweiten Schritt die umgekehrte  $\beta$ -Oxidation durch die Kopplung eines weiteren Acetyl-CoA an das zuvor gebildeten Acetyl-CoA mittels Acetoacetyl-CoA Thiolase (Acetyl-CoA-Acetyltransferase, THL) eingeleitet wird. Dieses Molekül wird dann im weiteren Verlauf mittels NADP-abhängiger 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (HBD) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert und anschließend mit Hilfe der CoA-Dehydratase (CRT) zunächst zu Crotonyl-CoA und weiter zu Butyryl-CoA dehydriert, katalysiert durch die NAD-abhängige Butyryl-CoA-Dehydrogenase (BcdA/EtfAB). Die Kopplung von Butyryl-CoA an Acetat als Elektronenakzeptor, katalysiert von der Acetat-CoA-Transferase (CAT3), führt zur Bildung von Butyrat und zur Freisetzung von Acetyl-CoA. Acetyl-CoA kann daraufhin den Zyklus erneut durchlaufen, indem es an ein weiteres Acetyl-CoA-Molekül gekoppelt wird, welches durch die Ethanoloxidation bereitgestellt wird (Spirito et al. 2014; Lynen und Ochoa 1953).

Der dritte Schritt besteht aus einem weiteren Zyklus, wobei in diesem Fall Butyrat zu Hexanoat verlängert wird, indem Butyryl-CoA nicht als Butyrat ausgeschleust wird, sondern wiederum an ein Molekül Acetyl-CoA gekoppelt wird. Die Kettenverlängerung erfolgt auf dieselbe Weise, wobei die Zwischenprodukte 3-Keto-Hexanoyl-CoA, 3-Hydroxy-Hexanoyl-CoA, Hex-2-Enoyl-CoA und Hexanoyl-CoA sind (Spirito et al. 2014; Seedorf et al. 2008; Zou et al. 2018). In manchen Fällen wurde sogar von einer weiteren Verlängerung zu Octanoat berichtet (Reddy et al. 2018).



**Abbildung 3-7** Darstellung der reversen β-Oxidation mit folgenden Enzymen: ADH (Alkoholdehydrogenase), ALD (Aldehyddehydrogenase), ACK (Acetatkinase), Cat3 (Butyryl/Caproyl-CoA:Acetyl-CoA-Transferase), PTA (Phosphotransacetylase), THL (Acetoacetyl-CoA Thiolase). Des Weiteren ist der zur Energiegewinnung benötigte BcdA-EtfBC Komplex (Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Elektronenübertragungs-Flavoprotein-Komplex), der Protonengradient erzeugende Rnf-Komplex und das Transmembranprotein F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase dargestellt. Abbildung nach (Seedorf et al. 2008) und (Angenent et al. 2016).

Die Stöchiometrie sowie die freie Gibbs Energie der Substratphosphorylierung sowie der Butyratbildung aus Acetat und Ethanol sind den Gleichungen 3.20 und 3.21 zu entnehmen. Die Kombination, die die Hexanoat-Bildung über die Butyrat-Bildung beschreibt, ist in Gleichung 3.22 zusammengefasst (Seedorf et al. 2008).

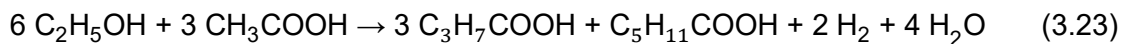


### 3.2.2. Energiekonservierung

#### Elektronenbifurkation

Ähnlich zu *C. carboxidivorans* findet auch in *C. kluyveri* eine Elektronenbifurkation statt, wobei die Elektronen für die Hydrogenaseaktivität nicht von molekularem Wasserstoff, sondern von reduzierten Ferredoxin stammen (Bielzer 2019).

Die gesamte Reaktionsgleichung für die Kettenverlängerung von Acetat und Ethanol zu Hexanoat mit *C. kluyveri* ist in Gleichung 3.23 zusammengefasst und schließt die Bildung von Wasserstoff ein, was zu einer freien Gibbs-Energie von  $-182,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  führt (Seedorf et al. 2008).



$$\Delta G^0 = -182,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Da die Enzyme für die Ethanoloxidation NAD(P)H-abhängig sind, scheinen diese Cofaktoren auch als Elektronendonatoren für die Wasserstoffbildung zu dienen. Zudem ist bekannt, dass die  $\text{H}_2$ -Bildung in Clostridien durch die Reduktion von Protonenreduktion mit reduziertem Ferredoxin mittels zytoplasmatischer Hydrogenase erfolgt. Diese Reduktion von Ferredoxin ( $E^0 = -420 \text{ mV}$ ) mit NAD(P)H ( $E^0 = -320 \text{ mV}$ ) ist eine endergonische Reaktion mit einer Differenz von  $100 \text{ mV}$ , was unter Standardbedingungen vernachlässigbar wäre. In vivo-Experimente ergaben jedoch ein Reduktionspotential des  $2 \text{ H}^+/\text{H}_2$ -Paares nahe  $-400 \text{ mV}$ , was bedeuten würde, dass in der Zelle ein NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Verhältnis von  $1000:1$  erforderlich wäre, um dieses Reduktionspotential zu erreichen. Ein solch hohes Verhältnis konnte jedoch mit der verfügbaren Ethanol-Dehydrogenase-Reaktion des Acetaldehyd/Ethanol-Paares von  $-200 \text{ mV}$  und einem Verhältnis von  $1,5:1$  nicht erreicht werden (Buckel und Thauer 2018; Decker und Pfitzer 1972). Das stationäre Redoxpotential des NAD<sup>+</sup>/NADH-Paares beträgt  $-300 \text{ mV}$  und weist damit eine Differenz von  $120 \text{ mV}$  zum benötigten Redoxpotential auf, was auf eine energiegetriebene Wasserstoffbildung mit der Energie aus einer exergonischen Reaktion schließen lässt. Die Reduktion von Crotonyl-CoA (Hex-2-Enoyl-CoA) zu Butyryl-CoA (Hexanoyl-CoA) mit NADH ist mit  $E^0 = +10 \text{ mV}$  eine stark exergonische Reaktion, die durch den elektronenbifurkierenden Flavoprotein-Komplex Bcd/EtfAB katalysiert wird. Bei dem auf Flavin basierenden Mechanismus der Elektronenverzweigung wird die Reduktionskraft eines Elektrons eines Elektronenpaares gesenkt, um sie für das andere zu erhöhen, indem das Paar durch Flavoproteine aufgespalten wird. NAD(P)H,  $\text{F}_{420}\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2$  oder Formiat können als Hydridonor fungieren und die Akzeptoren für das Elektron mit positiverem Potential sind beispielsweise NAD(P)<sup>+</sup>, Pyruvat, Crotonyl-CoA oder Ubichinon wohingegen

meist Ferredoxin oder Flavodoxin den Akzeptor für das Elektron mit negativerem Redoxpotential geben (Buckel und Thauer 2018; Li et al. 2008).

Der Elektronenfluss in *C. kluyveri* wird also aufgeteilt, um sowohl mit Crotonyl-CoA (Hex-2-Enoyl-CoA) als Akzeptor mit hohem Potential als auch mit Ferredoxin als Akzeptor mit niedrigem Potential zu reagieren (Gl. 3.24). Schließlich wird das reduzierte Ferredoxin zur Regeneration von NADH verwendet, was durch eine membrangebundene, energieumwandelnde NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase (RnfA-G) katalysiert wird (Gl. 3.25) (Seedorf et al. 2008; Buckel und Thauer 2018; Boiangiu et al. 2005).



Die Kopplung dieser Reaktionen ermöglicht die Erzeugung von molekularem Wasserstoff. Während der exothermen Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA mittels des Elektronen-bifurkierenden Komplexes (Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Elektronenübertragungs-Flavoprotein-Komplex, BcdA-EtfBC) wird also Ferredoxin reduziert, welches der Rnf-Komplex zum Aufbau eines Protonengradienten über die Zellmembran hinweg nutzt. Somit dient der Rnf-Komplex zur Energiekonservierung in *C. kluyveri*. Mittels des Transmembranproteins  $F_0F_1$ -ATPase kann schließlich dieser Protonengradient über die Zellmembran hinweg zur Energiegewinnung in Form von ATP genutzt werden. Ein ATP wird mit  $4 \Delta\mu\text{H}^+/\text{Na}^+$  erzeugt (Seedorf et al., 2008; Spirito et al., 2014; Angenent et al., 2016).

### Kohlenstoffquelle

Kohlenstoffdioxid wird als essentielle Kohlenstoffquelle für die Zellvermehrung von *C. kluyveri* angesehen, da experimentelle Daten einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem mikrobiellen Wachstum und der verfügbaren anfänglichen anorganischen Carbonat- oder  $\text{CO}_2$ -Konzentration zeigten (Tomlinson und Barker 1954; Grootscholten et al. 2013).  $\text{CO}_2$  wird als Donator von C1-Einheiten verwendet, der in einem dreistufigen Prozess reduziert wird, an dem die Enzyme Pyruvat-Synthase, ein Zyklus mit der Pyruvat-Formiat-Lyase sowie eine Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase beteiligt sind (Jungermann et al. 1968; Thauer et al. 1970). Para-Aminobenzoesäure wird als Vorstufe von Tetrahydrofolat als Schlüsselenzym-Cofaktor für die  $\text{CO}_2$ -Assimilation benötigt um die Biosynthese von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Purinen aus Kohlenstoffdioxid zu gewährleisten (Bornstein und Barker 1948b; Tomlinson und Barker 1954; Decker und Pfitzer 1972)

In einer  $C^{14}$ -Markierungsstudie mit *C. kluyveri* wurden die größten Anteile des markierten Kohlenstoffs in den Aminosäuren Alanin, Glutamat, Valin und Aspartat identifiziert, während Leucin fast keinen markierten Kohlenstoff aus  $CO_2$  aufwies. Die  $C^{14}$ -Markierungsstudie zeigte außerdem, dass bis zu 25 % des zellulären Kohlenstoffs aus Kohlenstoffdioxid stammt (Tomlinson und Barker 1954), wohingegen andere Studien einen  $CO_2$ -Anteil von bis zu 29 % des zellulären Kohlenstoffs postulierten (San-Valero et al. 2020). Auch eine *in-silico* Modellierung von *C. kluyveri* berechnete eine Proportionalität der Wachstumsrate zur  $CO_2$ -Aufnahme und schätzte einen hohen Bedarf an anorganischem Kohlenstoff und dessen Assimilation auf bis zu 30 % des gesamten Kohlenstoffs in der Biomasse (Zou et al. 2018). Zusätzlich geht man davon aus, dass geringe Mengen an Kohlenstoffdioxid in den Methylkohlenstoff von Acetat eingebaut werden und ein sehr kleiner Teil des Carboxylkohlenstoffs von Acetat als  $CO_2$  erscheint (Tomlinson und Barker 1954). Der restliche zelluläre Kohlenstoff wird aus organischen Kohlenstoffquellen gewonnen (Jungermann et al. 1968).

Zusätzlich hat sich gezeigt, dass die Verfügbarkeit von  $CO_2$  im Medium für die Kettenverlängerung notwendig ist. Die Zugabe von anorganischem Carbonat in Form von Natriumbicarbonat führte zur höchsten Hexanoatkonzentration von  $21,4 \text{ g L}^{-1}$ , die bisher in einem Satzprozess in einem Rührkessel-Bioreaktor mit kontrolliertem pH gemessen wurde (San-Valero et al. 2020). Eine hohe  $CO_2$ -Zufuhr von  $2,5 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ermöglichte eine hohe Ethanol-Oxidationsrate und eine erhöhte Hexanoat-Produktionsrate von  $10,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  in einem kontinuierlich begasten Rührkessel-Bioreaktor, was den Einfluss der Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff nicht nur auf das mikrobielle Wachstum, sondern auch auf die Hexanoat-Produktion belegt (Roghair et al. 2018).

### 3.2.3. Produktbildung und Produktinhibierung

#### pH

Es hat sich bereits früh gezeigt, dass sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung von *C. kluyveri* stark pH-abhängig sind (Kenealy et al. 1995). Da sich der pH der Fermentationsbrühe auf das Lösungsgleichgewicht von Carbonsäuren in Wasser auswirkt (Abb. 3-5), erhöht ein niedriger pH den Säureanteil, was zu einer erhöhten Toxizität führen kann (Agler et al. 2012; Vasudevan et al. 2014). Wachstumsstudien mit *C. kluyveri* bei pH 5,5 zeigten eine verringerte Verbrauchsrate von Acetat und Ethanol und eine Verschiebung der Produktbildung zu Butyrat anstelle von Hexanoat (Yu et al. 2019). Die unzureichende Kettenverlängerung lässt sich möglicherweise durch die geringere Toxizität von Buttersäure erklären, da angenommen wird, dass Hexansäure die Zellmembran leichter passieren kann, was zu einer Ansäuerung des Zytoplasmas führt (Lonkar et al. 2016). Eine Erhöhung auf pH 7,5 führte zu einem nahezu vollständigen Substratverbrauch und einer Umwandlung des zuerst akkumulierten Butyrats in Hexanoat (Yu et al. 2019). Außerdem wurden vergleichende Studien in Satzprozessen mit pH-Kontrolle bei pH 6,4 und pH 7,5 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Verbesserung der Biomassekonzentration um 120 % und der Butyratverbrauchsraten von etwa 60 % auf 90 % durch Erhöhung auf pH 7,5 (San-Valero et al. 2020). Der anfängliche pH dieser Experimente wurde zunächst auf pH 6,8 eingestellt, bis das Wachstum von *C. kluyveri* begann. Danach wurde der untersuchte pH-Sollwert kontrolliert, da ein niedriger Anfangs-pH zu einem Rückgang der Wachstumsrate um 25 % führte (Weimer und Stevenson 2012), was eine fehlende Vergleichbarkeit zur Folge gehabt hätte. Eine Erhöhung auf pH 8,5 oder pH 9,5 unterdrückte die Bildung von Hexanoat und hemmte das Wachstum von *C. kluyveri* (Yu et al. 2019).

#### Substrat-Verhältnis

Acetat wird als Kohlenstoffquelle benötigt, da die alleinige Zufuhr von Ethanol und Butyrat das mikrobielle Wachstum nicht unterstützte, was frühere Studien bestätigte. Es wird angenommen, dass der Transport der längeren Carbonsäure Butyrat in die Zelle mehr Energie benötigt, die zunächst durch den Verbrauch von Acetat bereitgestellt werden muss (Bornstein und Barker 1948a; Candry et al. 2018). Eine vollständige Entfernung von Acetat kann daher zu einem Abbruch der Fermentation führen, da die Kettenverlängerungsreaktion eine Stimulation durch Acetat benötigt, auch wenn die spezifische Aufgabe von Acetat noch nicht vollständig geklärt ist (Diender et al. 2016; Yin et al. 2017). Eine anfängliche Mischung aus Acetat und Butyrat führte zu einer 1,5-fach höheren He-

xanoatkonzentration im Vergleich zur Verwendung von ausschließlich Acetat als Elektronenakzeptor bei konstantem pH 6,8 (San-Valero et al. 2019). Eine Überfütterung mit Acetat hemmt hingegen die Stoffwechselaktivität von *C. kluyveri* aufgrund des hohen osmotischen Drucks bei hohen Natriumacetatkonzentrationen. Eine vollständige Wachstumshemmung wurde bei 20 g L<sup>-1</sup> Acetat, 10,9 g L<sup>-1</sup> Butyrat und 9,3 g L<sup>-1</sup> Hexanoat bei pH 7,8 beobachtet (Candry et al. 2018; Yan und Dong 2018).

Zwischen dem Wachstum von *C. kluyveri* und der Produktbildung bei steigenden Ethanolkonzentrationen in Satzprozessen wird über eine lineare Korrelation berichtet (Kenealy und Waselefsky 1985). Bei Studien mit variierenden initialen Ethanolkonzentrationen in Satzprozessen zwischen 9 und 46 g L<sup>-1</sup> (Gildemyn et al. 2017; Yin et al. 2017; Zou et al. 2018; Yan und Dong 2018; Yu et al. 2019; San-Valero et al. 2020), wurde die maximale Hexanoat-Konzentrationen von 21,4 g L<sup>-1</sup> bei Vorlage von 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol erreicht (San-Valero et al. 2019). Bei initialen Ethanolkonzentrationen über 32 g L<sup>-1</sup> war die Wachstumsrate von *C. kluyveri* reduziert und die Kettenverlängerungsaktivität wurde bei initialen Konzentrationen von mehr als 40 g L<sup>-1</sup> Ethanol vollständig gehemmt (Weimer und Stevenson 2012). Diese Beobachtungen sind noch nicht endgültig geklärt, aber es wurde vermutet, dass ein Einfluss der Ethanolverfügbarkeit auf die Art der ATP-Bildung bestehen könnte (Substratkettenphosphorylierung oder transportgekoppelte Phosphorylierung). Weitere Untersuchungen könnten unter Berücksichtigung der Thermodynamik und des Stoffwechsels (González-Cabaleiro et al. 2013) hilfreich sein, wobei zu bedenken ist, dass die Hexanoatbildung aus einer Wechselwirkung zwischen Elektronenakzeptor und Elektronendonator und somit aus dem Verhältnis von Ethanol zu Acetat besteht (Gildemyn et al. 2017; Yin et al. 2017; Zou et al. 2018; Yan und Dong 2018; Yu et al. 2019; San-Valero et al. 2020).

Es wurde vermutet, dass Wasserstoff (H<sub>2</sub>), der als zusätzliches Produkt während der Kettenverlängerung zusammen mit Hexanoat gebildet wird, als Elektronendonator für die Reduktion der entsprechenden Säuren zu Butanol und Hexanol dienen könnte (Spirito et al. 2014; Ding et al. 2010). Die Bildung dieser Alkohole wurde jedoch bis auf geringe Spuren von Hexanol bisher nicht beobachtet, was die thermodynamischen Grenzen [39] bestätigt, wenn die Ethanolmenge ausreichend für die Kettenverlängerung ist (González-Cabaleiro et al. 2013; Yin et al. 2017; Liu et al. 2016). Tabelle 3-1 fasst die Ergebnisse von Satzprozessen mit Reinkulturen von *C. kluyveri* unter Verwendung von Acetat und Ethanol zur Kettenverlängerung zusammen.

Die veröffentlichten Daten zeigen, dass Hexanoat das Hauptprodukt bei der Fermentation von Acetat und Ethanol durch *C. kluyveri* in Satzprozessen darstellt. Octanoat ist jedoch ein Kettenverlängerungsprodukt, das aufgrund der höheren Wertschöpfung von noch größerem industriellen Interesse ist. Darüber hinaus weist Octanoat eine geringe Wasserlöslichkeit auf (0,68 g L<sup>-1</sup> bei 20 °C), was eine sehr einfache *in-situ* Produktabtrennung im Fermentationsprozess ermöglichen würde und somit eine Produktinhibition minimieren könnte (Kucek et al. 2016).

Die bisher höchste Octanoat-Produktionsrate von 0,33 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde durch die Verwendung eines "ideal geformten Mikrobioms" in einem kontinuierlich betriebenen anaeroben Rührkessel-Bioreaktor mit einem hohen Ethanol-Acetat-Verhältnis und einer *in-situ* Produktextraktion aus der Fermentationsbrühe erreicht (Kucek et al. 2016; Ge et al. 2015). Die Octanoat-Produktion mit Reinkulturen von *C. kluyveri* führte bisher nur zu niedrigen Endkonzentrationen von bis zu 0,5 g L<sup>-1</sup> (Reddy et al. 2018). Alle bisher berichteten Ergebnisse legen nahe, das Ethanol-Acetat-Verhältnis zu erhöhen, um die Produktion von längererkettigen Carbonsäuren zu ermöglichen (Angenent et al. 2016).

**Tabelle 3-1** Satzprozesse mit Reinkulturen von *C. kluyveri* unter Verwendung von Acetat und Ethanol zur Kettenverlängerung.

Initiale Substratkonzentrationen, g L <sup>-1</sup>		Finale Produktkonzentrationen, g L <sup>-1</sup>		Prozesszeit, d	Wachstumsrate, h <sup>-1</sup>	Quelle
<b>Acetat</b>	11	Butyrat	4,6	24	0,004	(Reddy et al. 2018)
<b>Ethanol</b>	27	Hexanoat	3,2			
		Octanoat	0,5			
<b>Acetat</b>	3	Butyrat	1,9	10	0,01	(Yin et al. 2017)
<b>Ethanol</b>	23	Hexanoat	8,4			
<b>Acetat</b>	7	Butyrat	2,5	3	0,06	(Weimer und Stevenson 2012)
<b>Ethanol</b>	32	Hexanoat	12,8			
<b>Acetat</b>	5	Butyrat	5,1	12	0,04	(San-Valero et al. 2019)
<b>Ethanol</b>	15	Hexanoat	21,4			
<b>Butyrat</b>	8					



### 3.2.4. Ko-Kultivierung mit acetogenen Mikroorganismen

Erste Ko-Kultivierungen mit einer definierten Ko-Kultur von *Clostridium autoethanogenum* und *C. kluyveri* in anaeroben Schüttelflaschen bei initialem pH 6,0 mit einem Anfangs-CO-Partialdruck von 1,1 bar CO im Kopfraum führten nach 12 Tagen zu Endproduktkonzentrationen von 2,3 g L<sup>-1</sup> Butyrat, 0,7 g L<sup>-1</sup> Hexanoat, 0,7 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol und 0,4 g L<sup>-1</sup> 1-Hexanol. Durch Verdoppelung der Prozesszeit, Zugabe von Acetat und ohne Schütteln in den ersten 4 Tagen konnten die Konzentrationen der Fettsäuren erhöht werden (Diender et al. 2016). In Rührkessel-Satz-Experimenten bei pH 7,5 mit kontinuierlicher Begasung von 30 % CO, 5 % CO<sub>2</sub>, 15 % H<sub>2</sub> und 50 % N<sub>2</sub> erreichte eine Ko-Kultur aus *Clostridium aceticum* und *C. kluyveri* nach einer Prozesszeit von 900 h durch zusätzliche Ethanolzufuhr maximale Konzentrationen von 7,0 g L<sup>-1</sup> Butyrat, 8,2 g L<sup>-1</sup> Hexanoat und 0,7 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol (Fernández-Blanco et al. 2022).

Da kontinuierlich betriebene Bioprozesse eine Möglichkeit sind, die Raum-Zeit-Ausbeuten weiter zu erhöhen, wurde die Kettenverlängerung einer Monokultur von *C. kluyveri* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor untersucht. Als Zulauf diente hier die Fermentationsbrühe einer Synthesegasfermentation mit *C. autoethanogenum*. Der kontinuierliche Prozess mit zugesetzten Wachstumsfaktoren wie Spurenelementen führte zu einem Kohlenstoffumsatz von 90 % mit *C. kluyveri* bei pH 7,0 und erreichte eine Hexanoatproduktion mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4,1 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Gildemyn et al. 2017).

Die Ko-Kultivierung des acetogenen Bakteriums *Clostridium ljungdahlii* mit dem kettenverlängernden Bakterium *C. kluyveri* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktor mit kontinuierlicher Synthesegaszufuhr (60 % CO, 35 % H<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) führte zu einer Hexanoat-Produktionsrate von 1,3 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bei pH 6,0. Zwei Drittel des vom acetogenen Bakterium produzierten Ethanol wurden von *C. kluyveri* in Hexanoat umgewandelt, das wiederum von *C. ljungdahlii* zu Hexanol mit einer volumetrischen Produktbildungsrate von 0,3 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> reduziert wurde. Der Abfluss aus dem Bioreaktor bestand dabei aus 75 % zellfreiem Filtrat sowie 25 % zellhaltiger Fermentationsbrühe zum Entfernen von Zellmaterial aus dem Reaktor (Richter et al. 2016).

### 3.3. Bioprozesstechnik

Die Evaluierung der in dieser Arbeit durchgeführten Bioprozesse erfolgt mit Hilfe von bioprozesstechnischen Grundlagen. Die Kopplung von formalkinetischen Ansätzen mit der Stoffbilanz des Reaktionssystems ermöglicht eine mathematische Beschreibung kontrollierter mikrobieller Prozesse.

#### 3.3.1. Kinetik von Wachstum und Produktbildung

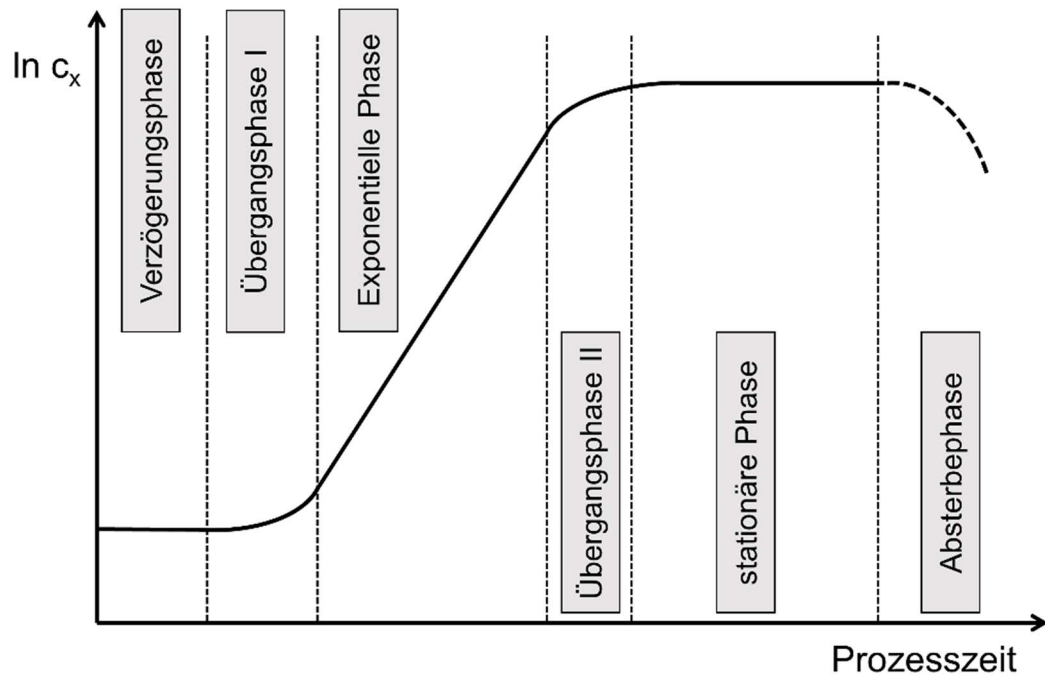
Die in diesem Abschnitt vorgestellten mathematischen Zusammenhänge wurden aus (Weuster-Botz und Takors 2018b) entnommen, sofern nicht anders gekennzeichnet.

Die verschiedenen Phasen mikrobiellen Wachstums während eines Satzprozesses im idealen Rührkesselreaktor sind in Abbildung 3-8 schematisch dargestellt (Monod 1949). Dabei liegen zu Beginn zunächst unlimitierte, aber begrenzte Wachstumsbedingungen vor. Nach dem Überführen von Zellen in frisches Medium findet in der Verzögerungsphase (1) zunächst eine Anpassung an die neuen Umweltbedingungen statt. Währenddessen wird noch keine neue Biomasse gebildet, sodass eine konstante Biotrockenmassekonzentration vorliegt. In der Übergangsphase I (2) setzt das Wachstum ein und die Wachstumsrate  $\mu$  ist während der exponentiellen Wachstumsphase (3) maximal. Eine Reduzierung der Wachstumsrate  $\mu$  erfolgt in der Übergangsphase II oder auch Limitierungsphase (4). Ausschlaggebende Faktoren für die Limitierung können der Verbrauch des Substrates, die Akkumulation toxischer Produkte oder das Erreichen einer kritischen Zellkonzentration sein. In der folgenden stationären Phase (5) ist die Biomassekonzentration konstant, da die Wachstums- und Sterberaten ausgeglichen sind. Die Sterberate überwiegt in der anschließenden Absterbephase (6), während der die Konzentration der Biomasse abnimmt.

Die einfache kinetische Beschreibung des Wachstums ist anhand eines unstrukturierten und unsegregierten Modells möglich. Die Zellen werden dabei als Einheiten ohne Unterteilung mit identischen Eigenschaften betrachtet. Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  ist in Gleichung 3.26 definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (3.26)$$

$\mu$	Spezifische Wachstumsrate,	$\text{h}^{-1}$
$c_x$	Biotrockenmassekonzentration,	$\text{g L}^{-1}$
$t$	Prozesszeit,	$\text{h}$



**Abbildung 3-8** Phasen mikrobiellen Wachstums während eines Satzprozesses. Schematische Darstellung des Verlaufs der logarithmisch aufgetragenen Biomassekonzentration über die Zeit.

Während der exponentiellen Wachstumsphase kann  $\mu$  als konstant angenommen werden ( $\mu = \mu_{\max}$ ) und die Beschreibung der exponentiellen Wachstumskinetik ist durch Integration von Gl. 3.26 über die Prozesszeit möglich:

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad (3.27)$$

$c_{x,0}$             initiale Biotrockenmassekonzentration,             $\text{g L}^{-1}$

$\mu_{\max}$             maximale, zellspezifische Wachstumsrate,             $\text{h}^{-1}$

Besteht unter sonst definierten Bedingungen eine substratabhängige Limitierung durch begrenzte Verfügbarkeit lediglich eines Substrats – üblicherweise der Kohlenstoffquelle –, lässt sich die Wachstumskinetik als Sättigungskinetik beschreiben (Monod 1949). Dieser formalkinetische Ansatz gibt dabei die zellspezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit einer limitierenden Substratkonzentration  $c_s$  in Form einer Sättigungsfunktion wieder (Gl. 3.28). Die Sättigungskonstante  $K_s$  zeigt dabei den Wert auf, bei dem die spezifische Wachstumsrate halbmaximal ist. Liegt die Konzentration des limitierenden Substrats deutlich über  $K_s$ , nähert sich die Wachstumsrate der maximalen zellspezifischen Wachstumsrate an. Steigt die Substratkonzentration so weit an, dass eine Inhibierung eintreten kann, kann der formalkinetische Ansatz um eine Inhibierungskonstante  $K_i$  erweitert werden (Gl. 3.29) (Andrews 1968).

Das Wachstum von Mikroorganismen kann neben hohen Konzentrationen des limitierenden Substrats auch durch wachstumsassoziierte (Neben)-Produkte inhibiert werden. Dies lässt sich durch einen allgemeingültigen Exponentialansatz beschreiben, wobei die Wachstumsrate in Abhängigkeit einer maximalen Produktkonzentration dargestellt wird, bei der die Wachstumsrate gerade Null wird (Gl. 3.30). Der Exponent gibt dabei an, ob die Wachstumsrate bei hohen Produktkonzentrationen ( $n > 1$ ) oder bereits bei niedrigen Produktkonzentrationen ( $n < 1$ ) gegen Null geht.

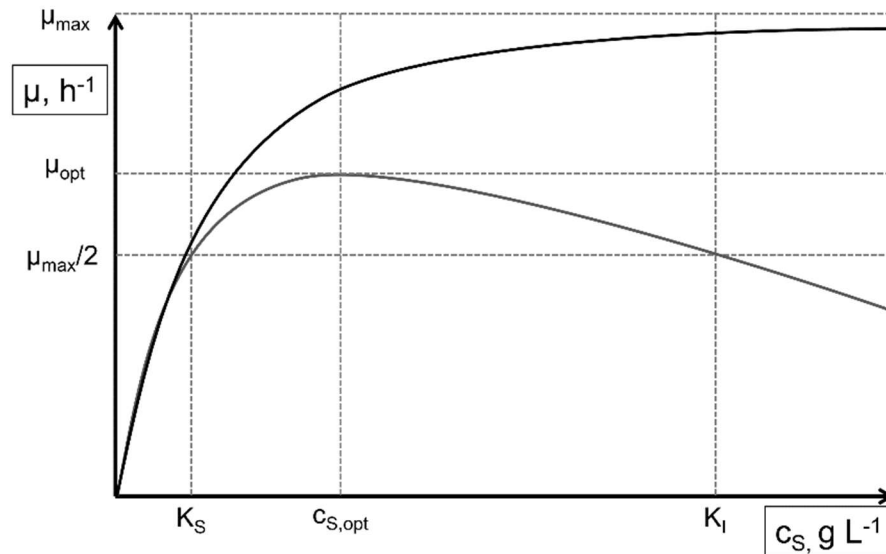
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.28)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad (3.29)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)^n \quad (3.30)$$

$\mu_{\max}$	maximale, zellspezifische Wachstumsrate,	$h^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration,	$g \ L^{-1}$
$K_S$	Sättigungskonstante,	$g \ L^{-1}$
$K_I$	Inhibierungskonstante,	$g \ L^{-1}$
$c_P$	Produktkonzentration,	$g \ L^{-1}$
$c_{P,\max}$	Maximale Produktkonzentration,	$g \ L^{-1}$
$n$	Exponent	

Die beiden formalkinetischen Ansätze von Monod und Andrews sind in Abbildung 3-9 veranschaulicht. Für den Fall, dass dem Mikroorganismus genügend Substrat zur Verfügung gestellt wird, erreicht die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  nach Monod den maximalen Wert und ist konstant.



**Abbildung 3-9** Darstellung der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  durch die formalkinetischen Modelle der Sättigungskinetik nach Monod (schwarz) und Substratüberschussinhibierung nach Andrews (grau).  $c_S$ : limitierende Substratkonzentration  $\mu_{\max}$ ; maximale Wachstumsrate;  $K_S$ : Halbsättigungskonstante;  $K_I$ : Inhibierungskonstante. Abb. nach Weuster-Botz und Takors (2018b).

Analog dazu können die volumetrische ( $r$ ) und zellspezifische ( $q$ ) Aufnahme- oder Bildungsrate aller anderen Komponenten  $i$  anhand ihrer Konzentrationsänderung in Abhängigkeit der Prozesszeit formuliert werden (Gl 3.31 und Gl 3.32):

$$r_i = \frac{dc_i}{dt} = c_x \cdot q_i \quad (3.31)$$

$$q_i \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_i}{dt} = \frac{1}{c_x} \cdot r_i \quad (3.32)$$

$r_i$	volumetrische Rate der Komponente $i$ ,	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_i$	biomassespezifische Rate der Komponente $i$ ,	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$c_i$	Konzentration der Komponente $i$ ,	$\text{g L}^{-1}$

Über den Ausbeutekoeffizient  $Y_{i,j}$  kann der Vergleich von zwei Raten erfolgen (Gl. 3.33):

$$Y_{i,j} \equiv \frac{dc_i}{dc_j} = \frac{r_i}{r_j} = \frac{q_i}{q_j} \quad (3.33)$$

$Y_{i,j}$	Ausbeutekoeffizient von $i$ pro $j$ ,	-
-----------	---------------------------------------	---

### 3.3.2. Stoffbilanz im idealen Rührkesselreaktor

Der Rührkesselreaktor ist im Labor der Standardbioreaktor, da dieser der Erhaltung von räumlich konstanten Reaktionsbedingungen dient. Dies wird durch eine ausreichende Homogenisierung des Reaktionsvolumens, Suspendierung der eingebrachten Feststoffe und Dispergierung der Gasphase gewährleistet. Weiterhin ermöglicht der Rührkesselreaktor einen kontrollierten Energie- und Stoffaustausch sowie ein weitestgehend steriles Arbeiten. Hierdurch ist es möglich, die Auswirkungen von einzelnen Variablen auf Produktbildung und Wachstum von Mikroorganismen zu untersuchen. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die in diesem Abschnitt vorgestellten mathematischen Zusammenhänge aus (Weuster-Botz und Takors 2018a) entnommen.

Die Massenbilanz eines isotropen, isothermen und isobaren idealen Rührkesselreaktors bei kontinuierlichem Betrieb ist Gl. 3.34 zu entnehmen:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i \cdot V)}{dt} = F_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - F_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + r_i \cdot V \quad (3.34)$$

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

Grundsätzlich kann zwischen drei Methoden der Prozessführung in Rührkesselreaktoren unterschieden werden. Hierbei sind der Satzprozess, das Zulaufverfahren und der kontinuierliche Betrieb zu nennen. Anhand des Prozessmodells lässt sich die Massenbilanz entsprechend der verwendeten Betriebsweise darstellen.

### Stoffbilanz im Satzprozess

Bei einem Satzprozess erfolgt die Kultivierung in einem geschlossenen System ohne Zu- und Abläufe, wobei alle Reaktionskomponenten bereits zu Beginn im idealen Rührkesselreaktor vorliegt werden. Die Versorgung der Organismen mit Gasen durch eine kontinuierliche Begasung sowie die Zugabe von Titrationsmittel zur Regelung des pH sind davon ausgenommen. Dadurch reduziert sich die allgemeine Stoffbilanz für den diskontinuierlichen Satzprozess auf Gl. 3.35:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.35)$$

### Stoffbilanz im kontinuierlichen Prozess

Bei einem kontinuierlichen Prozess handelt es sich um ein offenes System, welches mittels eines kontinuierlichen Zulauf- und Ablaufstroms realisiert wird. Durch den andauernden Zulauf von frischem Medium werden deutlich längere Prozesslaufzeiten erreicht. Da der Zu- und Ablaufvolumenstrom oft identisch gewählt wird ( $F_{\text{ein}} = F_{\text{aus}} = F$ ), bleibt das Reaktorvolumen über die Prozesszeit konstant. Dadurch wird nach einer gewissen Prozesszeit ein Fließgleichgewicht erreicht, bei dem keine zeitlichen Änderungen der Komponentenkonzentrationen sowie der Stoffflüsse mehr auftreten. Die Massenbilanz kann somit nach Gl. 3.36 vereinfacht werden:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{\text{ein}}}{V_R} \cdot (c_{i,\text{ein}} - c_i) + r_i \quad (3.36)$$

$F_{\text{ein}}$	Zulaufvolumenstrom,	L h <sup>-1</sup>
$V_R$	Reaktionsvolumen,	L

Für einen konstanten und volumenbeständigen Zu- und Ablaufstrom kann die Verdünnungsrate  $D$  definiert werden, wobei ihr Kehrwert als die mittlere hydraulische Verweilzeit  $\tau$  beschrieben wird:

$$D = \frac{F_{\text{ein}}}{V_R} = \frac{1}{\tau} \quad (3.37)$$

$D$	Verdünnungsrate (Durchflussrate),	h <sup>-1</sup>
$\tau$	Mittlere hydraulische Verweilzeit,	h

Die stationäre Massenbilanz stellt sich mit der Verdünnungsrate  $D$  als Gl. 3.38 dar. Die Raum-Zeit-Ausbeute entspricht hierbei der volumetrischen Produktbildungsrate der Komponente  $i$  und ergibt sich aus dem Produkt aus Durchflussrate und Produktkonzentration (Gl. 3.39).

$$r_i = D \cdot (c_{i,\text{aus}} - c_{i,\text{ein}}) \quad (3.38)$$

$$r_p \equiv \text{RZA}_p = D \cdot c_p \quad (3.39)$$

Bei der Zufuhr eines sterilen Mediums ( $c_{x,\text{ein}} = 0 \text{ g L}^{-1}$ ) sowie unter Verwendung von Gl. 3.26, bestimmt die Verdünnungsrate  $D$  die Wachstumsrate im Fließgleichgewicht ( $D = \mu$ ).

$$0 = -D \cdot c_x + \mu \cdot c_x \quad (3.40)$$

Das bedeutet, dass sich über die Verdünnungsrate die Wachstumsrate im Reaktionssystem einstellen lässt. Für  $D < \mu$  wird ein stabiler Zustand erreicht, wohingegen eine Verdünnungsrate  $D > \mu$  zu einem Auswaschen der Zellen führt, da die Neubildung der Zellen langsamer als der Abzug der Zellsuspension ist.

### Verweilzeitverhalten

In kontinuierlichen Prozessen kann ein zugeführtes Volumenelement unterschiedlich lange im Bioreaktor verbleiben. Diese unterschiedlichen hydraulischen Verweilzeiten führen zu einer Verweilzeitverteilung, die die Wahrscheinlichkeit beschreibt, dass ein Anteil einer Stoffmenge, welche zum Zeitpunkt  $t_0$  in den Reaktor eingetreten ist, diesen zum Zeitpunkt  $t$  wieder verlässt. Dieses Verhalten kann in Markierungsstudien zum einen über die Aufgabe einer Stoßmarkierung (Dirac-Impuls) und zum anderen über eine Aufgabe der Markierung als Sprungfunktion in einem kontinuierlich betriebenen Reaktor untersucht werden. Bei einem Dirac-Impuls wird eine definierte Menge an Markersubstanzen wie beispielweise Elektrolyte oder Farbindikatoren aufgegeben und am Ausgang des Reaktors über Leitfähigkeitsmessung oder optische Analyse gemessen werden. Das Signal ergibt die Verweilzeitdichtefunktion  $E(t)$  (Gl. 3.41) (Müller-Erlwein 2015):

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^{\infty} c(t) \cdot dt} \quad (3.41)$$

$E(t)$       Verweilzeitverteilung

$c$               Konzentration am Reaktorausgang nach einer Zeit  $t$        $\text{g L}^{-1}$



Bei einem konstanten Reaktionsvolumen ergibt sich die Verweilzeitdichtefunktion in einem kontinuierlich betriebenen, idealen Rührkesselreaktor zu Gl. 3.42 (Müller-Erlwein 2015):

$$E(t) = \frac{1}{\tau} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.42)$$

Bei einer Stufenmarkierung erfolgt eine kontinuierliche Zugabe der Markersubstanz ab dem Zeitpunkt  $t_0$ . Durch Integration von  $E(t)$  entsteht die Verweilzeitsummenfunktion  $F(t)$  nach Gl. 3.43 (Weuster-Botz und Takors 2018a):

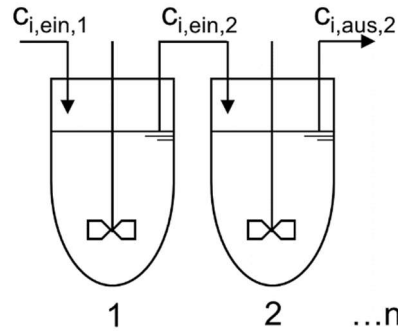
$$F(t) = \int_0^{\infty} E(t) \cdot dt = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.43)$$

$F(t)$  Verweilzeitsummenfunktion

Erst wenn ein vollständiger Austausch des Reaktorvolumen erfolgt ist ( $F(t) = 1$ ), bestehen die hydraulischen Voraussetzungen für die Ausbildung eines Fließgleichgewichtes. Durch den Zusammenhang der mittleren hydraulischen Verweilzeit  $\tau$  von  $F(t)$  in Gl. 3.42 ergibt sich für  $F(t) > 0,99$  die Bedingung, dass mindestens 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten  $\tau$  vergehen müssten, ehe ein Fließgleichgewicht erreicht werden kann (Müller-Erlwein 2015).

### Stoffbilanz in einer idealen Rührkesselreaktorkaskade

Werden mehrere Rührkesselreaktoren durch Hintereinanderschaltung verbunden, entsteht eine sogenannte Rührkesselkaskade. Dies ermöglicht eine Aufteilung des Gesamtvolumens auf mehrere Bioreaktoren, in denen gegebenenfalls unterschiedliche Bedingungen vorherrschen können, wodurch sich Vorteile gegenüber eines einzelnen Rührkesselreaktoren ergeben. Eine schematische Darstellung einer Kaskade, die nur kontinuierlich betrieben werden kann, ist in Abb. 3-10 dargestellt. Um die Ablaufkonzentrationen aller Kessel einer Reaktorkaskade ermitteln zu können, muss Gl. 3.36 mehrfach angewandt werden. Für den ersten Reaktor folgt die Ablaufkonzentration  $c_{i,aus,1}$  aus dem Eingangsverlauf  $c_{i,ein,1}$  (Gl. 3.44). Die Ausgangskonzentration  $c_{i,aus,2}$  des zweiten Reaktors lässt sich wiederum aus der Ablaufkonzentration  $c_{i,aus,1}$ , welche somit der Eingangskonzentration  $c_{i,ein,2}$  entspricht, bestimmen (Gl.3.45) (Müller-Erlwein 2015).



**Abbildung 3-10** Schematische Darstellung einer Rührkesselkaskade bestehend aus zwei hintereinander geschalteten Rührkesselreaktoren

Stoffbilanz Reaktor 1:

$$\frac{dc_{i,1}}{dt} = \frac{F_{\text{ein},1}}{V_{R1}} \cdot (c_{i,\text{ein},1} - c_{i,1}) + r_{i,1} \quad (3.44)$$

Stoffbilanz Reaktor 2:

$$\frac{dc_{i,2}}{dt} = \frac{F_{\text{ein},2}}{V_{R2}} \cdot (c_{i,\text{ein},2} - c_{i,2}) + r_{i,2} \quad (3.45)$$

Bei identischem Volumen folgt:

$$\frac{dc_{i,2}}{dt} = \frac{F_{\text{ein}}}{V_R} \cdot (c_{i,1} - c_{i,2}) + r_{i,2} \quad (3.46)$$

### Verweilzeitverhalten

Die Bestimmung der Verweilzeitsummenfunktion für den ersten Rührkesselreaktor entspricht der Verweilzeitsummenfunktion eines einzelnen Reaktors und entspricht damit Gl. 3.43 (Gl. 3.47). Die Verweilzeitsummenfunktion für den zweiten Reaktor ergibt sich bei einem identischen Reaktionsvolumen und gleicher mittlerer hydraulischer Verweilzeit zu Gl. 3.48:

$$F(t)_1 = \frac{c_1(t)}{c_0} = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.47)$$

$$F(t)_2 = \frac{c_2(t)}{c_0} = \left[ 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \left( 1 + \frac{t}{\tau} \right) \right] \quad (3.48)$$

Im Fall einer Kaskade mit zwei hintereinander geschalteten, idealen Rührkesselreaktoren ergibt sich für  $F(t) > 0,99$  die Bedingung, dass in etwa 7 mittlere hydraulische Verweilzeiten ( $\tau$ ) vergehen müssten, ehe ein Fließgleichgewicht erreicht werden kann (Müller-Erlwein 2015).

Bei einer beliebigen Anzahl aus  $K$  idealen und gleichgroßen Kesseln erhält man die Verweilzeitsummenfunktion einer idealen Kaskade aus dem Verhältnis der Eingangskonzentration am ersten Reaktor und der Ausgangskonzentration der Markersubstanz am Ausgang des letzten Reaktors (Gl. 3.49):

$$F(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \cdot \sum_{\kappa=0}^{K-1} \frac{1}{\kappa!} \cdot \left(\frac{t}{\tau}\right)^{\kappa} \quad (3.49)$$

$K$  Anzahl gleichgroßer Kessel

$\kappa$  Nummer der insgesamt  $K$  Kessel

Die Gesamtverweilzeit steigt mit Anzahl der Reaktoren in der Rührkesselkaskade. Das Verweilzeitverhalten nähert sich dabei einem idealen Strömungsrohr an (Baerns et al. 2013).

Die Verweilzeitdichtefunktion einer idealen Kaskade aus  $K$  gleichgroßen Kesseln mit identischem Volumen erhält man aus Differenziation der Verweilzeitsummenfunktion (Gl. 3.50):

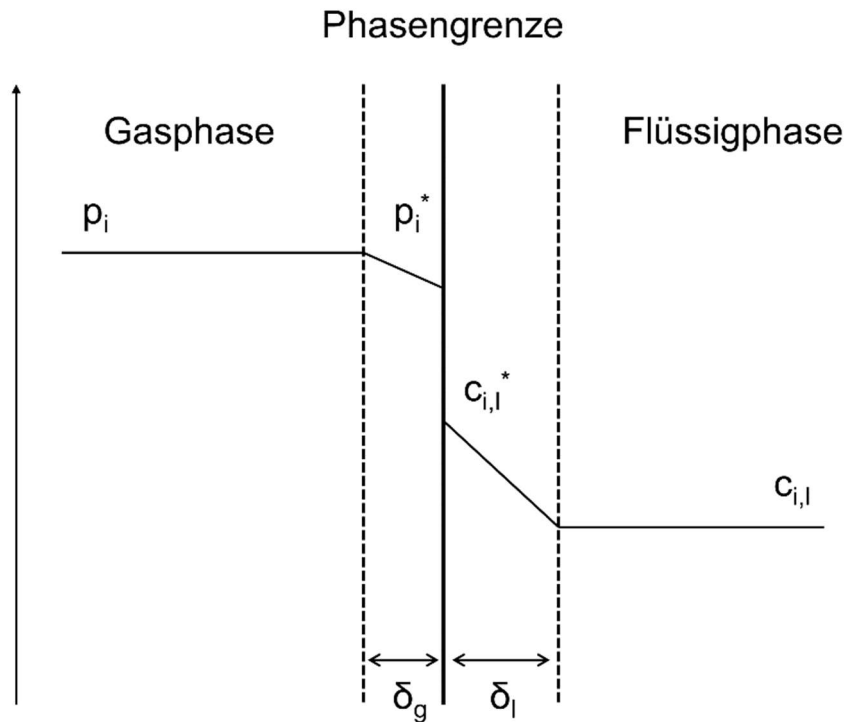
$$E(t) = \frac{1}{\tau (K-1)!} \cdot \left(\frac{t}{\tau}\right)^{K-1} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.50)$$

### 3.3.3. Gas-Flüssig Massentransfer im idealen Rührkesselreaktor

Da bei autotrophen Prozessen das Substrat den Mikroorganismen gasförmig über das Flüssigmedium bereitgestellt wird, spielt der Stofftransport von Gaskomponenten in der Wasserphase eine entscheidende Rolle. Zum einen spielt hierbei die Löslichkeit der Gase CO und H<sub>2</sub> in Wasser eine wichtige Rolle, da diese mit 22,7 mg L<sup>-1</sup> CO beziehungsweise 1,5 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub> bei 37 °C und Atmosphärendruck im Vergleich zu der Löslichkeit von O<sub>2</sub> im Wasser um 66 % für CO respektive 4 % für H<sub>2</sub> geringer ausfällt und somit eine Limitierung darstellt (Bredwell et al. 1999; Perry et al. 1997). Dadurch ist eine kontinuierliche Bereitstellung dieser Gase notwendig. Die physikalische Löslichkeit von CO<sub>2</sub> liegt mit 1,1 g L<sup>-1</sup> bei 37 °C höher, wobei die chemische Löslichkeit von CO<sub>2</sub> noch deutlich höher liegt. Je nach pH des Flüssigmediums stellt sich ein Gleichgewicht mit den gelösten Spezies Hydrogencarbonat HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und Carbonat CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ein und steht somit ausreichend zur Verfügung.

Die beiden Gase CO und H<sub>2</sub> müssen bis zum Ort der Gasreaktion einige Transportwiderstände überwinden, wobei der Übergang an der Phasengrenzfläche gas-flüssig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Zlokarnik 1999; Munasinghe und Khanal 2010). Zur näherungsweisen Erläuterung wurden in den letzten Jahrzehnten einige Modellvorstellungen wie das Zweifilmmodell, das Penetrationsmodell und die Theorie der Oberflächenerneuerung entwickelt, wobei das Zweifilmmodell zur Beschreibung des Gaseintrags am geläufigsten ist. Der Transfer von Gasmolekülen geht wie folgt von stat-ten: Zunächst erfolgt die Diffusion der Gasmoleküle vom Kern der Gasblase zur gas-flüssig Phasengrenze, wo anschließend ein Stoffübergang durch die Phasengrenze gefolgt von der Diffusion durch den Flüssigkeitsfilm um Gasblasen in die laminare Grenzschicht erfolgt. Durch konvektiven Transport in der flüssigen Kernströmung wird das gelöste Gas an die flüssig-feste Phasengrenze transportiert, wobei das Gasmolekül mittels Diffusion durch den laminaren Flüssigkeitsfilm um einzelne Zellen zugeführt wird. Abschließend erfolgt eine Diffusion durch die Zellmembran und ein Transfer in das Zellinnere, wo das Gasmolekül dann als Substrat zur Verfügung steht.

An den Phasengrenzen wird thermodynamisches Gleichgewicht angenommen, welches sich mit dem Henry-Gesetz beschreiben lässt. Ebenso wird für die Phasenkerne eine konstante Konzentration respektive ideale Durchmischung angenommen. Abbildung 3-11 zeigt eine detailliertere Ansicht des Zweifilmmodells mit zugehörigen Konzentrationsprofilen und Partialdrücken.



**Abbildung 3-11** Darstellung des Zweifilmmodells mit der Gelöstkonzentration  $c_i$  in der Flüssigphase, dem gaseitigen Partialdruck  $p_i$  und dem Partialdruck und der Konzentration der Phasengrenzflächen  $p_i^*$  und  $c_{i,l}^*$ . Die Grenzschichtdicke wird hierbei durch  $\delta_g$  und  $\delta_l$  charakterisiert. Abbildung nach Doll (2018).

Es erfolgt so lange eine Diffusion des Gases in die Flüssigphase, bis die Gelöstgaskonzentration der Sättigungskonzentration in der Flüssigphase entspricht. Weiterhin kann die Diffusion durch die gaseitige Grenzschicht vernachlässigt werden, da die Diffusion in der Gasphase erheblich größer ist als in der Flüssigphase. Damit ergibt sich für die Gaseintragsrate in Abhängigkeit der Phasengrenze und des Konzentrationsgefälles (Gl. 3.51) (Doran 2013):

$$\text{MTR} = \frac{dc_{i,g}}{dt} = k_L \cdot \frac{A}{V} \cdot (c_g^* - c_g) \quad (3.51)$$

MTR	Stofftransferrate	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$k_L$	flüssigseitiger Stoffübergangskoeffizient,	$\text{m h}^{-1}$
A	Phasengrenzfläche gas-flüssig,	$\text{m}^2$
V	Flüssigkeitsvolumen,	$\text{m}^3$
$c_g^*$	Sättigungskonzentration in der Flüssigphase,	$\text{mol L}^{-1}$
$c_g$	Gelöstkonzentration in der Kernströmung der Flüssigkeitsphase,	$\text{mol L}^{-1}$

Mit der auf das Flüssigkeitsvolumen bezogenen Austauschfläche  $a$  lässt sich das Verhältnis von  $A$  und  $V$  zusammen mit dem Stoffübergangskoeffizienten  $k_L$  zu dem Stofftransportkoeffizienten  $k_L a$  zusammenfassen. Dadurch können die Gaseintragsraten der verschiedenen Gase  $\text{CO}$  und  $\text{H}_2$  (COTR und HTR) bestimmt werden (Gl 3.52 – 3.53) (Doran 2013):

$$\text{COTR} = \frac{dc_{\text{CO}}}{dt} = k_L a \cdot (c_{\text{CO}}^* - c_{\text{CO}}) \quad (3.52)$$

$$\text{HTR} = \frac{dc_{\text{H}_2}}{dt} = k_L a \cdot (c_{\text{H}_2}^* - c_{\text{H}_2}) \quad (3.53)$$

COTR	CO-Transferrate, (engl. carbon monoxide transfer rate)	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
HTR	$\text{H}_2$ -Transferrate, (engl. hydrogen transfer rate)	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Der gaseitige Gleichgewichtspartialdruck  $p_i^*$  steht im thermodynamischen Gleichgewicht mit der flüssigkeitsseitigen Gleichgewichtskonzentration  $c_i^*$ . Da der Transportwiderstand der gaseitigen Grenzschicht vernachlässigbar ist, kann der Gleichgewichtspartialdruck dem Partialdruck  $p_i$  im Kern der Gasphase gleichgesetzt werden. Dadurch lässt sich die flüssigkeitsseitige  $c_i^*$  anhand des gaseitigen Partialdruck  $p_i$  mit dem Henry'sche Gesetz über den temperaturabhängigen Henry-Koeffizienten  $\text{He}_i$  für die Komponente  $i$  bestimmen (Gl. 3.54).

$$c_i^* = \text{He}_i \cdot p_i \quad (3.54)$$

$\text{He}_i$	Henry'scher Verteilungskoeffizient der Komponente $i$ ,	$\text{mol L}^{-1} \text{bar}^{-1}$
$p_i$	Partialdruck der Gaskomponente $i$ ,	bar

Der Partialdruck einer Komponente  $i$  lässt sich über den Gesamtdruck sowie den Anteil des Gases  $i$  nach dem Gesetz von Dalton für ideale Gase berechnen unter der Bedingung, dass die Summe aller Partialdrücke  $p_i$  gleich dem Gesamtdruck des Gasgemisches ist (Gl. 3.55):

$$p_i = X \cdot p \quad (3.55)$$

p	Gesamtdruck,	bar
X	Molanteil des Gases i,	mol mol <sup>-1</sup>

Der Stoffübergang kann durch einen erhöhten Leistungseintrag durch Rühren verbessert werden. Durch eine möglichst feine Dispergierung der Gase in der Flüssigkeit kann die spezifische Stoffaustauschfläche  $a$  erhöht werden. Da die Aufstiegs geschwindigkeit von kleineren Blasen zusätzlich geringer ist, erhöht sich der sogenannte Gasphasenanteil in der Flüssigphase und somit die mittlere hydraulische Verweilzeit der Gasblasen im Reaktor (Zlokarnik 1999). Eine gute Dispergierung der Gasblasen wird also durch erhöhte Rührerdrehzahlen und damit verbundener turbulenter Strömungsverhältnissen erreicht (Chmiel und Walitza 2018).

### Leistungseintrag

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Leistung in einen Bioreaktor einzutragen. Grundsätzlich wird hierbei zwischen mechanischem, hydraulischem und pneumatischem Leistungseintrag unterschieden. Die durch ein Rührorgan eingetragene Leistung in einem Rührkesselreaktor kann mit Hilfe der dimensionslosen Newton-Kennzahl ( $Ne$ ) beschrieben werden (Chmiel und Weuster-Botz 2018).

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot d^5} \quad (3.55)$$

Ne	Newtonsche Leistungskennzahl,	-
P	Eingetragene mechanische Leistung,	W
$\rho$	Dichte,	kg m <sup>-3</sup>
N	Rührerdrehzahl,	s <sup>-1</sup>
d	Rührerdurchmesser,	m

## 4. Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die in der Arbeit verwendeten Materialien und angewandten Methoden dargestellt. Die Zusammensetzung der Medienzusätze und Puffer sowie die Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Materialien sind im Anhang in Kapitel 12.1 dargelegt. Genauere Spezifikationen verwendeter Geräte sind im Anhang in Kapitel 12.2 zu finden.

### 4.1. Anaerobtechnik

Die Organismen *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* sind strikt anaerobe Bakterien, die sehr sensitiv auf geringen Spuren von Sauerstoff reagieren. Bei der Kultivierung von obligat anaeroben Mikroorganismen ist der Kontakt mit Sauerstoff also zu minimieren (Hungate 1976). Die Arbeit mit geöffneten Reaktionsgefäßen wurde daher in einer Anaerobwerkbank (MB-Labstar ECO, M. Braun Inertgassysteme GmbH, Garching, Deutschland) durchgeführt. Die Anlage ist in Abbildung 4-1 dargestellt.



**Abbildung 4-1** Anaerobwerkbank MB-Labstar ECO (M. Braun Inertgassysteme GmbH) zur Gewährleistung anaerober Arbeitsbedingungen. (A) Große Schleuse; (B) Kleine Schleuse; (C) Drehschiebervakuumpumpe; (D) gasdichter Raum unter kontrollierter Atmosphäre; (E) gasdichte Butylgummihandschuhe; (F) Regelungs- und Überwachungseinheit; (G) Kupferkatalysator mit Molsieb; (H) HEPA H13 Staubfilter



Mittels einer großen (A) und einer kleinen Schleuse (B) konnten Arbeitsmaterialien in die Werkbank eingebracht werden. Hierzu wurde die entsprechende Schleuse mit Hilfe der Drehschiebervakuumpumpe (C) dreifach evakuiert und anschließend wieder mit Stickstoff ( $N_2$ ) geflutet. Eine kontrollierte Atmosphäre im Inneren der Werkbank (D) bestehend aus einer Plexiglas Frontscheibe, druckstabilen Metallplatten sowie gasdichten Butylgummihandschuhen (E) konnte durch eine Regelungs- und Überwachungseinheit gesteuert werden (F). Die Sensorik der Werkbank ermöglichte eine Überwachung der Sauerstoff- und Wasserkonzentration. Aufgebaut war diese aus einem  $O_2$ -Sensor (Elektrochemischer Sensor (0-1000 ppm), M. Braun Inertgassysteme GmbH, Garching, Deutschland) und einem Feuchtesensor (MB-MO-SE1-PLC (0-500 ppm), M. Braun Inertgassysteme GmbH, Garching, Deutschland). Die Atmosphäre ( $N_2 \sim 100\%$ ,  $O_2 < 10$  ppm) wurde durch ein Gasreinigungssystem mit integriertem Kupferkatalysator ( $O_2$ -Absorption) und Molsieb ( $H_2O$ -Absorption) (G) erreicht, wobei Keime und Partikel über einen HEPA H13 Staubfilter (H) beim Gaseingang und -ausgang größtenteils entfernt wurden. Zusätzlich wurde die Werkbank unter einem Überdruck von 3,5 mbar gehalten, um eine Diffusion von Sauerstoff zu minimieren.

Zur Herstellung von anaerobem vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) und anaerober Medien wurden diese nach Ansetzen zunächst für 20 min gekocht (Heizpilz U2, Labexchange) um die Gaslöslichkeit herabzusetzen und somit die Sauerstoffsättigungskonzentration zu reduzieren. Restlicher gelöster Sauerstoff wurde anschließend durch Begasung der Flüssigkeiten mit Stickstoffgas ( $N_2$ ) in einem Eiswasserbad für mindestens 20 min entgast. Die so entgasten Flüssigkeiten wurden in die Anaerobwerkbank eingeschleust und in beschichteten Anaerobflaschen (Duran protect, Duran Group GmbH, Mainz, Germany) aliquotiert, für eine sterile Entnahme mit Butylgummisepten und Lochkappen (Glasgerätebau Ochs, Laborfachhandel e.K., Bovenden/Lenglern, Deutschland) gasdicht verschlossen und bei  $121^\circ C$  für 20 min sterilisiert.

## 4.2. Reaktionsmedien – Zusammensetzung und Herstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Bakterienstämme verwendet. Für die Kultivierung wurde ein modifiziertes Medium nach Hurst und Lewis (Hurst und Lewis 2010) als Grundlage verwendet (s. Tabelle 4-1). Im Weiteren wird die individuelle Medienzusammensetzung für jede Prozessführung für *Clostridium kluyveri* beziehungsweise *Clostridium carboxidivorans* erläutert. Die Hersteller der Chemikalien sowie die korrespondierenden CAS-Nummern sind in Abschnitt 12.2. im Anhang zusammengefasst.

### **Vitaminlösung**

Zur Herstellung der verwendeten Vitaminlösung wurden die im Anhang in Tabelle A. 1 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Hierzu wurden alle verwendeten Vitamine eingewogen, in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst, sterilfiltriert und anschließend aliquotiert. Vitaminlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### **Spurenelementlösung**

Zur Herstellung der verwendeten Spurenelementlösung wurden die im Anhang in Tabelle A. 2 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Zunächst wurde die Nitrilotriessigsäure in VE-Wasser gelöst und der pH mittels NaOH auf pH 5,5 eingestellt. Anschließend wurden alle übrigen Mineralien gelöst, der pH mit NaOH final auf pH 6,0 eingestellt und die Spurenelementlösung bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

### **Mineralienlösung**

Zur Herstellung der verwendeten Mineralienlösung wurden die im Anhang in Tabelle A. 3 aufgelistete Zusammensetzung verwendet. Hierzu wurden alle verwendeten Mineralien eingewogen, in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

### **Stammlösungen**

Zur Stammhaltung, Zellernte sowie zur Durchführung autotropher reaktionstechnischer Charakterisierungsprozesse wurde anaerobe L-Cys-HCl-Stammlösung ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) als Reduktionsmittel, phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline, PBS) sowie Glucose-Stammlösung ( $250 \text{ g L}^{-1}$ ) benötigt. Die Zusammensetzung dieser Lösungen ist im Anhang in den Tabellen A. 4 – A. 6 aufgelistet. Für die Herstellung der anaeroben Stammlösungen wurden die jeweiligen Chemikalien trocken in eine beschichtete Anaerobflasche eingewogen, in die Anaerobwerkbank eingeschleust und in anaerobem VE-Wasser gelöst. Für eine 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. Für die aeroben Magnesium- und Calciumlösungen wurden die entsprechenden Komponenten gemäß der Angaben in den Tabellen A. 7 – A. 8 in VE-Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 4-1** Zusammensetzung des verwendeten modifizierten Hurst-Mediums

Komponente	Menge	Einheit
Calciumlösung (16,65x)	60,0	mL L <sup>-1</sup>
Magnesiumlösung (16,65x)	60,0	mL L <sup>-1</sup>
Mineralienlösung (33,3x)	30,0	mL L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (100x)	10,0	mL L <sup>-1</sup>
Vitaminlösung (100x)	10,0	mL L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	1,00	g L <sup>-1</sup>
L-Cystein-HCl (100x)	0,50	g L <sup>-1</sup>

### Vorkulturmedium

Für das Vorkulturmedium von *C. carboxidivorans* wurden die Medienbestandteile zusammen mit 15 g L<sup>-1</sup> MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) in VE-Wasser gelöst und der pH mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium 20 min lang in Rundkolben auf Heizpilzen gekocht, unter Stickstoffbegasung mit Eiswasserkühlung in Anaerobflaschen anaerobisiert und anschließend gasdicht verschlossen. In der Anaerobwerkbank wurden anschließend das Zielvolumen mit anaerobem VE-Wasser aufgefüllt und das Vorkulturmedium in 250 mL und 500 mL anaerobe Vorkulturflaschen zu je 100 mL aliquotiert.

Für das Vorkulturmedium von *C. kluyveri* wurden die Medienbestandteile zusammen mit 10 g L<sup>-1</sup> Kaliumacetat in VE-Wasser gelöst und der pH mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt. Anschließend wurde das Medium 20 min lang in Rundkolben auf Heizpilzen gekocht, unter Stickstoffbegasung mit Eiswasserkühlung in Anaerobflaschen anaerobisiert und anschließend gasdicht verschlossen. Die Zugabe von 20 mL L<sup>-1</sup> Ethanol und 2,5 g L<sup>-1</sup> Natriumhydrogencarbonat, das Auffüllen auf das Zielvolumen mit anaerobem VE-Wasser und die Aliquotierung zu 100 mL in 500 mL anaerobe Kulturflaschen erfolgte in der Anaerobwerkbank.

Nach dem Autoklavieren beider Vorkulturmedien (121 °C, 20 min) und vor dem Inokulieren wurde L-Cystein-Hydrochlorid als Reduktionsmittel zugefügt.

### Prozessmedium

Das Prozessmedium für Untersuchungen von *C. carboxidivorans* sowie der Ko-Kultur war das Prozessmedium entsprechend Tabelle 4-1 zusammengesetzt. Für die Untersuchung von *C. kluyveri* im Rührkesselreaktor wurde dem Medium zusätzlich 10 g L<sup>-1</sup> Kaliumacetat und 20 mL L<sup>-1</sup> Ethanol zugefügt.

Bei der Herstellung der Medien wurden alle Medienbestandteile außer der Vitamine und L-Cystein Hydrochlorid eingewogen und mit aerobem vollentsalztem Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Dabei wurden die Volumina für die fehlenden Komponenten (Vitamine, L-Cystein Hydrochlorid und Inokulum) berücksichtigt. Bei der Untersuchung von *C. kluyveri* wurde zusätzlich das Volumen für die Zugabe von Ethanol beachtet. Die Medien wurden anschließend autoklaviert. Im Zuge der Vorbereitungen für den Satzbetrieb wurden die fehlenden Komponenten dem Reaktionsmedium steril zugefügt. Die Vorgehensweise ist detailliert in Abschnitt 4.3.4 beschrieben.

### Zulaufmedium

Das Zulaufmedium für die Kaskadenkultivierung in zwei Rührkesselreaktoren in Serie wurde gemäß der Zusammensetzung in Tabelle 4-1 eingewogen. Mit Ausnahme der Vitamine und L-Cystein Hydrochlorid wurden die Medienkomponenten in vollentsalztem Wasser aerob gelöst, das Volumen der fehlenden Komponenten berücksichtigt und in 5 L-Flaschen im Standautoklav sterilisiert. Die Flaschen wurden vorab mit einem speziell angefertigten Deckel versehen, der drei unterschiedliche Zugänge über Schnellverschlusskupplungen hatte: einen Anschluss für die Gaszufuhr, einen Druckausgleich und einen Anschluss für die Zufuhr oder die Entnahme von Flüssigmedium. Silikonschläuche ragten auf der Unterseite der Anschlüsse bis zum Flaschenboden, um das Medium begasen zu können, sowie das Hinauspumpen des Mediums sicherzustellen. Das heiße Medium wurde nach Vollendung der Sterilisation im Wasser-Eis-Bad mit einer Gasmischung aus 80% N<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> für 3 Stunden begast. Anschließend wurden die sterilfiltrierten Vitamine und zusätzlich 1 mL L<sup>-1</sup> Antischaum (Polypropylenglykol, 1:10) über den dritten Anschluss während kontinuierlicher Begasung zugegeben und eine weitere Stunde begast. Das anaerob hergestellte Reduktionsmittel L-Cystein-Hydrochlorid wurde erst nach Ende der Begasung zugeführt.

Das Zulaufmedium für eine Kaskadenkultivierung mit zusätzlicher Schwefelbereitstellung wurde zusätzlich mit 0,13 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S · 9 H<sub>2</sub>O versetzt. Dafür wurde dem Medium zusätzlich nach der Sterilisation und vor der Begasung 0,25 g L<sup>-1</sup> NaOH hinzugefügt, sodass sich ein pH von pH ~6,0 ergab. Die Lagerung der Zulaufmedien erfolgte bei 4 °C.

## 4.3. Kultivierung von Clostridien

### 4.3.1. Stammhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als gefriergetrocknete Pellets erworben. Hierbei handelte es sich um die Stämme *C. carboxidivorans* DSM 15243 und *C. kluyveri* DSM 555, DSM 556, DSM 557, DSM 562, DSM 563 und DSM 564. Diese wurden in den entsprechenden Vorkulturmedien reaktiviert und anschließend in Anaerobflaschen in einem Schüttelinkubator (WiseCube WIS-20R, Firma Witeg) bei 37 °C, einer Exzentrizität von 2,5 cm und 100 min<sup>-1</sup> inkubiert. Nachdem die Zellen der Stämme die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten (*C. carboxidivorans*: 21h; *C. kluyveri*: 110 h) wurden diese in der Anaerobwerkbank mit 10% (v/v) Glycerin versetzt und je 5 mL in Hungate-Röhrchen (Dunn Labortechnik GmbH) aliquotiert. Anschließend erfolgte ein Verschließen der Röhrchen mittels Butylgummistopfen und Lochkappen sowie das Einfrieren bei -80 °C

### 4.3.2. Vorkulturherstellung und Zellernte

Für die heterotrophe Herstellung der Vorkulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurden die jeweiligen Vorkulturmedien (Kapitel 4.2) mit jeweils 2,5 mL der Kryokulturen (Kapitel 4.2.) inokuliert. Hierbei wurden für *C. carboxidivorans* 250 mL respektive 500 mL und für 500 mL Anaerobflaschen verwendet. In beiden Fällen wurde den Medien zuvor 0,5 g L<sup>-1</sup> L-Cystein-HCl zugegeben. Ebenso wurden dem Vorkulturmedium von *C. carboxidivorans* zu diesem Zeitpunkt 5 g L<sup>-1</sup> Glucose beigefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Vorkulturen im Schüttelinkubator (37 °C; 100 min<sup>-1</sup>), bis sich diese in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (*C. carboxidivorans*: 21h; *C. kluyveri*: 110 h). Für die darauffolgende Zellernte wurden die Vorkulturen für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuga, Rotica 50 RS), erneut in die Anaerobwerkbank eingeschleust und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte eine Herstellung des Inokulums mittels Resuspension der Zellpellets in 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Die Inokulation in Anaerobflaschen für Untersuchungen im Parallelansatz beziehungsweise für den Rührkesselreaktor erfolgte sodann mit sterilen Einwegspritzen und -kanülen.

### 4.3.3. Parallelkultivierung in Anaerobflaschen

Die heterotrophe Kultivierung in Anaerobflaschen mit *C. kluyveri* erfolgte jeweils in Anaerobflaschen mit einem Gesamtvolumen von 500 mL und einem Arbeitsvolumen von

100 mL. Das Kulturmedium entsprach dem des Vorkulturmediums für *C. kluyveri*. Die Zusammensetzung und Herstellung des Mediums zur heterotrophen Kultivierung in Anaerobflaschen mit *C. kluyveri* ist in Abschnitt 4.2 beschrieben. Bei einer Untersuchung mit variierender Gaszusammensetzung im Kopfraum wurden die mit Butylgummisepten und Lochkappen verschlossenen Flaschen mit autoklaviertem und anerobem Medium zunächst einige Minuten mit der entsprechenden Gasmischung gespült. Anschließend wurde in dreifacher Ausführung ein Überdruck von 1 bar beaufschlagt und jeweils wieder abgelassen. Es wurde kein Überdruck beibehalten.

Parallelansätze wurden zu einer Biotrockenmassekonzentration von  $0.025 \text{ g L}^{-1}$  mit sterilen Einmalspritzen und -kanülen über das Butylgummiseptum inokuliert. Vor der Inokulation erfolgte die Zugabe des Reduktionsmittel L-Cys-HCl. Die Inkubation erfolgte bei 100 rpm im Schüttelinkubator (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . In regelmäßigen Abständen wurde während der Inkubation mittels Einwegspritzen und -kanülen Proben entnommen, um die Biomasse, die Produktkonzentration und den pH zu bestimmen. Ebenso wurde eine Druckmessung mit einem Manometer vorgenommen.

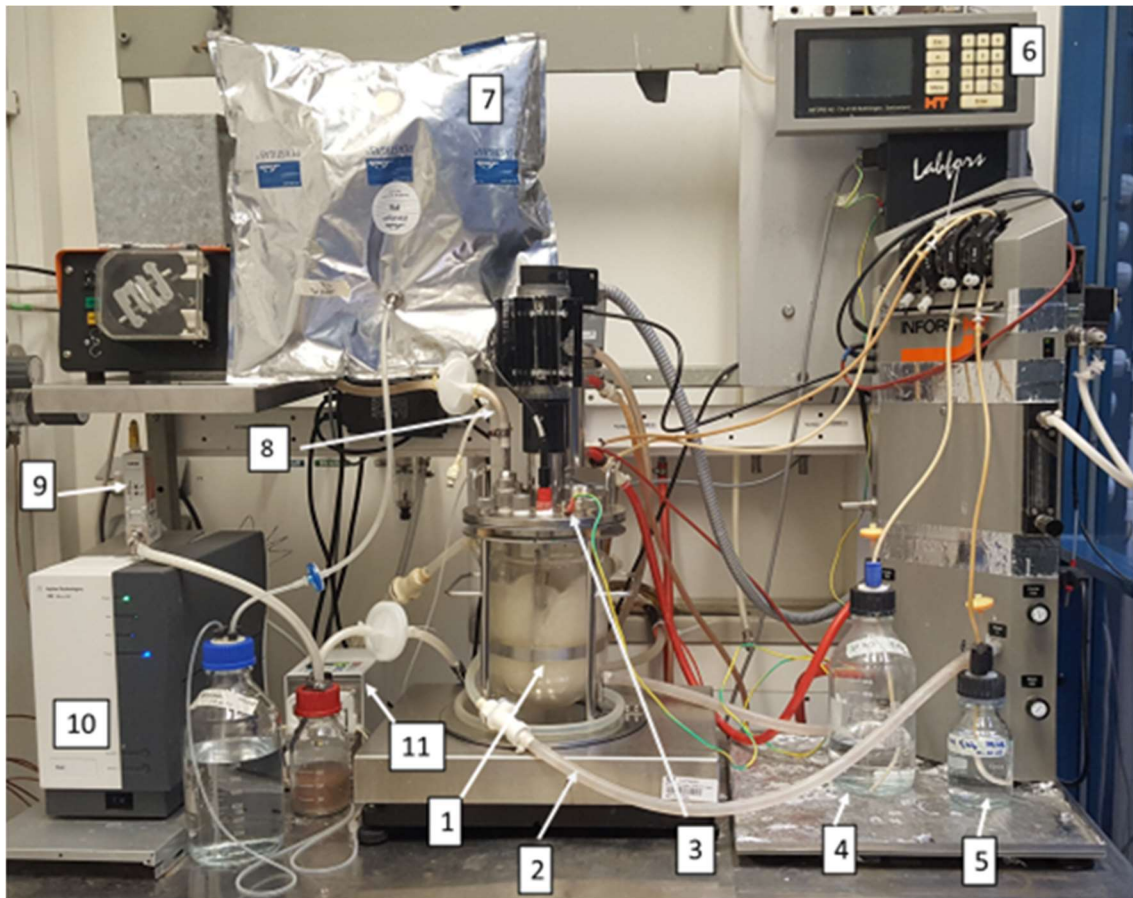
#### 4.3.4. Kultivierung im Rührkesselreaktor

##### Satz- und Zulaufverfahren

Für Satzkultivierungen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor wurde sowohl ein Rührkesselreaktor aus Glas und ein Rührkesselreaktor aus Edelstahl verwendet:

Der verwendete gasdicht verschlossene Laborrührkesselreaktor aus Glas (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) hatte ein Reaktionsvolumen  $V_R$  von 1 L bei einem Nominalvolumen von 2 L. Zur Durchmischung wurden zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen) an der Rührwelle angebracht und bei einer Drehzahl von 1200 rpm ( $\sim 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ) angetrieben. Zur Verbesserung der Strömungseigenschaften kamen zusätzlich drei Strömungsbrecher zum Einsatz. Die Begasung und Gasdispersion erfolgte durch eine Sinterfritte unterhalb der Rührwelle. Die Temperatur und der pH wurden über einen Temperaturfühler und einen wassergespeisten Doppelmantel sowie über eine pH-Sonde (405- DPAS-SC-K8S/120, Mettler-Toledo, Columbus, USA) und gesteuerte Pumpen zur Zugabe der Titrationsmittel geregelt. Die Ansteuerung und Regelung aller Parameter des Reaktors sowie die Aufzeichnung aller Daten über die Steuereinheit fand mit der Software Iris V5 Pro Balance (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) statt. Die Einstellung beliebiger Gaszusammensetzung aus  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{CO}$  war über vier unabhängige Massendurchflussregler (F-201CV- 500\_RGD-33-V, Bronkhorst High-Tech

B.V., Ruurlo, Niederlande) möglich. Bei der Verwendung variabler Partialdrücke funktionierte N<sub>2</sub> als Füllgas, wobei stets bei Umgebungsdruck gearbeitet wurde. Verdunstungseffekte wurden durch einen Umlaufkühler an der Abgasstrecke geringgehalten.



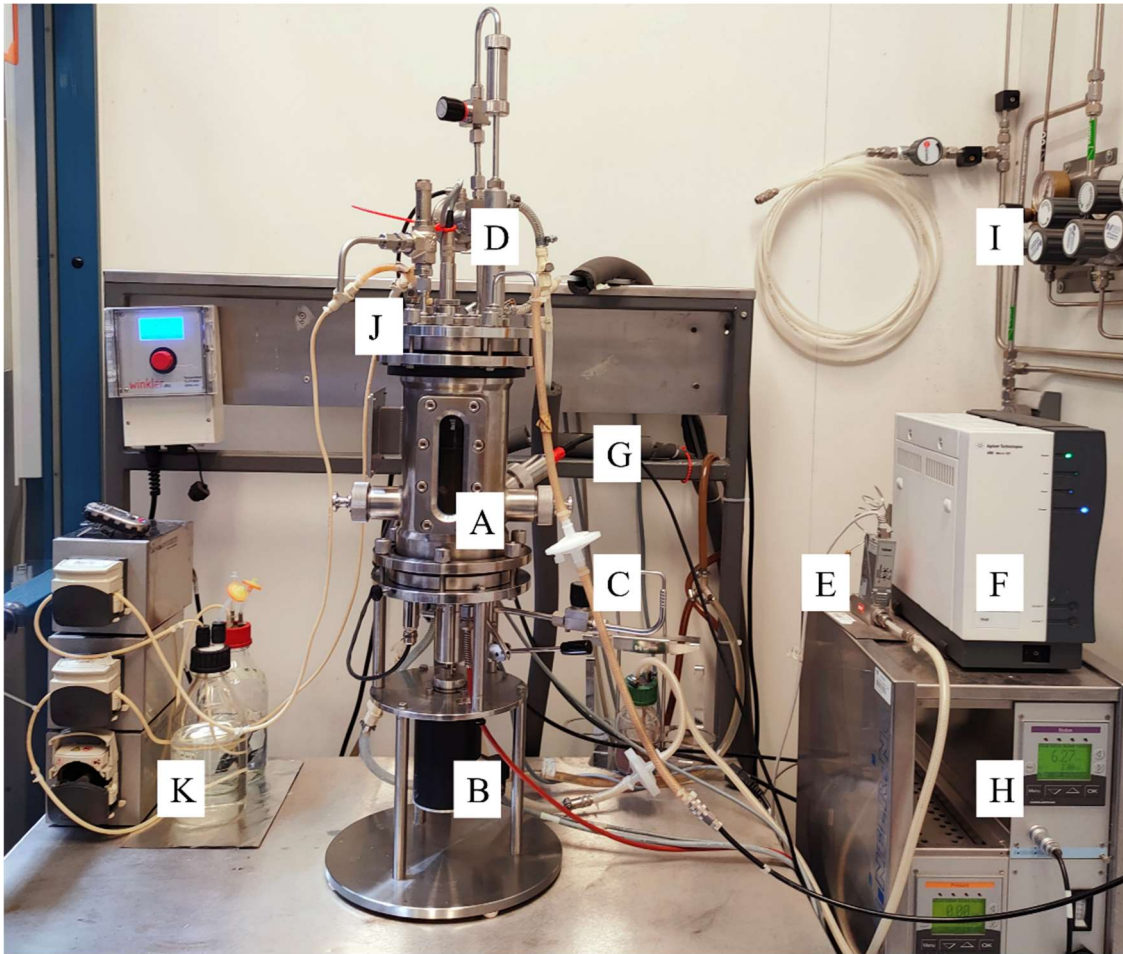
**Abbildung 4-2** Prozessaufbau eines kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor: 1) Laborrührkesselreaktor aus Glas mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern, Strömungsbrechern, Begasungsfritte zur kontinuierlichen Gaszufuhr, Rückflusskondensator, Temperatur- und pH-Sonde, 2) Wasserzufuhr zum Doppelmantel, 3) Erdung, 4) Base, 5) Säure, 6) Steuereinheit mit Titrationsmittelpumpen, 7) Druckausgleichsgefäß, 8) Gaszufuhr, 9) Massendurchflussmesser, 10)  $\mu$ -Gaschromatograph, 11) Pumpe

Der Abgasvolumenstrom wurde nach der Passage eines Trockenmittels (MultiDry, Thomar OHG, Lüttau, Deutschland) und eines Sterilfilters (Acro50, Pall Corporation, Port Washington, USA) anschließend über einen Massendurchflussmesser (F-111B-1K0-RGD-33-E, Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) geleitet. Zusammen mit einem Micro-Gaschromatographen (490 Micro GC, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Deutschland) fand eine Analyse der Abgaszusammensetzung statt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

Der zweite verwendete Kleinlaborfermenter bestand aus einem zylinderförmigen Kessel aus rostfreiem Edelstahl mit einem Gesamtvolumen von 3,7 L und einem Arbeitsvolumen im Reaktor von 2,0 L (KLF, Bioengineering AG, Wald, Schweiz). Der Gaseintrag erfolgte am Reaktordeckel über ein Gasleitrohr und wurde über eine Sintermetallfritte im unteren Bereich des Bioreaktors dispergiert. Zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer (Rushton-Turbinen) parallel auf der Rührwelle montiert und wurden zur Homogenisierung und zur Gasdispersion bei Drehzahlen von 1200 rpm ( $\sim 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ) verwendet. Zur Verbesserung der Durchmischung und Vermeidung von Thrombenbildung wurden vier Strömungsbrecher normal zueinander an der Reaktorwand eingesetzt. Der pH wurde mittels einer pH-Sonde (405- DPAS-SC-K8S/120, Mettler-Toledo, Columbus, USA) über einen Seitenstutzen gemessen. Die Temperaturregelung erfolgte über einen PID-Regler (engl. Proportional–Integral–Differential) über drei voneinander räumlich getrennte Einheiten: der Temperaturmesssonde als Messeinheit (Pt100, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) und zwei Regeleinheiten, einem Heizstab (800 W) und einem Kühlstab (Leitungswasser). Die Prozesskontrolle zur Regelung aller Prozessgrößen (Temperatur T, pH, Rührerdrehzahl N, Gesamtdruck P) wurde über eine Steuereinheit mit der Software BioSCADaLab (Version 7.2, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) durchgeführt. Die Gaszufuhr erfolgte über vier unabhängige Massendurchflussregler (F-201CV-500-RGD-33-V, Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande), welche eine Einstellung der gewünschten Gaszusammensetzung, bestehend aus den Reinstgasen CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> (Air liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland), ermöglichten und über einen Zuluftfilter (Acro 50 Filter, EMFLON II, 0,2 µm, PALL corporation, Port Washington, USA) mit Gasflussraten bis zu 10 L h<sup>-1</sup> in den Bioreaktor leiteten. Die Partialdrücke wurden dabei mit dem Inertgas N<sub>2</sub> in Bezug auf den Gesamtdruck eingestellt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

Die Rührkesselreaktoren und das Reaktionsmedium wurden separat autoklaviert wobei der Glasfermenter *ex situ* und der Edelstahlfermenter *in situ* sterilisiert werden konnten (121 °C, 20 min). Nach Abkühlung wurde das Reaktionsmedium mit Hilfe einer Peristaltikpumpe steril in den Reaktor gepumpt und die Vitaminlösung über einen Sterilfilter zugegeben. Zusätzlich wurden 100 µL L<sup>-1</sup> Antischaummittel Polypropylenglycol (PPG, 1:10) zugeführt. Zur Sicherstellung anaerober Bedingungen sowie zur Ausbildung des gas-flüssig-Gleichgewichtes wurde der Rührkesselreaktor bei einer Rührerdrehzahl von 200 rpm für mindestens 12 h mit der gewünschten Gaszusammensetzung und dem zu untersuchenden Gasvolumenstrom begast. Der pH wurde über die pH-Regelung der Reaktorsysteme durch Titration mit NaOH (3 M) und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) final eingestellt.





**Abbildung 4-3** Prozessaufbau des kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor (KLF 3,7 L, Bioengineering AG): A) Edelstahl-Reaktorkörper, B) Elektromotor, C) Zuluftstrecke, D) Abgasstrecke mit Abgaskühler, E) Massendurchflussmesser, F)  $\mu$ -Gaschromatographie-Einheit, G) pH-Elektrode, H) Mess- und Regeleinheit, I) Station zur Einstellung der Vordrücke der einzelnen Gase in der Gaszuführung, J) Säure- und Basezufuhr, K) Titrationsmittel.

Direkt vor der Inokulation der Reaktoren wurden  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  des Reduktionsmittels L-Cys-HCl als sterile anaerobe Stammlösung über das Septum im Reaktordeckel zugegeben. Die regelmäßige Probenahme erfolgte mittels steriler Einmalspritzen und -kanülen über ein Silikonseptum im Reaktordeckel bei dem Glasrührkesselreaktor und über Seitenstutzen bei dem Edelstahlrührkesselreaktor. Die Reaktoren wurde mit der konzentrierten Zellsuspension aus der Vorkultur (siehe Abschnitt 4.3.2) zu einer Biotrockenmassekonzentration von  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  pro Stamm inokuliert, wodurch sich eine Biotrockenmassekonzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  für eine Ko-Kultur ergab.

Die kontinuierliche Bereitstellung von Schwefel wurde in einem Zulaufverfahren untersucht. Die Zufuhr der  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$  Stammlösung ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) erfolgte über Anschlüsse in den Reaktordeckeln mit Hilfe von Peristaltikpumpen (Ismatec, Cole Parmer, Wertheim)

bei einer Flussrate von  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Der Druckausgleich erfolgte mittels Stickstoffreservoir (Plastigas, Carl Rothe). Der Aufbau ist ebenfalls Abbildung 4-2 zu entnehmen.

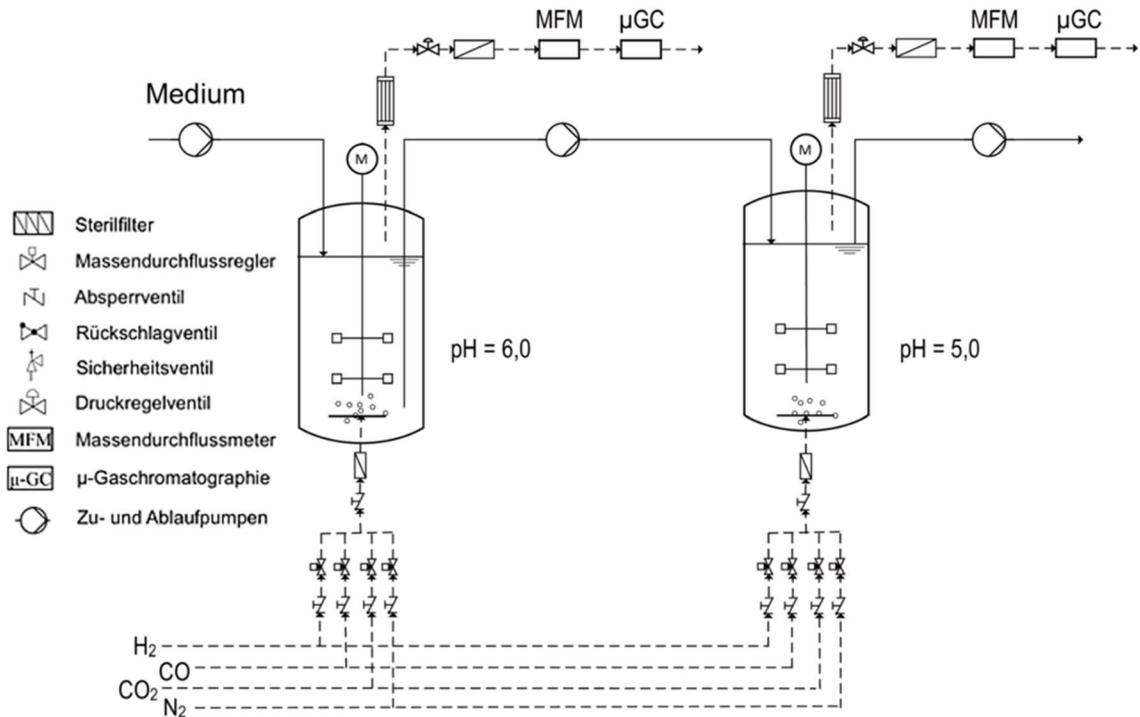
#### 4.3.5. Kaskadenkultivierung im Rührkesselreaktor

Für die kontinuierliche Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer Rührkesselkaskade bestehend aus zwei aufeinander folgenden Reaktoren wurde als erster Reaktor der in 4.3.3 beschriebene Glasrührkesselreaktor (Labfors, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) mit einem Totalvolumen von 2,0 L bei einem Arbeitsvolumen von 1,0 L verwendet. Als zweiter Reaktor diente der für Satzkultivierungen verwendete und ebenfalls in Abschnitt 4.3.4 bereits beschriebene Edelstahlreaktor (KLF) mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L.

Beide Rührkesselreaktoren wurden wie in Abschnitt 4.3.4 bereits beschrieben vorbereitet. Die eingesetzte Gasmischung bestand im ersten Bioreaktor aus 10% CO, 20 % CO<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub> und 80 % CO und 20 % CO<sub>2</sub> im zweiten Bioreaktor. Zur optimalen Durchmischung und Gasversorgung betragen die Rührerdrehzahlen jeweils 1200 rpm, was volumenspezifischen Leistungseinträgen von  $11,7 \text{ W L}^{-1}$  (Labfors, erster Reaktor) beziehungsweise  $10,5 \text{ W L}^{-1}$  (KLF3000, zweiter Reaktor) entsprach. Die Begasungsraten betragen jeweils  $5,0 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $7,5 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , was einer Begasungsrate von 0,042 vvm für den ersten Reaktor beziehungsweise von 0,083 vvm für den zweiten Reaktor bedeutete.

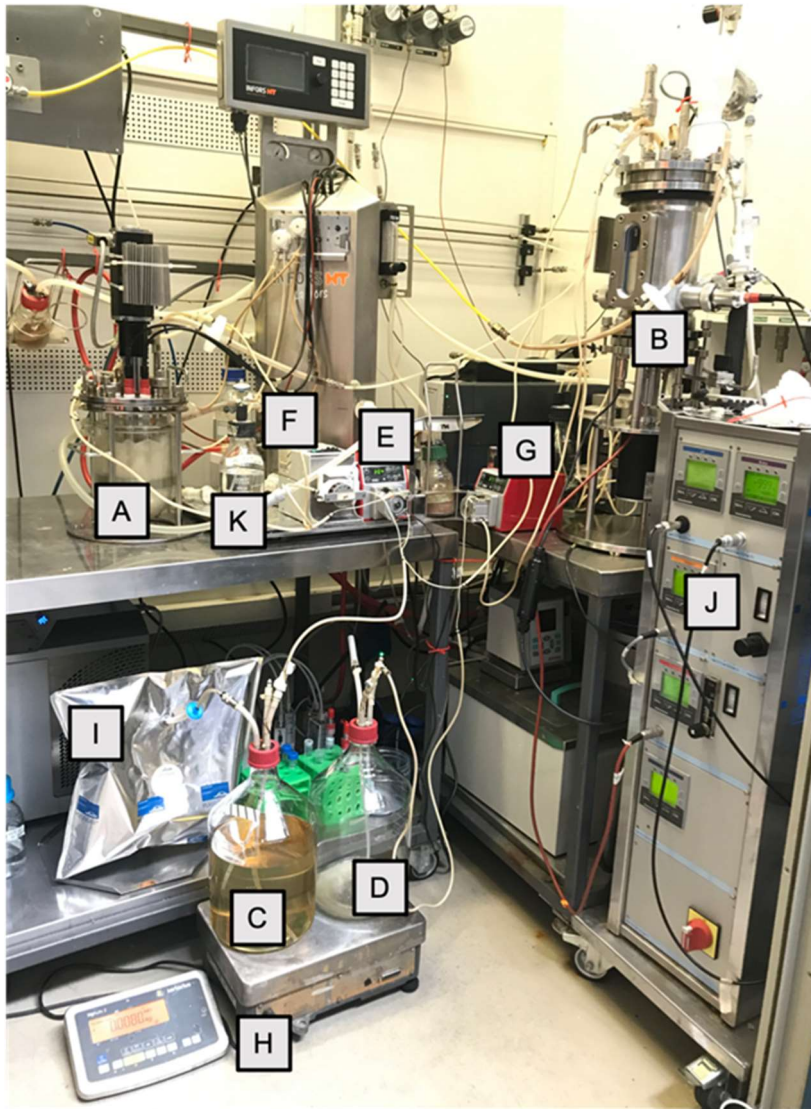
Das Fließschema der kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade mit kontinuierlicher Begasung ist in Abbildung 4-4 und ein Foto in Abbildung 4-5 dargestellt. Der erste Reaktor wurde auf pH 6,0 geregelt, um optimales Wachstum der Zellen mit Säurebildung zu gewährleisten, der zweite Reaktor wurde auf pH 5,0 geregelt, um günstige Bedingungen für die Solventogenese zu bieten. Als Titrationsmittel wurde 3 M NaOH beziehungsweise 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet mit einer beidseitigen pH-Kontrolle in beiden Reaktoren bei einem Totband von 0,05. Zur Sicherstellung des Zellwachstum wurde nach Inokulation des ersten Reaktors mit einer Biotrockenmassekonzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  der Prozess für 24 h im Satzbetrieb gefahren, bevor der kontinuierliche Betrieb der Flüssigphase mit anaerobem Zulaufmedium für den ersten Reaktor mit einer Peristaltikpumpe (Watson-Marlow, Spirax-Sarco Engineering Company) gestartet wurde. Das Zulaufmedium wurde wie in Kapitel 4.2 beschrieben hergestellt und in 5 L-Flaschen bereitgestellt. Zur Aufrechterhaltung des Volumenstroms war die 5 L-Zulaufmedienflasche mit einem flexiblen, Stickstoffreservoir (Plastigas, Carl Roth, Karlsruhe) verbunden, welcher über ein Septum in regelmäßigen Abständen mit Stickstoff wiederaufgefüllt werden konnte. Es wurden

gasdichte Schläuche (ID = 0,89 mm, Cole Parmer, Wertheim) verwendet, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten.



**Abbildung 4-4** Schematische Darstellung der kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade ohne Zellrückhalt, bestehend aus einem Glasrührkesselreaktor (Labfors, Infors AG) (links) und einem Edelstahlfermenter (KLF, Bioengineering AG) (rechts). Gasströme werden durch gestrichelte, Flüssigkeitsströme durch durchgezogene Linien dargestellt. Erster Reaktor: pH = 6,0; V = 1,0 L; CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:20:70; F<sub>Gas</sub> = 0,042 vvm. Zweiter Reaktor: pH = 5,0; V = 1,5 L; CO:CO<sub>2</sub> 80:20; F<sub>Gas</sub> = 0,083 vvm. (Für beide Reaktoren gleich: T = 37 °C; n = 1200 min<sup>-1</sup>). Über eine Gasmischstation konnte die Begasung der beiden Reaktoren mit N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und CO eingestellt werden. Die Abgasstrecken bestanden jeweils aus einem MFM und einer µ-GC (Abbildung nach Doll (2018)).

Gleichzeitig wurde der Ablauf des Labfors respektive Zulauf des Edelstahlbioreaktors über eine weitere Peristaltikpumpe (Ismatec, Cole Parmer) gestartet. Der zweite Reaktor erhielt dabei kontinuierlich zell- und säurehaltige Fermentationsbrühe aus dem ersten Reaktor zur Bildung von Alkoholen. Das Arbeitsvolumen von 1,5 L im zweiten Reaktor wurde über den kontinuierlichen Eintrag von Kulturbrühe aus dem ersten Reaktor zu dem bereits vorgelegten 1,0 L Medium im zweiten Reaktor erreicht. Der Ablauf aus dem zweiten Reaktor wurde nach Erreichen des Flüssigkeitsstandes von 1,5 L im Edelstahlfermenter gestart (Watson-Marlow, Spirax-Sarco Engineering Company) und in autoklavierten 5 L-Flaschen gesammelt. Hierbei arbeiteten alle Pumpen mit identischen Volumenströmen.



**Abbildung 4-5** Abbildung der Rührkesselkaskade aus zwei Rührkesselreaktoren mit kontinuierlicher Begasung: (A) Glasrührkesselreaktor, (B) Edelstahlfermenter, (C) Vorlageflasche mit sterilem Zulaufmedium für den ersten Reaktor, (D) Auffanggefäß für den Ablauf aus dem zweiten Reaktor, (E) Zulaufpumpe für den ersten Reaktor, (F) Ablaufpumpe des ersten Rührkesselreaktor und Zulaufpumpe für den zweiten Rührkesselreaktor, (G) Ablaufpumpe für den zweiten Rührkesselreaktor, (H) Waage zur gravimetrischen Kontrolle der Volumenkonstanz, (I) Stickstoffreservoir, (J) Steuereinheit des zweiten Rührkesselreaktor, (K) Titrationsmittel

Die Zulauf- und Abflussflaschen wurden hierbei auf einer Waage platziert, um Unregelmäßigkeiten in den Volumenströmen auszuschließen und eine Volumenkonstanz zu gewährleisten. Die Volumenströme wurden täglich mehrmals geprüft und gegebenenfalls nachjustiert. In regelmäßigen Abständen wurden in beiden Reaktoren Proben mit sterilen Einmalspritzen und -kanülen über im Reaktordeckel und im Reaktorstutzen befindliche Septen genommen. Eingetragene Standardabweichungen resultieren aus zwei sequentiell durchgeführten Experimenten unter identischen Versuchsbedingungen. Hierzu wurden entsprechende Probenahmezeitpunkte der Einzelexperimente zusammengefasst und die Standardabweichung als Minimal- und Maximalwerte bestimmt.

## 4.4. Analytische Methoden

### 4.4.1. Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration mittels Extinktionsmessung und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Kombination mit Durchflusszytometrie

Die Extinktionsmessung ermöglicht es, die Konzentration eines Stoffes in Lösung zu bestimmen, wobei der Umstand der Lichtstreuung- und absorption von Molekülen genutzt wird. Dieser Umstand führt zu einer Änderung der Lichtintensität in Abhängigkeit der Wellenlänge, welche auf mathematische Ebene durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben werden kann (Skoog und Leary 1996).

$$E_{\lambda} = \log_{10} \cdot \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot b \quad (4.1)$$

$E_{\lambda}$	Extinktion des Fluids bei der Wellenlänge $\lambda$ ,	-
$I_0$	Intensität des eingestrahlten Lichts,	$W m^{-2}$
$I$	Intensität des transmittierten Lichts,	$W m^{-2}$
$\epsilon_{\lambda}$	Dekadischer Extinktionskoeffizient,	$L mol^{-1} m^{-1}$
$c$	Konzentration,	$mol L^{-1}$
$b$	Schichtdicke der fluiden Phase,	m
$\lambda$	Wellenlänge des eingestrahlten Lichts,	nm

Die optische Dichte der Proben bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) wurde mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (Genesys 10S UV-Vis; Thermo Scientific, Neuss, Deutschland) gemessen. Hierbei lag der lineare Bereich des Photometers nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,05 und 0,3. Proben mit entsprechenden Abweichungen von diesem Wertebereich wurden mit PBS verdünnt und dreifach vermessen. Ebenso wurde für die Blindprobe (engl.: Blank) die phosphatgepufferte Salzlösung verwendet. Für die Bestimmung eines Korrelationsfaktors zwischen  $OD_{600}$  und der Biotrockengewichtskonzentration (BTM) wurden Vorkulturen wie zuvor beschrieben hergestellt, auf eine optische Dichte  $OD_{600}$  von 10 konzentriert (10 min, 4500 rpm, Hettich Zentrifuga, Rotica 50 RS und in anaerober phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) resuspendiert). Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die  $OD_{600}$  wurde für beide Stämme in dreifacher technischer Ausführung gemessen. Die Zelltrockenmasse wurde

gravimetrisch gemessen, indem das zentrifugierte Zellpellet (15 000 rpm, 5 min, Mikro 20; Hettich) in zuvor getrockneten und gewogenen 2-mL-Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 80 °C auf konstante Masse getrocknet wurde. Die Aufzeichnung der gemessenen Biomasse-Trockenkonzentration gegen die  $OD_{600}$  ermöglichte die Schätzung der linearen Korrelationsfaktoren von  $0.48 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$  *C. carboxidivorans* und  $0.47 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$  *C. kluyveri*. Mit Gleichung 4.2 konnte somit die Biotrockenmassekonzentration bestimmt werden

$$c_x = f_x \cdot OD_{600} \quad (4.2)$$

$c_x$	Biotrockenmassekonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$f_x$	Stammspezifischer Korrelationsfaktor	$\text{g L}^{-1}$
$OD_{600}$	Optische Dichte bei 600 nm	-

Die Biomassekonzentrationen der einzelnen Zellen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in der Ko-Kultur wurden auf der Grundlage der einzelnen Zellzahlen in der Probe geschätzt, die nach der *in solution* Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durch Durchflusszytometrie (FC) gemessen wurden.

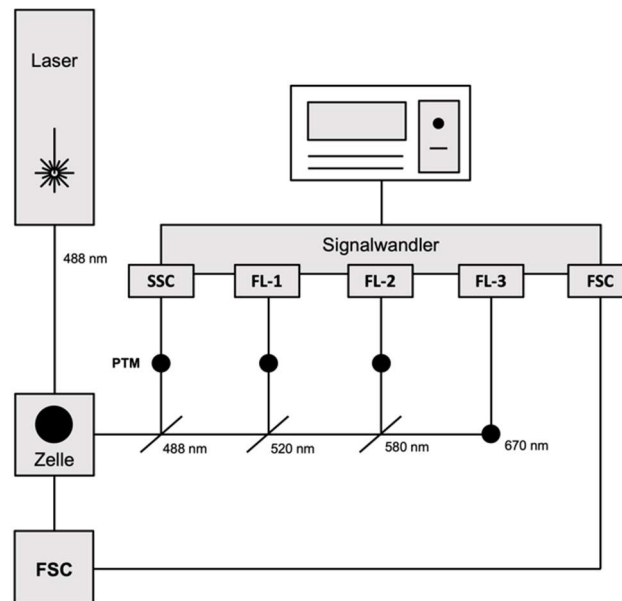
Die Durchflusszytometrie (engl.: Flow Cytometry, FC) ermöglicht die Analyse und Quantifizierung von Zellen und Partikeln hinsichtlich ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften. In der Biotechnologie ist hierbei die Beurteilung des Zustandes einer Zelle von besonderem Interesse. Ebenso können Größenverteilungen und Populationsverhältnisse ermittelt werden.

Das Grundprinzip einer FC-Analyse beruht auf der Anregung von bereits vorhanden oder in den Organismus eingebrachten Fluorophoren mittels einer monochromatischen Lichtquelle und deren emittierten Lichtspektren. Über die Lichtstreuung der einzelnen Zellen können Rückschlüsse auf den Zustand dieser gemacht werden (Rothe 2006).

Zu Beginn der Durchflusszytometrie wird die Zellsuspension in der Injektionsnadel beschleunigt. Anschließend findet eine hydrodynamische Fokussierung der Zellen statt, sodass diese einzeln an einem rechtwinklig angeordneten Laser vorbeilaufen können. Da verschiedenste Fluorophore existieren, können hierbei auch mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen Anwendung finden. Nach erfolgter Anregung wird das von den Fluorophoren emittierte Lichtspektrum von einem System aus Bandpassfiltern und Farberteilerspiegeln aufgetrennt und mittels Photomultiplier detektiert (Rothe 2006).



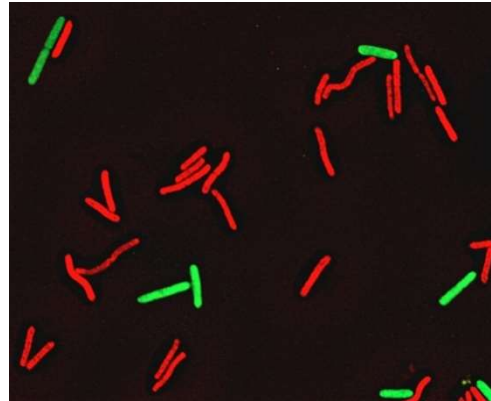
Es kann zwischen zwei verschiedenen Anordnungen der Detektoren unterschieden werden. Zum einen kann die Lichtstreuung der Zellen in der Achse des Lasers liegen (engl.: forward scatter, FSC) und zum anderen im rechten Winkel dazu (engl.: side scatter, SSC). Der FSC wird hierbei gewöhnlich zur Bestimmung der Zellgröße verwendet, wohingegen der SSC eine Beschreibung der Granularität oder des Zerteilungsgrades zulässt (Rothe 2006). Abbildung 4-6 ist eine schematische Veranschaulichung eines Durchflusszytometers zu entnehmen.



**Abbildung 4-6** Darstellung eines Durchflusszytometers. Der monochromatische Lichtstrahl des Lasers wird von der Zelle gestreut und in zwei Richtungen (FSC; SSC) von Photomultipliern (PTM) detektiert. Im Anschluss findet eine Signalumwandlung und entsprechende Verarbeitung des Signals in einer Software statt. Abbildung nach Rothe (2006)

Für den Nachweis und die Quantifizierung von *C. kluveri* und *C. carboxidivorans* in Kulturen, wurden durch den Projektpartner zwei spezifische Oligonukleotid-Sonden für 23S rRNA für beide Stämme entwickelt und verifiziert, um eine spezifische Markierung von Fermenterproben durch FISH zu ermöglichen. Die 23S rRNA-gerichteten Oligonukleotid-Sonden ClosKluy und ClosCarb wurden mit dem ARB-Softwarepaket (Ludwig et al. 2004) zusammen mit der SILVA-Datenbank (Quast et al. 2013) entworfen. Die optimale Formamidkonzentration und die Spezifität der entwickelten Sonden wurden durch Kreuzhybridisierungsexperimente und mit verschiedenen Referenzstämmen überprüft. Eine mikroskopische Aufnahme einer Mischung beider markierter Stämme ist in Abbildung 4-7 zu sehen. Die vom Projektpartner verwendeten Fluorophore waren Alexa Fluor 488 (AF488) für *C. kluveri* und Cyanine 3.5 (Cy3.5) für *C. carboxidivorans*, wobei die

entsprechenden Filtersätze 17 und 45 bei der Untersuchung in dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland) zum Einsatz kamen (Schneider et al. 2021).



**Abbildung 4-7** Mischung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* hybridisiert mit ClosKluy- und ClosCarb-Sonden. ClosKluy markiert mit AF488 (grün) und ClosCarb markiert mit Cy3.5 (rot). Belichtungszeiten: 500 ms für AF488 und Cy3.5. Bildmanipulation erfolgte mit der Software ZEN 3.0 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland) (Schneider et al. 2021).

Für eine Quantifizierung mittels *in solution* FISH-FC wurde zunächst jede Probe konzentriert oder mit PBS auf eine endgültige  $OD_{600}$  von 0,5 verdünnt, und 0,5 mL wurden bei 15 000 rpm (Mikro 20; Hettich) zentrifugiert. Das Pellet jeder Probe wurde in 0,5 mL einer Mischung aus 50 % PBS und 50 % Ethanol resuspendiert, was eine  $OD_{600}$  von 0,5 ergibt, und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Schritte für die *in solution* FISH wurden von *in situ* FISH übernommen und modifiziert, um die Messung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie zu ermöglichen (Lay et al. 2007; Haroon et al. 2013).

Vor der Hybridisierung wurden die gelagerten Proben schrittweise dehydriert, indem die Zellen durch 50 %-ige, 80 %-ige und 98 %-ige Ethanol-Wasser-Lösungen geleitet wurden. Nach jedem Dehydratisierungsschritt wurden die Zellen 3 Minuten lang bei 15 000 Umdrehungen pro Minute ( $4^{\circ}\text{C}$ , Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG) zentrifugiert und in der nächsten Lösung resuspendiert, nachdem der Überstand verworfen worden war. Die dehydrierten Bakterienzellen wurden dann zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ , Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG), und das Pellet wurde resuspendiert und durch Zugabe von 0,5 mL einer 20 %-igen LysozymbLösung (Tabelle A. 9) für 10 min auf Eis und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 15 000 rcf ( $4^{\circ}\text{C}$ , Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG) permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen in deionisiertem Wasser wurden die Zellen in 0,5 mL Hybridisierungspuffer (Tabelle A.10) mit 30 % Formamid und  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  jeder stamm-



spezifischen 23S rRNA-gezielten Oligonukleotidsonde (siehe Tabelle A. 11) resuspendiert und 3,5 h bei 46 °C unter Ausschluss von Licht zum Schutz der Fluorophore inkubiert.

Nicht gebundene Oligonukleotid-Sonden wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen in 0,5 mL vorgewärmtem Waschpuffer (siehe Tabelle A. 12) einschließlich einer 20-minütigen Inkubation bei 48 °C entfernt. Schließlich wurden die Bakterienzellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in einem Endvolumen von 0,5 mL PBS resuspendiert. Für die individuelle Bestimmung der Zellzahlen wurde ein Durchflusszytometer (BD FACS Melody Cell Sorter; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwendet, das mit einem blauen und roten Laser ausgestattet war, der bei 488 nm und 640 nm für die individuelle Bestimmung der Zellzahlen verwendet wurde. Die Ereignisrate wurde auf 10 000 Ereignisse  $s^{-1}$  eingestellt und mit der BD FACSCorus-Software (BD Biosciences) ausgewertet. Die Seitenwinkelstreuung (SSC) und die Vorwärtswinkelstreuung (FSC) wurden mit dem bei 488 nm emittierenden blauen Laser unter Verwendung des 488-nm-Bandpassfilters gemessen. Das Fluoreszenzsignal der in dieser Arbeit mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Sonden wurde bei 488 nm angeregt, und die Emission von FITC wurde mit dem 527/32-nm-Bandpassfilter (FITC-Filterset) gemessen. Die mit Cyanin 5 (Cy5) markierten Sonden wurden mit dem roten Laser bei 640 nm angeregt, und die Emission von Cy5 wurde mit dem 660/10-nm-Bandpassfilter (Allophycocyanin-Cyanin 7 (APC-C7)-Filterset) gemessen. Die Erfassungsschwelle wurde im Seitenstreuungskanal festgelegt, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren und die Erkennung bestimmter PBS-Komponenten auszuschließen. Die Fluoreszenzsignale der Zellen wurden gesammelt und als Streudiagramme (SSC vs. FSC) der Fluoreszenzintensität mit logarithmischer Darstellung und als Histogramme mit den Zellzahlen im Vergleich zur Fluoreszenzintensität im entsprechenden Filterset in bi-exponentieller Darstellung aufgezeichnet. Die Zellen der einzelnen Stämme wurden von der Software unter Verwendung der zuvor festgelegten Fenster gezählt. Die  $OD_{600}$  jedes Stammes wurde dann unter Verwendung der spezifischen linearen Korrelationsfaktoren zwischen Zellzahlen und  $OD_{600}$  ermittelt, die zuvor durch Beobachtung der Zellzahlen in manuell gemischten Proben mit verschiedenen Kombinationen beider Stämme, die durch ihre  $OD_{600}$  charakterisiert und zu einer Gesamt- $OD_{600}$  von 0,5 summiert wurden, bestimmt wurden. Unmarkierte Proben wurden als Negativkontrolle gemessen. Die Biomassekonzentrationen der beiden Stämme erfolgte dann durch Anwendung der linearen Korrelationsfaktoren zwischen CDW und  $OD_{600}$  (Bäumler et al. 2022).

#### 4.4.2. Produktbestimmung mittels HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein analytisches Verfahren, das zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Bestandteile eines Gemisches eingesetzt wird. Dabei wird eine unter Druck stehende mobile Phase, welche die Probenmischung enthält, mit Hilfe von Pumpen durch eine Säule geleitet, die mit einem festen Adsorptionsmittel gefüllt ist. Jede Komponente in der Probe interagiert unterschiedlich mit dem Adsorptionsmaterial, was zu variierenden Verweilzeiten für die verschiedenen Komponenten führt und hierdurch eine Trennung der Bestandteile bewirkt. Die Intensität der Wechselwirkung zwischen der mobilen und stationären Phase entscheidet somit über die Retentionszeiten der einzelnen Analyten (Harris 2014).

Nach dem Durchlaufen der stationären Phase wird das Laufmittel anschließend durch eine Detektoreinheit geleitet. Hierbei kann es sich unter anderem um Refraktometer (RI-Detektor), Massenspektrometer (MS) oder UV/VIS-Detektoren (DAD) handeln. Ebenfalls ist eine Kombination aus Detektoren möglich (Gey 2015). Die so gemessenen Größen werden im Anschluss mittels eines Chromatogramms über die Zeit abgebildet. Darauf folgend lässt sich unter Zuhilfenahme von externen Standards mit bekannter Konzentration eine Kalibrierfunktion erstellen, welche die Quantifizierung von unbekanntem Proben ermöglicht. Zu den vier Trennmethoden der HPLC zählen die Verteilungs-, Adsorptions-, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie.

Für die Quantifizierung der Produktkonzentrationen mit Hilfe einer HPLC wurden Fermentationsproben hierzu sterilfiltriert (0,2 µm Spritzenfilter, Carl Roth, Karlsruhe) und bis zur Analytik bei 4°C in Rollrandfläschchen dicht verschlossen. Hierzu erfolgte eine automatisierte Probennahme (10 µL) aus einem Rollrandfläschchen mittels eines Autosamplers (HPLC-Autosampler Plus, Finnigan Surveyor ThermoFischer Scientific). Weiterhin wurde als mobile Phase und Laufmittel 5 mM Schwefelsäure eingesetzt, welche bei einem Druck von 44 bar und einem Volumenstrom von 0,6 mL min<sup>-1</sup> über eine Ionenaustauschsäule (Aminex HPX-87H, BioRad, München, Deutschland) bei einer Säulofentemperatur von 60 °C geleitet wurde. Im Anschluss wurden mittels eines Brechungsindex-Detektors (Finnigan Surveyor RI Plus Detector, Thermo Fisher Scientific) die Bestandteile der jeweiligen Proben analysiert. Die Laufzeit der einzelnen Proben betrug hierbei 45 Minuten. Abschließend konnte mit Hilfe von ebenfalls vermessenen Standardlösungen und den erhaltenen integrierten Chromatogrammen aus der HPLC-Software (Agilent EZChrom Elite, KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH) über lineare Regression eine Bestimmung der Produktkonzentrationen durchgeführt werden. Die Elutionszeiten der einzelnen Produkte sind Tabelle A. 13 zu entnehmen.

#### 4.4.3. Produktbestimmung mittels GC

Das Trennprinzip der Gaschromatographie (GC) ähnelt dem der HPLC, wobei bei der GC eine andere mobile Phase Verwendung. Diese besteht aus einem inerten Trägergas wie Argon, Helium, Kohlenstoffdioxid, Stickstoff oder Wasserstoff, wobei auch eine Mischung dieser Gase möglich ist (Gey 2015).

Zu Beginn einer GC-Analyse wird das Probengemisch in einer Injektorheizung verdampft. Die so entstandene Gasphase wird anschließend mit dem Trägergas vermischt und über die Kapillarsäule (stationäre Phase) geleitet. Aufgrund von verschiedenen Siedepunkten, Partialdampfdrücken, Van-der-Waals-Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen eluieren die Probenbestandteile durch diese unterschiedlich schnell. Nachfolgend geschaltete Detektoren ermöglichen im Anschluss eine Quantifizierung der Probe. Hierbei kommen typischerweise Elektroneneinfangdetektoren, Flammionisationsdetektoren (FID) und Wärmeleitfähigkeitsdetektoren zum Einsatz (Harris 2014).

Für die Messung der 1-Hexanol-, Octanoat- und 1-Octanol-Konzentrationen wurden die Proben durch Zugabe von Hexan (Probe: Hexan = 3:1), Mischen für 15 min bei  $25\text{ s}^{-1}$  (Retsch MM200, RETSCH GmbH, Haan, Deutschland) und anschließender Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min (Mikro 20, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) extrahiert. 100  $\mu\text{L}$  der organischen Phase wurden dann abgenommen, mit 50  $\mu\text{L}$  eines internen Standards ( $1\text{ g L}^{-1}$  1-Pentanol in Hexan) gemischt und für die GC-Analyse verwendet. Am Ende der Extraktion wurden die Proben gasdicht verschlossen, um eine Verdunstung des Hexans zu vermeiden. Die gaschromatographische (GC) Analyse wurde mit einem Autosampler (AOC-20s, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) und einem GC-Autoinjektor (AOC-20i, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) automatisiert, der ein Probenvolumen von 5  $\mu\text{L}$  mit einem Split des Injektors von 50 aufnahm. Die stationäre Phase war eine GC-Kapillarsäule (FameWax, Restek) und die mobile Phase ( $4,35\text{ mL min}^{-1}$ ; 4,96 bar) bestand aus Helium. Die Säulentemperatur wurde nach jeder Probeninjektion mit  $7\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  von  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhöht. Nach der Trennung der Produkte auf der GC-Kapillarsäule wurden sie mit einem Flammenionisationsdetektor (FID-2010 Plus, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) nachgewiesen, der bei einer Temperatur von  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Flussraten von  $40\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{H}_2$ ) und  $400\text{ mL min}^{-1}$  (He) betrieben wurde. In Tabelle A.14 sind die verschiedenen Elutionszeiten von 1-Hexanol, 1-Octanol und Octanoat aufgeführt.

#### 4.4.4. Bestimmung der Wachstums- und Produktbildungsraten

Die Bestimmung der maximalen Produktbildungs- und Wachstumsraten erfolgte über die Ableitung einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion (Gl. 4.3) der ermittelten Produkt- und Biotrockenmassekonzentrationen über die Prozesszeit. Hierzu wurde in der Software Matlab (The MathWorks Inc., Natick, USA) eine modifizierte Gompertz- Funktion mit drei Variablen aus der *Curve-Fitting Toolbox* angewendet (Trust-Region Algorithmus). Die Berechnung von Standardabweichungen erfolgte über das 95 %-Konfidenzintervall, welches von Matlab ausgegeben wird. Die Bildung der ersten Ableitung erlaubte dann die Abschätzung der maximalen volumetrischen Produktbildungs- und Wachstumsraten.

$$c_p = a \cdot e^{-e^{-\frac{(t-c)}{b}}} \quad (4.3)$$

$c_p$	Produktkonzentration,	$g L^{-1}$
$t$	Prozesszeit,	$h$
$a, b, c$	Regressionsfaktoren,	-

#### 4.4.5. Abgasanalytik zur Bestimmung von Gasaufnahmeleistungen

Die Zusammensetzung des Abgases konnte durch einen  $\mu$ -Gaschromatographie ( $\mu$  490, Agilent Technologies, Waldbronn) analysiert werden. Hierbei kamen zum einen  $\mu$ GC-Gaschromatographieeinheit ( $\mu$ CG 490, Säulentyp: 1m COX Heated Injector mit Backflush, Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt. Zum anderen kam eine weitere  $\mu$ GC zum Einsatz, welche drei Kanäle besaß, die eine Detektion verschiedener gasförmiger Komponente ermöglichte. Auf der ersten Säule (Molsiebsäule mit Trägergas Argon) konnten Permanentgase wie He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO und kurzkettige Alkane detektiert werden. Die zweite Säule (PPQ-Säule mit Trägergas Helium) diente der Detektion von CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> und NO<sub>x</sub>. Der dritte Kanal (CP-Sil 5-Säule mit Trägergas Helium) ermöglichte es, die Gase H<sub>2</sub>S, C<sub>2</sub>S und COS zu vermessen. Um eine zuverlässige Bestimmung der Abgaszusammensetzung gewährleisten zu können, erfolgte eine Kalibrierung der  $\mu$ -GC-Einheit. Hierzu wurde der Reaktor überbrückt, bestimmte verschiedene Gaszusammensetzungen eingestellt und vermessen. Eine Kalibriergerade ermöglichte die Korrelation der Peakflächen und der Gasanteile. Die Parameter sowie die Einstellungen der zweiten  $\mu$ -GC sind in Tabelle 4-2 aufgeführt.

**Tabelle 4-2** Parameter und Einstellungen der verwendeten drei Kanälen der  $\mu$ -GC ( $\mu$  490, Agilent Technologies).

	Kanal 1	Kanal 2	Kanal 3
Trägergas	Argon	Helium	Helium
Säule	Molsiebsäule	PPQ-Säule	CP-Sil 5-Säule
Injektortemperatur	90 °C	90 °C	90 °C
Säulentemperatur	80 °C	80 °C	45 °C
Injektionszeit	50 ms	50 ms	50 ms
Rückspülzeit	5,0 s	13,0 s	8,0 s
Initialdruck	250 kPa	150 kPa	100 kPa
Probenfrequenz	100 Hz	100 Hz	100 Hz
Laufzeit	150 s	150 s	90 s

Die Aufzeichnung des Abgasvolumenstroms erfolgte durch einen thermischen Massendurchflussmesser (Mass Flow Measurement, MFM) (Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande), welcher mittels  $N_2$  kalibriert wurde. Volumenströme von Gasmischungen mit verschiedenen Gaskomponenten weisen aufgrund der Gaskonversionsfaktoren der Einzelgase und in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Gasmischung Unterschiede zu den tatsächlichen Volumenströmen auf. Die gemessenen Abgasvolumenströme wurden daher um den Mischgaskonversionsfaktor (MGK) und den mittels  $\mu$ GC gemessenen Anteil der einzelnen Gaskomponenten  $i$  an der Gesamtabluft  $y_i$  bereinigt (siehe Gleichung 4.4).

$$\dot{V}_i = \dot{V}_{\text{Abgas}} \cdot \text{MGK} \cdot y_i \quad (4.4)$$

$\dot{V}_i$	Tatsächlicher Gasvolumenstrom der Komponente $i$ ,	$L \text{ h}^{-1}$
$\dot{V}_{\text{Abgas}}$	Gesamter Abgasvolumenstrom,	$L \text{ h}^{-1}$
MGK	Mischgaskonversionsfaktor,	-
$y_i$	Gasanteil der Komponente $i$ am Gesamtvolumenstrom,	-

Der Mischgaskoeffizient (MGK) wurde aus den Gaskonversionsfaktoren  $G_{f,i}$  der einzelnen Gase sowie deren Volumenanteile  $y_i$  nach Gleichung 4.5 berechnet. Der Gaskonversionsfaktor wurde über die Steigung einer Kalibriergerade für verschiedene Gasvolumenströme des reinen Gases  $i$  im Massendurchflussmesser empirisch bestimmt.

$$\text{MGK} = \frac{100}{\sum_{i=1}^n \frac{y_i}{G_{f,i}}} \quad (4.5)$$

MGK	Mischgaskonversionsfaktor,	-
$G_{f,i}$	Gaskonversionsfaktor des Gases i,	-
$y_i$	Gasanteil der Komponente i am Gesamtvolumenstrom,	-

Die Berechnung der volumetrischen Gasaufnahme- und Bildungsrate  $r_G$  des jeweiligen Gases erfolgte dabei aus der Differenz der molaren Eingangs- und Abgasvolumenströme gemäß Gleichung 4.6. Aufgrund dieser Definition stellten positive Raten  $r_G > 0$  Aufnahme- und während negative Raten  $r_G < 0$  die Bildung beziehungsweise Freisetzung des jeweiligen Gases darstellten und folglich in dieser Arbeit als Bildungsrate bezeichnet wurden. Hierdurch konnten die jeweiligen volumetrischen Gasaufnahme- und Bildungsrate  $r_{\text{CO}}$ ,  $r_{\text{CO}_2}$  und  $r_{\text{H}_2}$  bestimmt werden.

$$r_G = (\dot{V}_{g,\text{ein}} \cdot p_{i,\text{ein}} - \dot{V}_{g,\text{aus}} \cdot p_i) \cdot (V_R \cdot R \cdot T)^{-1} \quad (4.6)$$

$r_G$	volumetrische Gasaufnahme- und Bildungsrate,	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\dot{V}_{g,\text{ein}}$	Gaseingangsvolumenstrom,	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{g,\text{aus}}$	Abgasvolumenstrom,	$\text{L h}^{-1}$
$p_{S,\text{ein}}$	Eingangspartialdruck Gas i,	mbar
$p_i$	Partialdruck Gas i,	mbar
$V_R$	Reaktionsvolumen,	L
R	universelle Gaskonstante: 8,314	$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
T	Prozesstemperatur,	K

## 5. Reaktionstechnische Charakterisierung von *C. kluyveri*<sup>1,2</sup>

### 5.1. Vergleichende Analyse verschiedener *C. kluyveri* Isolate

Die Charakterisierung des Wachstums sowie der Produktbildung der *C. kluyveri* Isolate DSM 555, DSM 556, DSM 557, DSM 562, DSM 563 und DSM 564 erfolgte als biologisches Triplikat in parallelen Anaerobflaschen. Als Substrat dienten 6 g L<sup>-1</sup> Acetat und 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol. In Abbildung 5-1 sind die maximal erzielten Biotrockenmassekonzentrationen, der Verbrauch von Acetat und Ethanol, der finale pH sowie die final erzielten Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen der jeweiligen Isolate nach 120 h dargestellt. *C. kluyveri* DSM 555 gilt als der Modelstamm (Barker und Taha 1941) und wird daher als Referenz herangezogen.

Bei einer Betrachtung des Substratverbrauchs konnte ein reduzierter Verbrauch bei den Isolaten *C. kluyveri* DSM 556, DSM 557 und DSM 562 verzeichnet werden. Die Butyratkonzentration war für die Isolate *C. kluyveri* DSM 563 und DSM 564 am niedrigsten, wohingegen erhöhte Hexanoatkonzentration von  $8,9 \pm 0,08$  g L<sup>-1</sup> und  $7,75 \pm 0,24$  g L<sup>-1</sup> quantifiziert werden konnten. Der Referenzstamm *C. kluyveri* DSM 555 erreichte mit  $10,73 \pm 1,01$  g L<sup>-1</sup> die höchste Hexanoatkonzentration. Der pH fiel lediglich bei den Isolaten *C. kluyveri* DSM 556 und DSM 562 unter pH 6,0 nach 120 h.

Für alle Isolate konnte eine vergleichbare maximale Biomassekonzentration um 0,4 g L<sup>-1</sup> erzielt werden, wobei *C. kluyveri* DSM 562 und DSM 564 mit knapp  $0,47 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup> und 0,5 g L<sup>-1</sup> ein leicht verbessertes Wachstum aufwiesen.

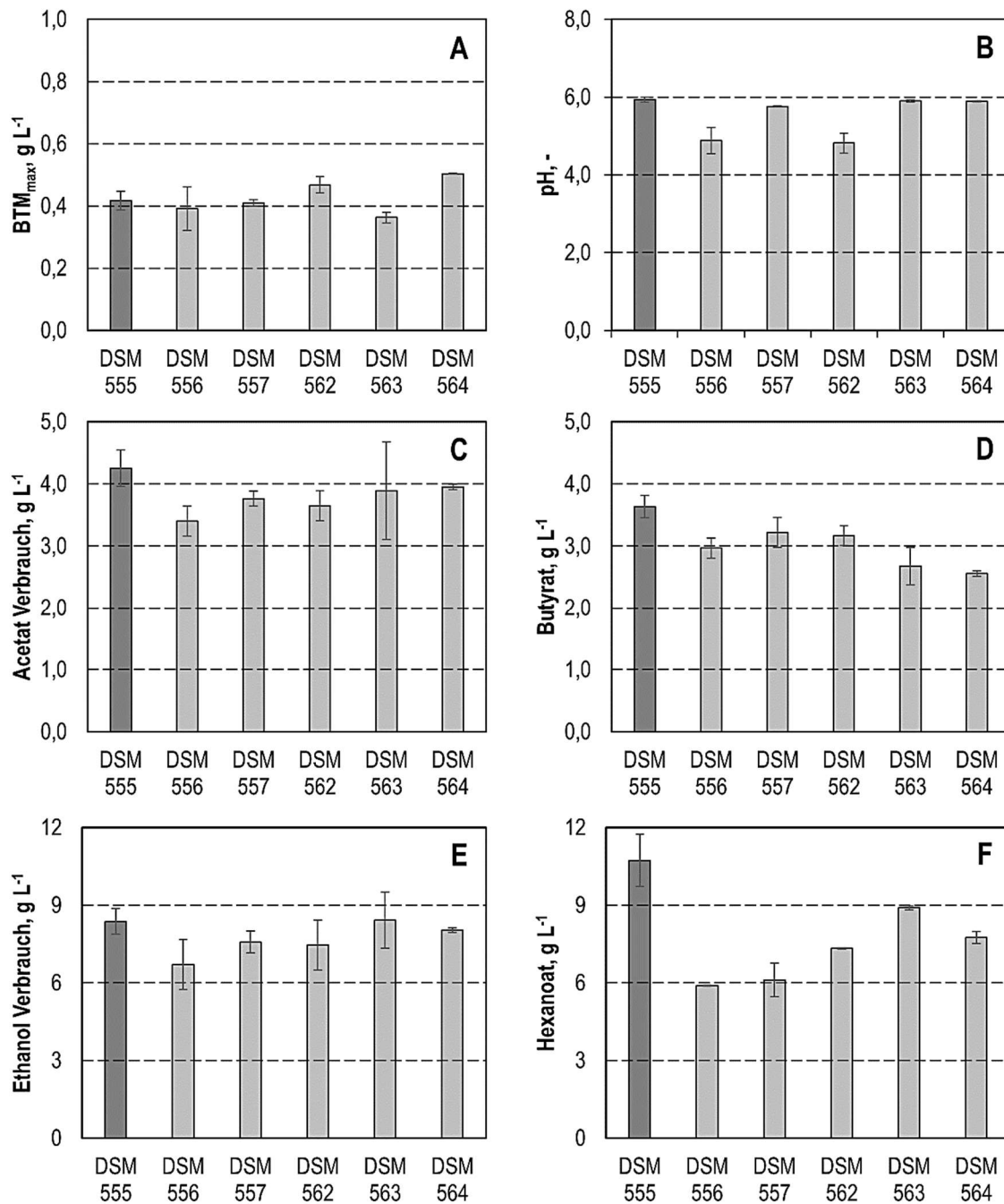
### Diskussion

Es ist zunächst festzuhalten, dass die verschiedenen Isolate von *C. kluyveri* insgesamt das zu erwartende Verhalten aufwiesen und aus den Substraten Acetat und Ethanol mittels Kettenverlängerung die Produkte Butyrat und Hexanoat unter Ansäuerung des Mediums bildeten. Die Ansäuerung lässt sich durch eine Betrachtung der Reaktionsgleichung erklären: Aus 6 Mol Ethanol (C<sub>2</sub>) und 3 Mol Acetat können 3 Mol Butyrat und ein zusätzliches Mol Hexanoat gebildet werden.

Teile dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht in:

<sup>1</sup>Bäumler, Miriam; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin; Liebl, Wolfgang; Weuster-Botz, Dirk (2022): Synthetic co-culture of autotrophic *Clostridium carboxidivorans* and chain elongating *Clostridium kluyveri* monitored by flow cytometry. In: *Microbial Biotechnology* 15 (5), S. 1471–1485. DOI: 10.1111/1751-7915.13941.

<sup>2</sup>Bäumler, Miriam; Burgmaier, Veronika; Herrmann, Fabian; Mentges, Julian; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin et al. (2023): Continuous Production of Ethanol, 1-Butanol and 1-Hexanol from CO with a Synthetic Co-Culture of Clostridia Applying a Cascade of Stirred-Tank Bioreactors. In: *Microorganisms* 11 (4), S. 1003. DOI: 10.3390/microorganisms11041003.



**Abbildung 5-1** Parallelkultivierungen in Anaerobflaschen mit verschiedenen *C. kluyveri* Isolaten mit 6 g L<sup>-1</sup> Acetat und 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol: A) maximale Biomassekonzentration, B) finaler pH, C+D) Substratverbrauch, E+F) finale Produktkonzentrationen nach 120 h (pH<sub>0</sub> = 6,8; T = 37 °C; n = 100 rpm; V = 0,1 L).

Das führt langfristig zu einer Reduzierung des pH im Medium (Seedorf et al. 2008). Für alle Satzprozesse waren nach einer gewissen Prozesszeit eine stagnierende Substrataufnahme und Produktbildung messbar, was auf die Abnahme des pH zurückzuführen ist, da dieser zu diesem Zeitpunkt bei pH 6,0 oder tiefer lag. Wie von Barker und Taha



(1941) beschrieben, liegt der Bereich, in dem Wachstum von *C. kluyveri* beobachtet werden kann, zwischen pH 6,0 und pH 7,5. Alle Stämme zeigten eine messbare Bildung von  $H_2$  bis hin zu 480 mbar (Daten nicht gezeigt)

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass jedes der untersuchten Isolate von *C. kluyveri* verschiedene Ausprägungen des für diesen Mikroorganismus spezifischen Stoffwechsels aufweist. Die Isolate *C. kluyveri* DSM 556, DSM 556 und DSM 562 bevorzugten die Butyratbildung gegenüber der Hexanoatbildung. Da das Ziel die Identifikation eines Isolates mit einem auf die Bildung von Hexanoat optimierten Stoffwechsel war, zeigte der Referenzstamm *C. kluyveri* DSM 555 die vielversprechendsten Ergebnisse. Daher wurde dieser Stamm für die weiteren Versuche ausgewählt und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit lediglich mit *C. kluyveri* bezeichnet.

## 5.2. Variation des pH

Da das Wachstum und die Produktbildung von *C. kluyveri* pH-abhängig sind, wurde der Einfluss des pH in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren in Satzverfahren untersucht. Als Kultivierungsmedium wurde dabei das modifizierte Medium nach Hurst (Hurst und Lewis 2010) mit  $6 \text{ g L}^{-1}$  Acetat und  $20 \text{ mL L}^{-1}$  Ethanol als Substrat verwendet. Zusätzlich wurde L-Cystein-Hydrochlorid (Cys-HCl) als Reduktionsmittel verwendet, da Natriumsulfid in wässrigem Medium zu  $H_2S$  umgesetzt und in kontinuierlich begasten Reaktoren ausgetragen werden würde. Die Satzkultivierungen erfolgten bei  $37^\circ\text{C}$ , einer Rührerdrehzahl von 1200 rpm ( $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ) sowie einem Gesamtgasvolumenstrom von 0,083 vvm. Die Gasmischung bestand aus 80%  $N_2$  und 20%  $CO_2$ .

Der pH wurde dabei zum einen konstant auf pH 6,8 geregelt, da hier günstige Bedingungen für das Wachstum von *C. kluyveri* vorliegen (s. Kapitel 3). Zum anderen wurde ein unkontrollierter pH mit einem Start-pH von pH 6,8 sowie ein kontrollierter pH 6,0 untersucht, da hier das Wachstumsoptimum von *C. carboxidivorans* - im Hinblick auf eine gemeinsame Ko-Kultivierung - vorliegt. Abschließend wurde ebenfalls der Einfluss eines niedrigen konstanten pH 5,0 untersucht. Die Verläufe der Biomasse- sowie der Substrat- und Produktkonzentrationen sind in Abb. 5-2 dargestellt.

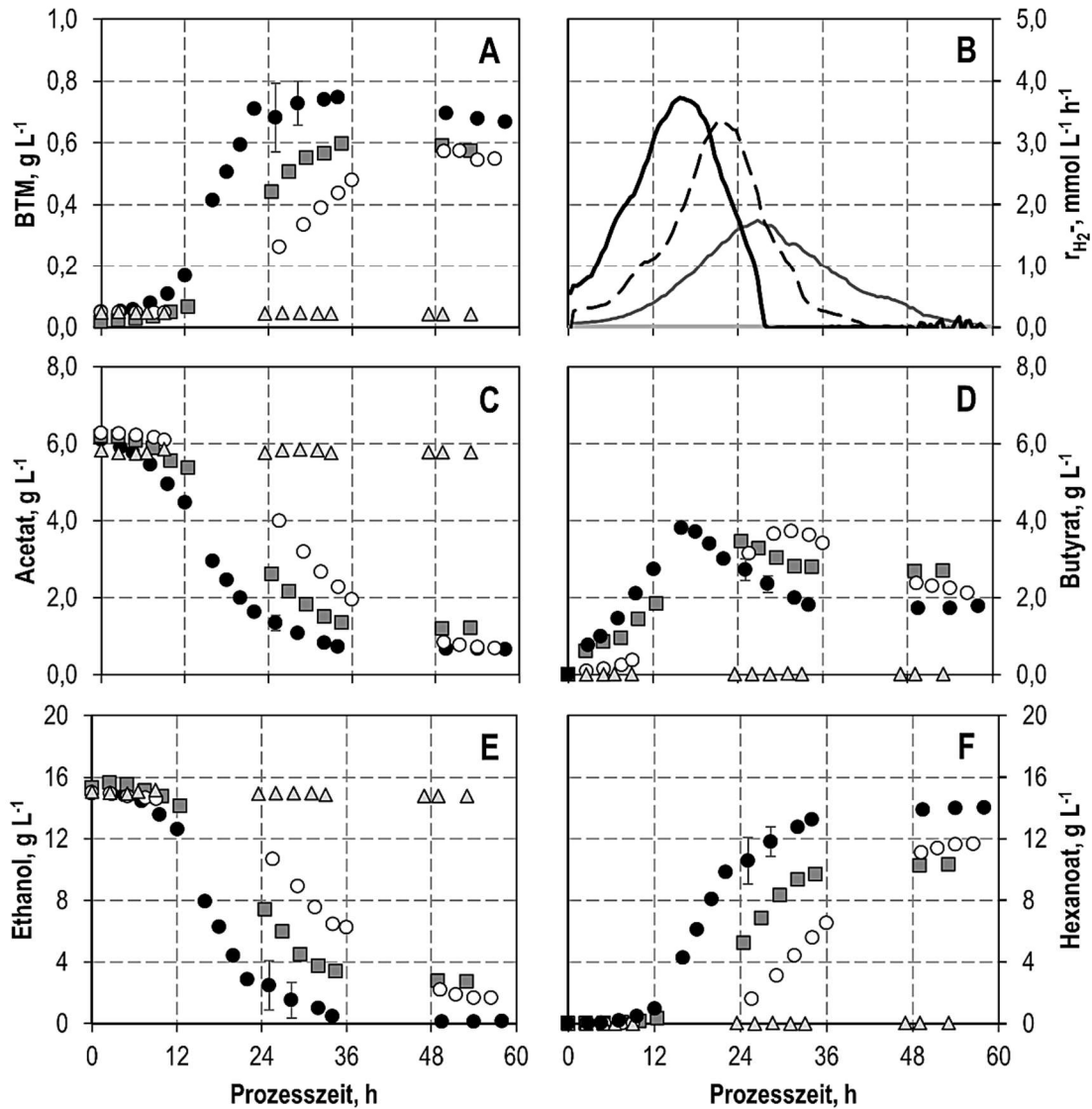
Das Wachstum bei pH 6,8 setzte nahezu direkt nach Inokulation ein und erreichte mit einer maximalen Wachstumsrate von  $0,18 \text{ h}^{-1}$  eine maximale Biotrockenmassekonzentration von  $0,78 \text{ g L}^{-1}$  nach 32 h. Anschließend konnte ein leichtes Absinken der Zell-

masse verzeichnet werden. Die Acetat- und Ethanolkonzentrationen sanken in 50 h Prozesszeit von 6,2 g L<sup>-1</sup> auf 0,64 g L<sup>-1</sup> und von 14,7 g L<sup>-1</sup> auf 0,1 g L<sup>-1</sup> und verzeichneten dann keine Änderung mehr. Für die Konzentration des C4-Säureanions Butyrat konnte ein Maximum mit einer Konzentration von 3,81 g L<sup>-1</sup> nach 16 h verzeichnet werden. Anschließend sank die Konzentration auf finale 1,7 g L<sup>-1</sup>. Das längerkettige des Säureanion Hexanoat konnte mit einer maximalen Konzentration von 14,0 g L<sup>-1</sup> nach 58 h erfasst werden.

Das Wachstum setzte ohne pH-Kontrolle direkt nach Inokulation ein und erreichte mit einer vergleichbaren maximalen Wachstumsrate von 0,16 h<sup>-1</sup> eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 0,6 g L<sup>-1</sup> nach 32 h. Anschließend konnte ebenfalls ein leichtes Absinken der Zellmasse verzeichnet werden. Der Verlauf des pH zeigte einen Abfall von initial pH 6,8 auf final pH 5,8 nach 36 h. Die Acetat- und Ethanolkonzentrationen sanken in 50 h Prozesszeit auf 1,2 g L<sup>-1</sup> und 2,7 g L<sup>-1</sup>. Das Maximum für Butyrat war mit 3,4 g L<sup>-1</sup> nach 25 h erreicht und sank anschließend auf finale 2,7 g L<sup>-1</sup>. Hexanoat wurde mit 10,3 g L<sup>-1</sup> nach 53 h erfasst, was einer Reduktion von 26 % gegenüber dem pH kontrollierten Prozess bei pH 6,8 entspricht.

Bei pH 6,0 setzte das Wachstum zeitversetzt ein und erreichte eine maximale Wachstumsrate von 0,10 h<sup>-1</sup> und eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 0,57 g L<sup>-1</sup> nach 50 h im Gegensatz zu 0,78 g L<sup>-1</sup> im pH kontrollierten Prozess bei pH 6,8 nach 32 h. Die Acetat- und Ethanolkonzentrationen sanken in 50 h Prozesszeit auf 0,8 g L<sup>-1</sup> und 1,6 g L<sup>-1</sup>. Die Butyratkonzentration erreichte das Maximum mit 3,6 g L<sup>-1</sup> nach 34 h und sank anschließend auf finale 2,0 g L<sup>-1</sup>. Die finale maximale Hexanoatkonzentration betrug 11,9 g L<sup>-1</sup> nach 53 h.

Bei einem pH von 5,0 konnte weder Wachstum noch Produktbildung von *C. kluyveri* verzeichnet werden. Dennoch ist keine Abnahme der BTM Konzentration zu beobachten. Daraus lässt sich folgern, dass dieser pH 5,0 nicht zu einem Absterben der Mikroorganismen führt. Dies wird auch durch eine geringfügige Aufnahme von Ethanol über die Prozesszeit bestätigt.



**Abbildung 5-2** Satzprozesse von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit variierendem pH. pH 6,8 kontrolliert (schwarzer Kreis, schwarze Linie), pH 6,0 kontrolliert (weiße Punkte, dunkelgraue Linie), pH 6,8 unkontrolliert (graue Vierecke, gestrichelte Linie), pH 5,0 kontrolliert (graue Dreiecke, hellgraue Linie). (T = 37°C; pH 6,0; P V<sup>-1</sup> = 11,7 W L<sup>-1</sup>, F<sub>gas</sub> = 0,083 vvm mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

Die Gasbildung während dieser autotrophen Prozesse wurde mittels online Abgasanalytik gemessen. Auf den Ausgangspartialdrücken basierend ließen sich die volumetrischen Gasbildungs- und Gasaufnahme-raten von H<sub>2</sub> sowie die Gasaufnahme-raten von CO<sub>2</sub> bestimmen. Die volumetrischen Gasaufnahme-raten von H<sub>2</sub> bei variierendem pH sind in Abbildung 5-2 B dargestellt. Nach 16 h wurden im Prozess mit pH 6,8 maximal 3,73 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> H<sub>2</sub> und 1,64 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> gemessen. Die maximalen Gasbildungs-raten für H<sub>2</sub> wurden zeitverzögert erreicht und waren im Prozess ohne pH Kontrolle und im Prozess mit einem kontrollierten pH von 6,0 um 10 % und 53 % reduziert (s. Tabelle 5-1).

**Tabelle 5-1** Maximale BTM- und Produktkonzentrationen sowie maximale Wachstums-, volumetrische Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten bei der Kultivierung von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit variierendem pH (T = 37°C; pH 6,0; P V<sup>-1</sup> = 11,7 W L<sup>-1</sup>, F<sub>gas</sub> = 0,083 vvm mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

	pH 6,8	pH unkontrolliert	pH 6,0
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,75	0,60	0,57
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	3,81	3,45	3,72
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	14,01	10,31	11,86
μ <sub>max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,18	0,16	0,11
r <sub>max. Acetat</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,27	0,28	0,21
r <sub>max. Ethanol</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,85	0,65	0,46
r <sub>max. Butyrat</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,47	0,27	0,23
r <sub>max. Hexanoat</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,91	0,63	0,55
r <sub>max. H<sub>2</sub></sub> , mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3,73	3,38	1,75
r <sub>max. CO<sub>2</sub></sub> , mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	1,64	1,23	0,85

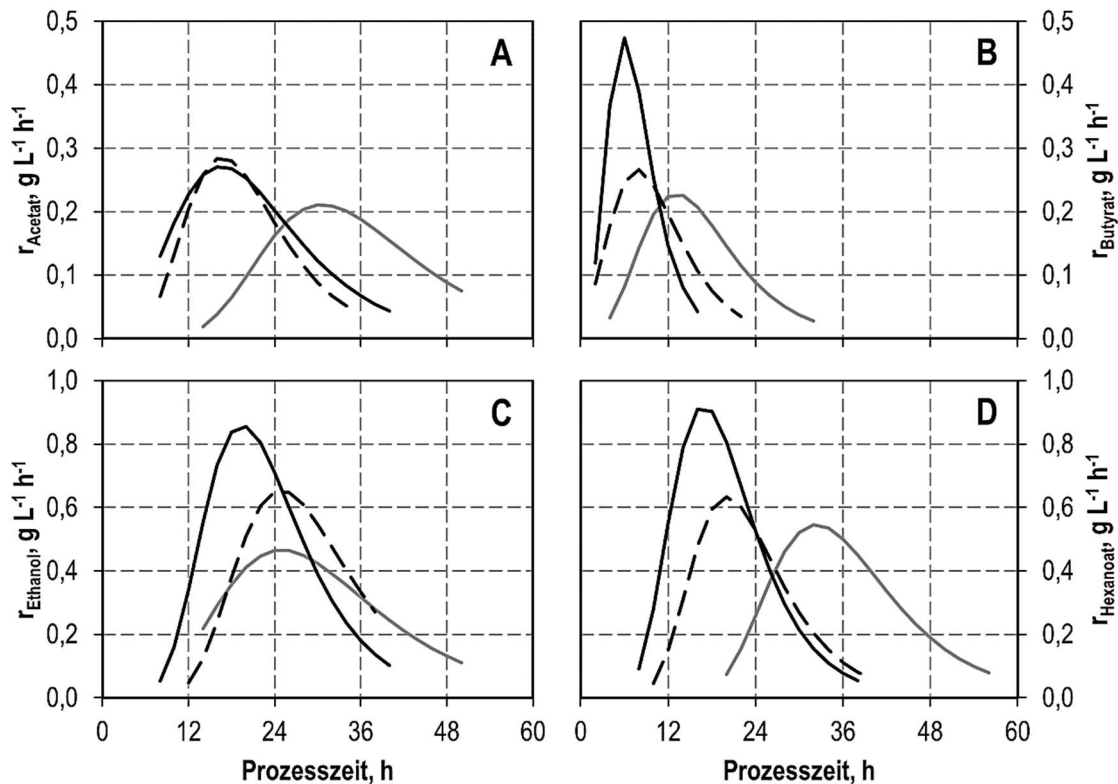
## Diskussion

Alle durchgeführten Satzprozesse zeigten ein typisches Verhalten, wobei zunächst die Bildung von Butyrat unter Verbrauch von Acetat und Ethanol erfolgte, welches anschließend durch Kettenverlängerung zu Hexanoat umgesetzt wurde. Die Wasserstoffproduktion, welche durch die energiereiche Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA über ferredoxin-abhängige Oxidoreduktasen ermöglicht wird (Seedorf et al. 2008), konnte in diesen Satzprozessen ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Kohlenstoffdioxidaufnahme bestätigt werden (Tomlinson und Barker 1954). Da Kohlenstoffdioxid als wesentliche Kohlenstoffquelle für die Zellproliferation von *C. kluyveri* gilt und Wasserstoff als ein zusätzliches Produkt der Kettenverlängerung auftritt, können die CO<sub>2</sub>-Aufnahme- und H<sub>2</sub>-Bildungsraten als Indikatoren für die Stoffwechselaktivität von *C. kluyveri* dienen.

Die volumetrischen Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten sind in Abbildung 5-3 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der Verbrauch von Ethanol gegenüber Acetat bei kontrolliertem pH 6,8 um das Dreifache erhöht ist. Die Bildung von Hexanoat ist mit 0,91 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ebenfalls um das Doppelte gegenüber der Butyratbildung erhöht (Tab. 5-1).

Eine pH-Verringerung von pH 6,8 auf pH 6,0 führte sowohl zu einer zeitlichen Verzögerung bis zum Erreichen des Maximums als auch zu einer Verringerung der maximalen volumetrischen Substratverbrauchsrate von Acetat und Ethanol um 22 % und 45 %

(Abb. 5-3). Die volumetrischen Produktbildungsraten verringerten sich bei einer pH Absenkung um 51 % für Butyrat und 40 % für Hexanoat (Tab. 5-1). Das Verhältnis des Verbrauchs von Ethanol zu Acetat sank ebenfalls auf den Faktor 2 herab, wohingegen die volumetrische Bildungsrate von Hexanoat gegenüber Butyrat auf den Faktor 2,4 stieg. Ohne eine Kontrolle des pH wurde am Ende pH 5,8 gemessen. Die volumetrischen Produktbildungsraten zeigten eine Reduktion der Butyrat- und Hexanoatbildung um 43 % und 31 % gegenüber dem Satzprozess mit pH 6,8.



**Abbildung 5-3** Maximale volumetrische Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten bei den Satz kultivierung von *C. kluyveri* mit  $15 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $6 \text{ g L}^{-1}$  Acetat im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit variierendem pH: pH 6,8 (schwarz), pH unkontrolliert (schwarz gestrichelt), pH 6,0 (grau) ( $T = 37^\circ\text{C}$ ; pH 6,0;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  mit  $200 \text{ mbar CO}_2$ ).

Vorherige Studien über den Kettenverlängerungsprozess bei *C. kluyveri* zeigten, dass das Wachstum von *C. kluyveri* sehr pH-abhängig ist (Kenealy et al. 1995). Der pH-Bereich für das beste Wachstum wurde zwischen pH 6,0 und pH 7,5 ermittelt (Barker und Taha 1941; Kenealy und Waselefsky 1985). (Yin et al. 2017) beobachteten, dass ein allmähliches Absinken des pH von pH 7,5 auf pH 5,7 aufgrund der Akkumulation flüchtiger Fettsäuren zu einer Stagnation des Wachstums und des Ethanol/Acetat-Verbrauchs führte, was mit der berichteten Hemmung des Stoffwechsels ab pH 5,5 (Kenealy et al. 1995) übereinstimmt. Die reduzierten Wachstums- sowie Produktbildungsraten in den Satzprozessen bei einem niedrigeren pH lassen sich also dadurch erklären, dass die

dissoziierte Form der Carbonsäuren bei einem nahezu neutralen pH weniger toxisch für die Zellen ist als die undissoziierte Form bei einem niedrigeren pH (Lonkar et al. 2016).

Für das optimale Wachstum von *C. carboxidivorans* wurde pH 6,0 bestimmt, während die Bildung von Alkoholen bevorzugt bei pH < 6,0 stattfindet (Doll 2018; Fernández-Naveira et al. 2019). Um eine Ko-Kultivierung von *C. kluyveri* mit *C. carboxidivorans* zu ermöglichen, wurde im Folgenden pH 6,0 gewählt.

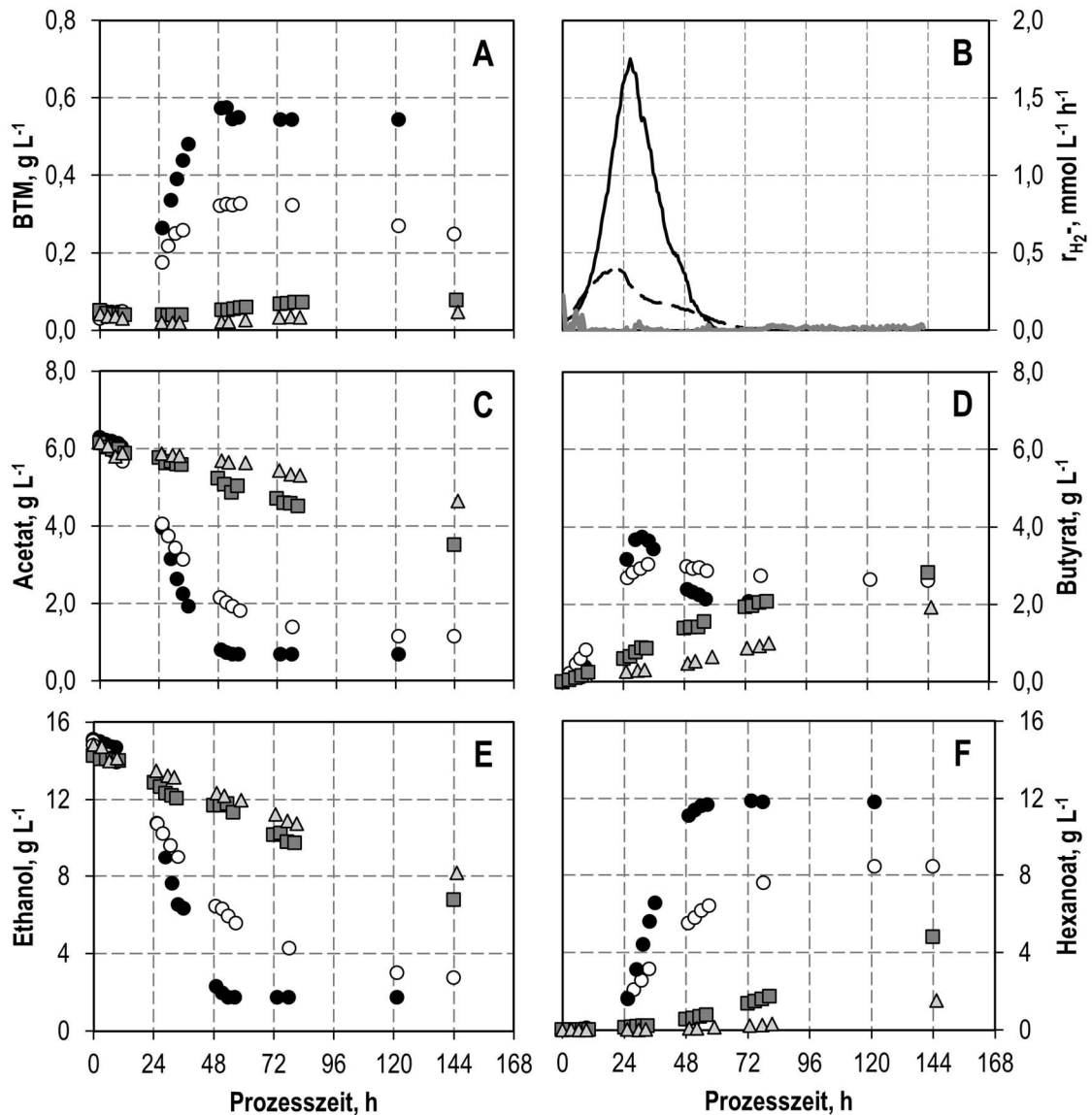
### 5.3. Inhibierungsstudien mit Kohlenmonoxid

Da Kohlenmonoxid (CO) das Hauptsubstrat des autotroph wachsenden *C. carboxidivorans* ist, stellt der Einfluss dieses Gases auf das Wachstum von *C. kluyveri* einen entscheidenden Faktor für die Gestaltung der Ko-Kultivierung dar. Daher wurden die Effekte verschiedener Kohlenmonoxidpartialdrücke auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* in kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren untersucht.

Hierzu wurde der initiale CO-Eingangspartialdruck zwischen 0 – 800 mbar bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ ; pH 6,0;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  mit 200 mbar  $\text{CO}_2$ ) variiert. Der Gesamtdruck betrug 1,0 bar und  $\text{N}_2$  wurde als inertes Füllgas verwendet. In Abbildung 5-4 sind exemplarisch die Prozessverläufe bei  $p_{\text{CO, in}} = 0 - 800 \text{ mbar CO}$  dargestellt.

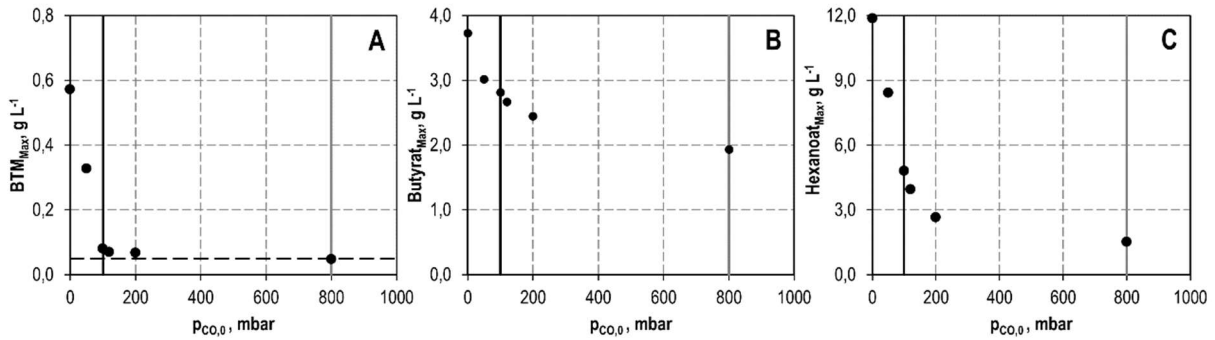
Die Wachstumsraten sanken mit steigendem initialen CO-Partialdruck von  $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,09 \text{ h}^{-1}$  (50 mbar CO) und  $0,02 \text{ h}^{-1}$  (100 mbar CO). Die maximal erreichten Biotrockenmassekonzentrationen wurden dabei auf  $0,33 \text{ g L}^{-1}$  und  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  reduziert, wobei das Wachstum insbesondere bei 100 mbar CO deutlich verzögert eintrat. Es konnten leicht reduzierte Butyratkonzentrationen bis zu einem initialen CO Partialdruck von 100 mbar erreicht werden (Tab. 5-2) wohingegen die finalen Hexanoatkonzentrationen auf  $8,4 \text{ g L}^{-1}$  (50 mbar CO) und  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  (100 mbar CO) reduziert wurden.

Die abgeschätzten volumetrischen Produktbildungsraten zeigten Maximalwerte von  $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Butyrat nach 10 h und  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Hexanoat nach 34 h bei  $p_{\text{CO, ini}} = 50 \text{ mbar}$  sowie  $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Butyrat nach 50 h und  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Hexanoat nach 128 h bei einem CO Eingangspartialdruck von 100 mbar (Abb. 5-6). Eine Erhöhung des CO-Partialdruckes auf 50 mbar resultierte in einer reduzierten  $\text{H}_2$ -Gasbildungsrate von  $0,41 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  nach 20 h. Eine weitere Erhöhung der CO-Begasung führte zu keiner messbaren  $\text{H}_2$ -Produktion. Für die Prozesse mit erhöhtem CO-Partialdruck konnte keine nennenswerte  $\text{CO}_2$ -Aufnahme verzeichnet werden.



**Abbildung 5-4** Satzprozesse von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit variierenden initialen CO-Partialdrücken.  $p_{CO,in} = 0$  mbar (schwarzer Kreis, schwarze Linie),  $p_{CO,in} = 50$  mbar (weiße Punkte, gestrichelte Linie),  $p_{CO,in} = 100$  mbar (graue Vierecke, graue Linie),  $p_{CO,in} = 800$  mbar (graue Dreiecke, graue Linie). ( $T = 37^\circ\text{C}$ ; pH 6,0;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ,  $F_{gas} = 0,083 \text{ vvm}$  mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

Die resultierenden maximalen Biomassekonzentrationen sowie die maximalen Butyrat- und Hexanoat-Konzentrationen sind in Abbildung 5-5 als Funktion der eingestellten CO-Partialdrücke in den einzelnen Satzprozessen dargestellt. Bereits 100 mbar CO reduzierte die maximale Biomassekonzentration von *C. kluyveri* um 86% im Vergleich zu einem Satzprozess ohne CO-Zugabe. Bei 800 mbar CO wurde eine totale Wachstumshemmung von *C. kluyveri* beobachtet, aber die Biomassekonzentration von *C. kluyveri* war 144 Stunden lang stabil.



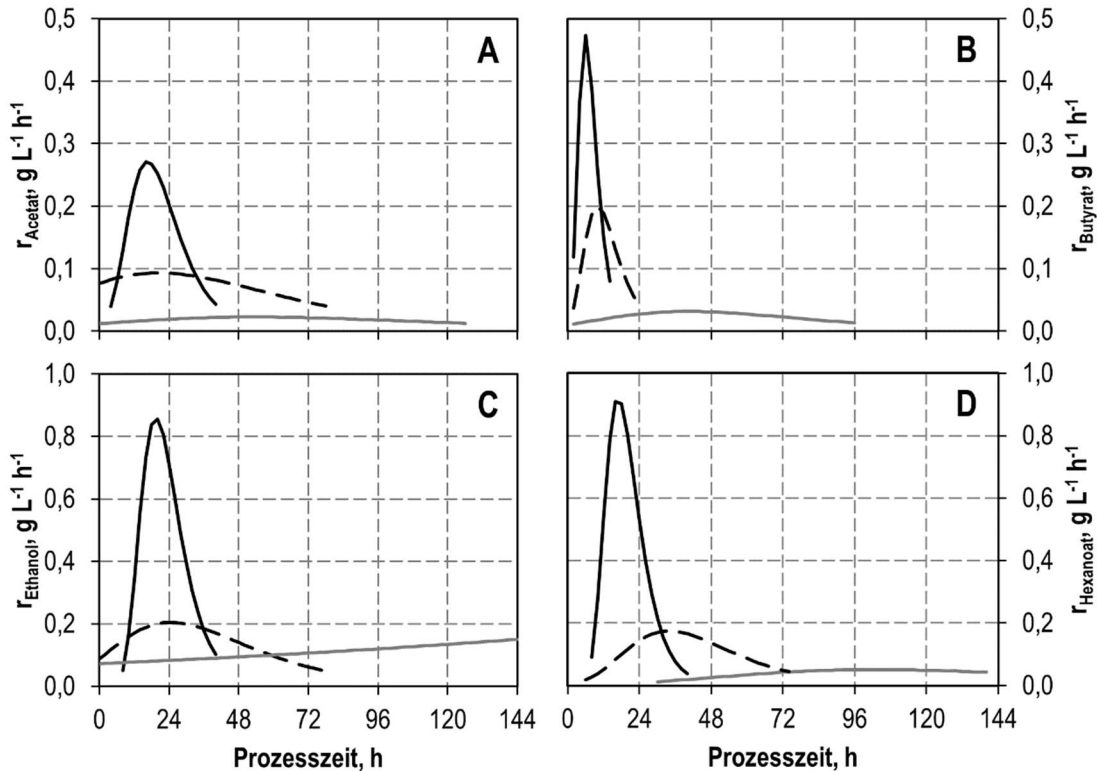
**Abbildung 5-5** Maximale Biomassekonzentrationen (A), maximale Butyrat-Konzentrationen (B) und maximale Hexanoat-Konzentrationen (C) als Funktion unterschiedlicher CO-Partialdrücke während der Satzkultivierung von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat in einem vollständig kontrollierten Rührkessel-Bioreaktor. Die grau gestrichelte Linie zeigt die anfängliche Biomassekonzentration, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Werte bei  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100$  mbar und die graue Linie die Konzentrationen bei  $p_{\text{CO},\text{in}} = 800$  mbar ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH } 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7$  W L<sup>-1</sup>,  $F_{\text{gas}} = 0,083$  vvm mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

Die maximalen Hexanoatkonzentrationen wurden bei 100 mbar CO um 60 % und bei 800 mbar CO um 87 % reduziert verglichen mit einem Satzprozess ohne CO in der Gasphase. Die Verringerung der maximalen Butyratkonzentrationen mit zunehmendem CO-Partialdruck war im Vergleich zu den Hexanoatkonzentrationen geringer (24 % bei 100 mbar CO sowie 48 % bei 800 mbar CO).

**Tabelle 5-2** Maximale BTM- und Produktkonzentrationen sowie maximale Wachstums-, volumetrische Substratverbrauchs- und Produktbildungsrate bei der Kultivierung von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit variierendem  $p_{\text{CO},\text{in}}$  ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH } 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7$  W L<sup>-1</sup>,  $F_{\text{gas}} = 0,083$  vvm mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

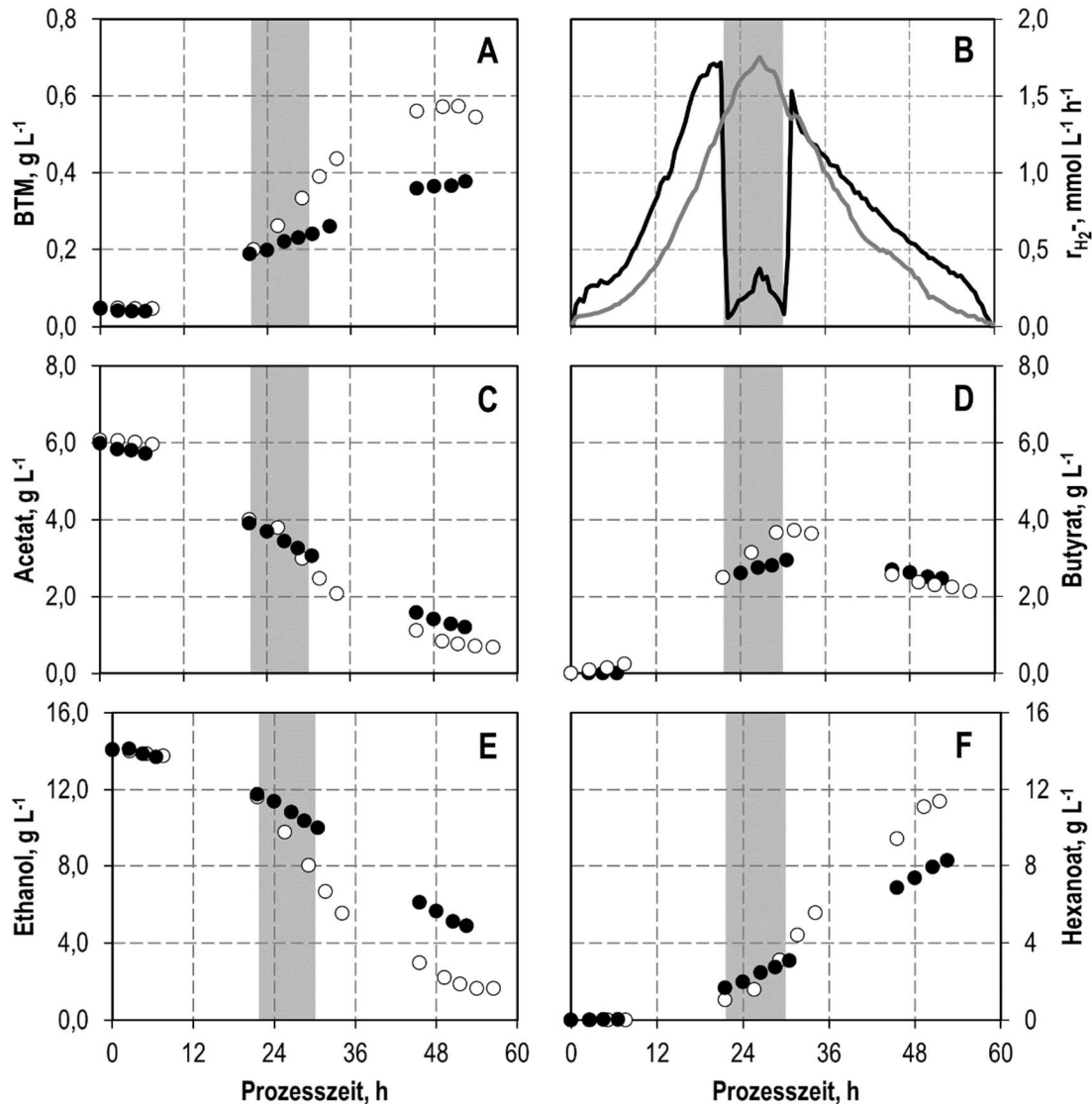
$p_{\text{CO},\text{in}}$	0 mbar	50 mbar	100 mbar	800 mbar
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,57	0,33	0,08	0,05
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	3,72	3,02	2,81	1,93
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	11,86	8,42	4,80	1,52
$\mu_{\text{max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,11	0,10	0,02	0,01
$r_{\text{max. Acetat}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,21	0,09	0,02	0,01
$r_{\text{max. Ethanol}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,46	0,20	0,15	0,05
$r_{\text{max. Butyrat}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,23	0,20	0,03	0,02
$r_{\text{max. Hexanoat}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,55	0,17	0,05	0,03





**Abbildung 5-6** Maximale volumetrische Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten bei der Kultivierung von *C. kluyveri* mit  $15 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $6 \text{ g L}^{-1}$  Acetat im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit  $p_{\text{CO},\text{in}} = 0 \text{ mbar}$  (schwarz),  $p_{\text{CO},\text{in}} = 50 \text{ mbar}$  (schwarz gestrichelt) und  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100 \text{ mbar}$  (grau) ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH } 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  mit  $200 \text{ mbar CO}_2$ ).

Die Wirkung von  $\text{CO}$  auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* wurde zusätzlich untersucht, indem ein Satzprozess mit *C. kluyveri* in einem kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor bei  $\text{pH } 6,0$  mit zeitlich begrenzter  $\text{CO}$ -Zufuhr durchgeführt wurde. Dabei wurde die Zufuhr von  $100 \text{ mbar CO}$  während des exponentiellen Wachstums nach einer Prozesszeit von  $22 \text{ h}$  gestartet.  $9 \text{ h}$  später wurde die  $\text{CO}$ -Zufuhr abgeschaltet (Abbildung 5-7). Die Prozessdaten werden mit einem Referenzversuch verglichen, bei dem zu keinem Zeitpunkt  $\text{CO}$  zugeführt wurde. Bis zum Beginn der  $\text{CO}$ -Begasung waren die Biomassekonzentrationen und die Wasserstoffierungsraten in beiden Prozessen vergleichbar. Nach Beginn der  $\text{CO}$ -Begasung verringerte sich jedoch die Wachstumsrate und die Wasserstoffierungsrate fiel von  $1,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  auf  $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Unmittelbar nach dem Abschalten der  $\text{CO}$ -Zufuhr wurde die Wasserstoffierungsrate wieder vollständig hergestellt. Der lineare Anstieg der Biomassekonzentrationen wurde durch das Abschalten der  $\text{CO}$ -Zufuhr nicht beeinträchtigt. Infolgedessen wurde nach einer Prozessdauer von  $53 \text{ Stunden}$  eine verringerte Biomassekonzentration von  $70 \%$  des Referenzprozesses beobachtet.



**Abbildung 5-7** Satzprozesse von *C. kluyveri* mit 15 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit pCO<sub>in</sub> = 0 mbar (weiße Punkte, graue Linie) und mit pCO<sub>in</sub> = 100 mbar über einen Zeitraum von 9 h, angezeigt durch grau schattierte Fläche (schwarze Punkte, schwarze Linie). (T = 37°C; pH 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10.5 W L<sup>-1</sup>, F<sub>gas</sub> = 0.042 vvm mit 200 mbar CO<sub>2</sub>).

## Diskussion

Die durchgeführten Satzversuche zeigten eine steigende Inhibierung in *C. kluyveri* mit steigendem initialen CO-Partialdruck. Die maximalen Hexanoatkonzentrationen wurden verglichen mit einem Satzprozess ohne CO in der Gasphase um 60 % (100 mbar CO) und um 87 % (800 mbar CO) reduziert. Trotz einer Hemmung des Wachstums von *C. kluyveri* bei 800 mbar CO konnte eine gleichbleibende Biomassekonzentration gemessen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen bei einer Ko-Kulti-

vierung von *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* in Anaerobflaschen, bei der eine Inhibition von *C. kluyveri* durch das im Kopfraum der Flaschen enthaltende CO vermutet wurde (Diender et al. 2016).

Die in dieser Arbeit untersuchte zeitlich begrenzte Begasung mit CO im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor eröffnete den Verdacht einer reversiblen Hemmung der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase in *C. kluyveri* durch CO, da die Wasserstoff-Bildung mit Start der CO-Begasung deutlich limitiert wurde.

Nach (Seedorf et al. 2008) weist die Ferredoxin-abhängige Hydrogenase von *C. kluyveri* eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit mit der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase von *Clostridium pasteurianum* auf. Für letztere wurde in Untersuchungen mit Zellextrakten von *C. pasteurianum* eine Hemmung durch exogen zugesetztes Kohlenmonoxid beobachtet (Lemon und Peters 1999). Die Ferredoxin-abhängige Hydrogenase in *C. kluyveri* ist für die Produktion von Wasserstoff verantwortlich, wobei reduziertes Ferredoxin oxidiert und damit wiederverwendbar gemacht wird (Seedorf et al. 2008). Die Inhibition der Hydrogenase von *C. kluyveri* wurde auch im Satzversuch gezeigt, da die Wasserstoff-Bildung bei einer Begasung mit 100 mbar CO nicht mehr messbar war. Da die Wasserstoffproduktion nach Beendigung der CO-Begasung wieder auf das gleiche Niveau zurückkehrte, deutet dies auf eine reversible Hemmung der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase durch CO in *C. kluyveri* hin.

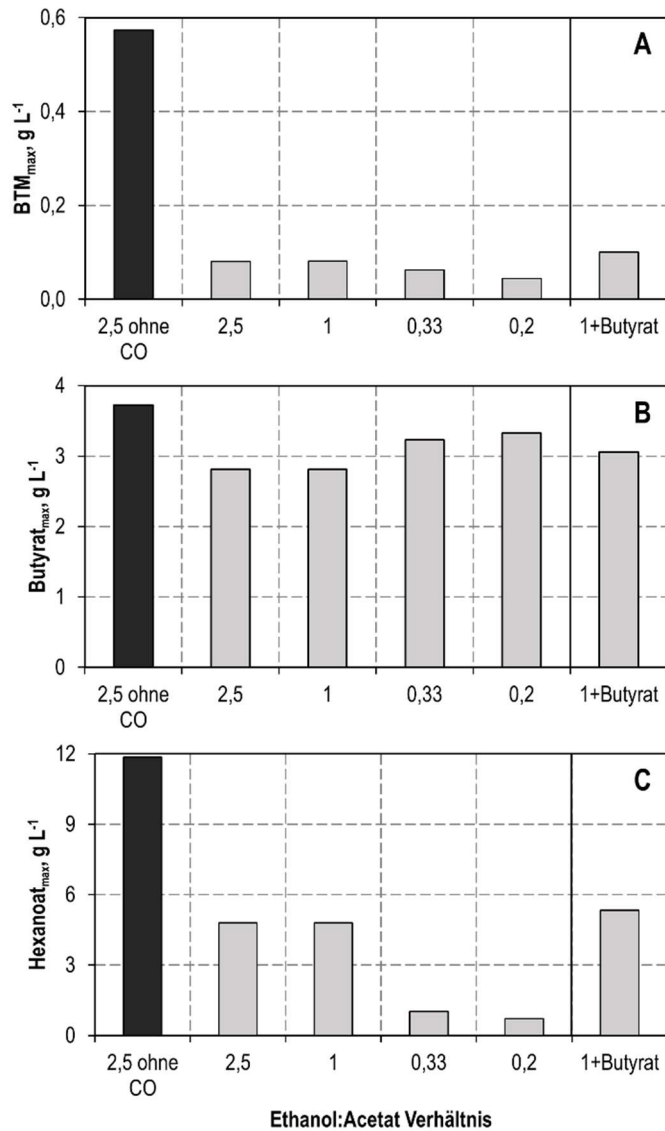
Da die Wasserstoffbildung als Indikator für die Stoffwechselaktivität von *C. kluyveri* dienen kann (s. Kapitel 5.2), wurde das Wachstum während der CO-Begasung erwartungsgemäß ebenfalls reduziert. Dies ist die Folge eines Unterbindens des Energiestoffwechsels, da sich Redox-Äquivalente aus reduziertem Ferredoxin anreichern, was zu einer reduzierten Wachstumsrate führt. Interessanterweise konnte, obwohl die Wasserstoffproduktion wieder auf das gleiche Niveau anstieg, nicht die gleiche Biomassekonzentration nach 53 Stunden im Vergleich zum Referenzversuch erreicht werden. Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mit kontinuierlicher Begasung (Abb. 5-4) zeigten jedoch, dass Wachstum für eine erfolgreiche Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* nicht essentiell ist, da selbst bei 800 mbar CO die Zellkonzentration innerhalb einer Prozesszeit von 144 h nicht reduziert wurde und sowohl Butyrat als auch Hexanoat von den ruhenden Zellen produziert wurden. Ein Grund für diese bemerkenswerte Kettenverlängerungsaktivität von *C. kluyveri* bei niedrigen Biomassekonzentrationen könnte sein, dass die Kettenverlängerung gegenüber der Biomassebildung effizienter wird, um die verringerte ATP-Produktion auszugleichen (González-Cabaleiro et al. 2013; Gildemyn et al. 2017).

## 5.4. Ethanol:Acetat-Verhältnis in Gegenwart von CO

Satz- und kontinuierliche Prozesse mit CO/CO<sub>2</sub> als Gasphase zeigten eine Bildungskinetik von Acetat/Ethanol durch *C. carboxidivorans* mit einem Verhältnis von 1:1 (Doll 2018; Doll et al. 2018). *C. kluyveri* hingegen bevorzugt unter optimalen Bedingungen ein Acetat/Ethanol-Verhältnis von 1:2 bis hin zu 1:3 (s. Kapitel 3). Um zu untersuchen, was geeignete Ethanol:Acetat-Verhältnisse in Gegenwart von CO sind, wurde der Einfluss der Substratzusammensetzung in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar untersucht, da unter diesen Bedingungen noch Kettenverlängerung sowie ein geringes Wachstum von *C. kluyveri* zu verzeichnen war (s. Abb. 5-4).

Es wurden Ethanol:Acetat Verhältnisse von 0,2 - 2,5 untersucht. Da *C. carboxidivorans* aus Synthesegas auch Butyrat bilden kann (s. Kapitel 3), wurde zusätzlich ein Verhältnis von 1:1 mit zusätzlich 5% Butyrat untersucht. Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen sowie die maximal erreichten Butyrat- und Hexanoatkonzentration in Abhängigkeit des eingesetzten Substratverhältnisses nach einer Prozesszeit von 144 h sind in Abbildung 5-8 dargestellt. Vergleichend sind die entsprechenden Maximalwerte des Referenzprozesses mit einem Ethanol:Acetat-Verhältnis von 2,5 ohne Begasung mit CO dargestellt.

Bei einer zusätzlichen Begasung mit 100 mbar CO zeigte die Reduktion des Ethanol:Acetat-Verhältnisses von 2,5 auf 1,0 keinen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri*. Eine weitere Reduktion des Ethanolgehalts auf Verhältnisse von 0,33 und 0,2 resultierte jedoch in reduzierten Biomassekonzentrationen um 22 % und 55 %. Dadurch war die Butyratbildung bevorzugt und die Bildung von Hexanoat um 79 % und 85 % reduziert. Ist nun zusätzlich noch Butyrat als weiterer Elektronenakzeptor vorhanden, konnte die maximale Biotrockenmassekonzentration um den Faktor 1,26 und die maximale Hexanoatkonzentration um den Faktor 1,11 gegenüber des Prozesses mit einem Ethanol:Acetat-Verhältnis von 2,5 ohne zusätzliche Butyratzugabe gesteigert werden. Unabhängig von dem eingesetzten Substratverhältnis konnte bei zusätzlicher Begasung mit 100 mbar CO weder eine Wasserstoff-Produktion noch eine Kohlenstoffdioxid-Aufnahme beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5-8** Maximale Biomassekonzentrationen (A), maximale Butyrat-Konzentrationen (B) und maximale Hexanoat-Konzentrationen (C) als Funktion unterschiedlicher Ethanol-zu-Acetat Verhältnisse während der Satzkultivierung von *C. kluyveri* mit  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100$  mbar in einem vollständig kontrollierten Rührkessel-Bioreaktor. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH } 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (10:20:70  $\text{CO}:\text{CO}_2:\text{N}_2$ ).

## Diskussion

Unter den eingestellten Bedingungen  $\text{pH } 6,0$  und  $100$  mbar  $\text{CO}$  zeigte sich kein Einfluss auf das Wachstum sowie die Produktbildung durch die Verringerung des Ethanol:Acetat-Verhältnisses von 2,5 auf 1. Da der Metabolismus bereits eingeschränkter funktioniert aufgrund der zusätzlichen Inhibierung durch  $\text{CO}$ , scheint also ein Verhältnis von 1:1 für eine Kettenverlängerung hin zu Hexanoat ausreichend zu sein. Eine weitere Verschiebung des Verhältnisses in Richtung von Acetat hat jedoch einen negativen Effekt auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri*. Um das entsprechende Verhältnis zu

erreichen, wurden jedoch höhere Acetatkonzentrationen von maximal  $16 \text{ g L}^{-1}$  eingesetzt. Eine zu hohe Acetat-Konzentration könnte jedoch auch die Stoffwechselaktivität von *C. kluyveri* hemmen. Inhibierungsreaktionen wurden bei Acetatkonzentration von  $20 \text{ g L}^{-1}$  bei pH 7,8 berichtet (Candry et al. 2018; Yan und Dong 2018).

Das zusätzliche Bereitstellen von Butyrat als weitere Elektronenakzeptor hat zu einer höheren Biotrockenmasse- und Hexanoatkonzentration geführt was den synergistischen Effekt dieser Substratmischung belegen konnte (San-Valero et al. 2019). Das ist ein vielversprechendes Resultat, da *C. carboxidivorans* ebenfalls dazu in der Lage ist, Butyrat zu bilden (Daniell et al. 2012; Fernández-Naveira et al. 2017).

## 6. Synthetische Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* im Satzverfahren<sup>1,2</sup>

### 6.1. *In solution* Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) - Flow Cytometry (FC)

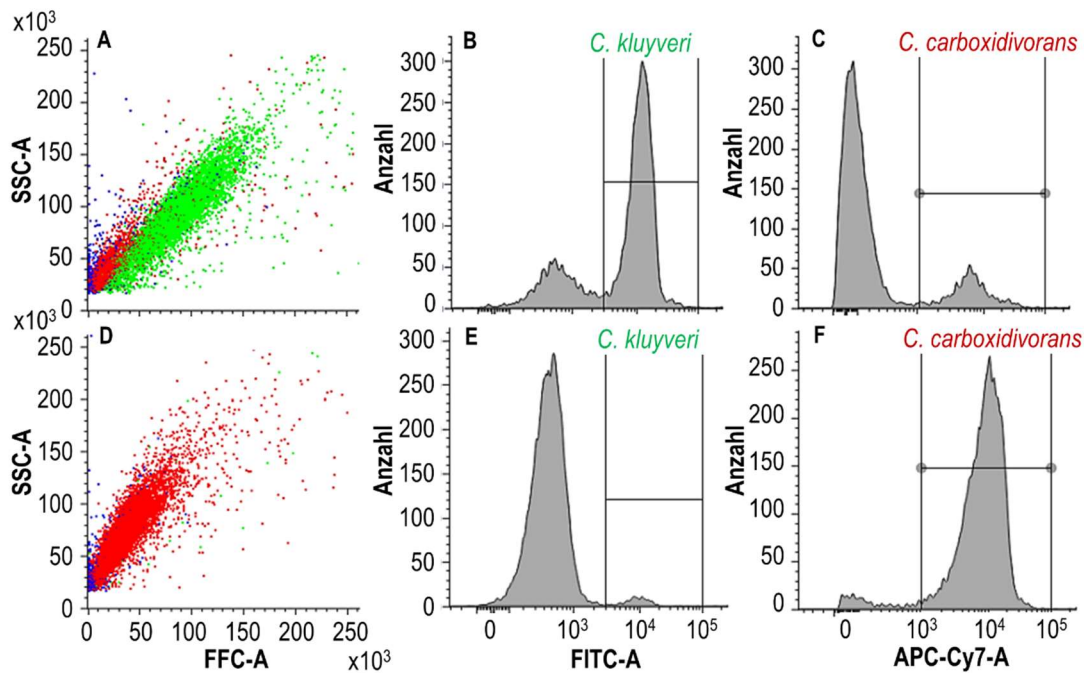
Für den Nachweis und die Quantifizierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* in Ko-Kulturen, wurden durch den Projektpartner zwei spezifische Oligonukleotid-Sonden für 23S rRNA für beide Stämme entwickelt und verifiziert, um eine spezifische Markierung von Fermenterproben durch FISH zu ermöglichen (s. Kapitel 4). Um die Zellzahlen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in flüssigen Proben während einer Ko-Kultivierung über die gesamte Prozesszeit bestimmen zu können, musste das Verfahren der *in solution* Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in Kombination mit der Durchflusszytometrie (FC) überprüft werden. Dafür wurden beide Stämme zunächst in Reinkultur kultiviert. *C. kluyveri* wurde heterotroph bei pH 6,8 und einem Gasgemisch aus 80 % N<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub> mit anfänglichen Acetat- und Ethanolkonzentrationen von 6,0 g L<sup>-1</sup> und 15,0 g L<sup>-1</sup> kultiviert (s. Abb. 5-2). *C. carboxidivorans* wurde autotroph mit einem Gasgemisch aus 80 % CO und 20 % CO<sub>2</sub> bei pH 6,0 kultiviert (Abb. 6-3). Es wurden die gleichen Medien und anfänglichen Biomassekonzentrationen von  $c_{X,0} = 0,05 \text{ g L}^{-1}$  verwendet.

Die Proben für die FISH-Markierung sowie der Messung der Zellzahlen mittels Durchflusszytometrie wurden nach 24 Stunden bei Biomassekonzentrationen von 0,8 g L<sup>-1</sup> *C. kluyveri* und 0,4 g L<sup>-1</sup> *C. carboxidivorans* entnommen und jeweils in 50 % EtOH/PBS-Lösung bei -20°C gelagert. Vor der Markierung mit den stammspezifischen Oligonukleotid-Sonden wurden unterschiedliche Verhältnisse von *C. carboxidivorans*- und *C. kluyveri*-Zellen gemischt. Abb. 6-1 zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer Mischung aus 25 % *C. carboxidivorans* und 75 % *C. kluyveri* sowie von 98,5 % *C. carboxidivorans* und 1,5 % *C. kluyveri*, gemessen mit Durchflusszytometrie nach *in solution* FISH. Blaue Punkte kennzeichnen andere, nicht markierte Partikel wie Restbestandteile des verwendeten PBS-Puffers in der Probe sowie unmarkierte Zelltrümmer, da die Sonden eine intakte rRNA als Ziel haben.

Teile dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht in:

<sup>1</sup>Bäumler, Miriam; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin; Liebl, Wolfgang; Weuster-Botz, Dirk (2022): Synthetic co-culture of autotrophic *Clostridium carboxidivorans* and chain elongating *Clostridium kluyveri* monitored by flow cytometry. In: *Microbial Biotechnology* 15 (5), S. 1471–1485. DOI: 10.1111/1751-7915.13941.

<sup>2</sup>Bäumler, Miriam; Burgmaier, Veronika; Herrmann, Fabian; Mentges, Julian; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin et al. (2023): Continuous Production of Ethanol, 1-Butanol and 1-Hexanol from CO with a Synthetic Co-Culture of Clostridia Applying a Cascade of Stirred-Tank Bioreactors. In: *Microorganisms* 11 (4), S. 1003. DOI: 10.3390/microorganisms11041003.



**Abbildung 6-1** Zwei Proben mit 75 % *C. kluveri*- und 25 % *C. carboxidivorans*-Zellen (A-C) und 1,5 % *C. kluveri*- und 98,5 % *C. carboxidivorans*-Zellen (D-F) wurden mit den stammspezifischen Oligonukleotid-Sonden gemischt, und die resultierenden Zellzahlen mit Durchflusszytometrie gemessen. (A+D) Streudiagramme mit der Intensität der beiden Fluoreszenzsignale (*C. kluveri* in grün und *C. carboxidivorans* in rot). Blaue Punkte zeigen andere, nicht markierte Partikel an. Die Achsen zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals der Seitenstreuung (SSC) gegenüber der Vorwärtsstreuung (FSC) (arbiträre Einheiten). (B+E) Histogramme mit den Zellzahlen von *C. kluveri* vs. Intensität des FITC-Fluoreszenzsignals, angeregt mit einem blauen Laser bei 488 nm und detektiert mit dem 527/32 nm Bandpassfilter (FITC), manuell eingestellt zwischen einer Fluoreszenzintensität von  $4 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$ . (C+F) Histogramme mit den Zellzahlen von *C. carboxidivorans* im Vergleich zur Intensität des Cy5-Fluoreszenzsignals, das mit einem roten Laser bei 640 nm angeregt und mit einem Bandpassfilter bei 660/10 nm (APC-Cy7) manuell zwischen einer Fluoreszenzintensität von  $10^3$  -  $10^5$  (A = Fläche) detektiert wurde.

Das relative Verhältnis der Zellzahlen betrug  $24,3 \pm 2,3$  % *C. carboxidivorans* und  $76,5 \pm 1,9$  % *C. kluveri* (Abb. 6-1 B, C) und  $95,6 \pm 3,1$  % *C. carboxidivorans* und  $1,7 \pm 1,2$  % *C. kluveri* (Abb. 6-1 E, F). Abweichungen werden entweder durch zusätzliche Partikel aus PBS verursacht, die fälschlicherweise einer Zellpopulation zugeordnet wurden (Gesamtmenge > 100 %), oder aber durch Zellen, die keiner Population zugeordnet wurden (Gesamtmenge < 100 %). Die rot dargestellten Populationen von *C. carboxidivorans* scheinen sich in der Zellgröße zu unterscheiden, je nachdem, wie viele Zellen der Analyse zugeführt werden (25 % gegenüber 98,5 % Zellanteil). Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Mikroorganismen mit zunehmender Zellzahl zur Aggregation neigen, was einer scheinbaren Vergrößerung der Zellen gleichkommt. Die Zellaggregation stellt in erster Linie kein Problem für die Bestimmung des Zellverhältnisses dar. Die Streudiagramme (Abb. 6-1 A, D) zeigen eine nahezu gleiche Zellgröße, was die Notwendigkeit von FISH-FC zur Bestimmung von *C. kluveri*- und *C. carboxidivorans*-



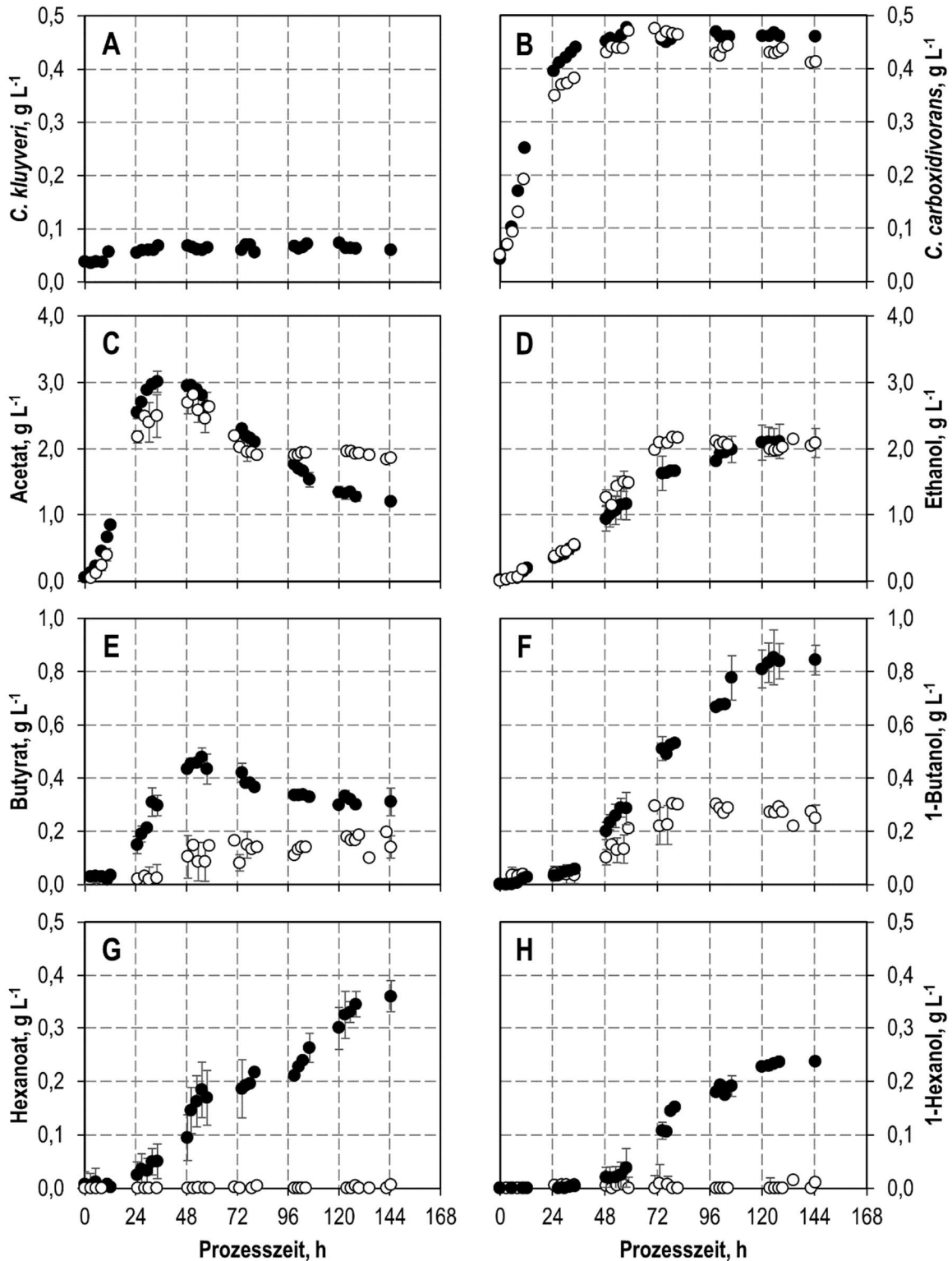
Zellen belegt, da eine Unterscheidung zwischen beiden Stämmen allein anhand der Zellverteilung nicht möglich ist. Innerhalb des Schätzfehlers der biologischen Triplikate beweist die erfolgreiche Quantifizierung des Verhältnisses der beiden Mikroorganismen durch in *solution* FISH in Kombination mit Durchflusszytometrie.

## 6.2. Verwertung verschiedener Gaszusammensetzungen

### 6.2.1. Variation des Eingangs-CO-Partialdrucks

Da ein hoher CO-Partialdruck zu besseren Ethanol:Acetat-Verhältnissen bei der Kultivierung von *C. carboxidivorans* führte, wodurch gute Bedingungen für eine Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* vorliegen sollten, wurde ein erster Ko-Kultivierungsprozess mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* bei pH 6,0 und kontinuierlicher Gaszufuhr von  $p_{\text{CO,in}} = 800$  mbar CO durchgeführt. Beide Mikroorganismen wurden dabei mit denselben Biomassekonzentrationen angeimpft ( $c_{\text{X},0} = 0,05$  g L<sup>-1</sup> pro Stamm). Die Ergebnisse sind zusammen mit einem Satzprozess mit *C. carboxidivorans* bei identischen Bedingungen in Abbildung 6-2 dargestellt.

Das Wachstum von *C. carboxidivorans* begann unmittelbar nach der Inokulation der Ko-Kultur. Nach 48 Stunden wurde eine Biomassekonzentration von  $0,44 \pm 0,02$  g L<sup>-1</sup> gemessen, was keinen signifikanten Unterschied zu dem Satzprozess mit der Reinkultur *C. carboxidivorans* zeigte. Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* war das Wachstum von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur erheblich reduziert. Nach 48 Stunden wurde eine Biomassekonzentration von  $0,07 \pm 0,01$  g L<sup>-1</sup> *C. kluyveri* festgestellt. Die Acetatbildung war nach 48 Stunden vergleichbar, während die Ethanolkonzentration in der Ko-Kultur nach 48 Stunden geringer war ( $0,9 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup> in der Ko-Kultur im Vergleich zu  $1,2 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup>). Schließlich wurde in der Ko-Kultur nach 144 Stunden fast die gleiche Ethanolkonzentration von  $2,1 \pm 0,2$  g L<sup>-1</sup> gemessen. Allerdings war die endgültige Acetatkonzentration in der Ko-Kultur im Vergleich zum Satzprozess mit *C. carboxidivorans* deutlich reduziert ( $1,2 \pm 0,02$  g L<sup>-1</sup> in der Ko-Kultur im Vergleich zu  $1,9 \pm 0,01$  g L<sup>-1</sup>), was den Acetat- und Ethanolverbrauch durch *C. kluyveri* trotz der niedrigen Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur zeigt. Infolgedessen waren die Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen in der Ko-Kultur nach 48 Stunden stark erhöht:  $0,43$  g L<sup>-1</sup> Butyrat in der Ko-Kultur im Vergleich zu  $0,12 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup> und  $0,10 \pm 0,02$  g L<sup>-1</sup> Hexanoat im Vergleich zu  $0$  g L<sup>-1</sup>. Die Wiederaufnahme von Butyrat und Hexanoat durch beide Stämme führte zu abnehmenden Butyratkonzentrationen wobei die Hexanoatbildung durch *C. kluyveri* jedoch die Wiederaufnahme überstieg, wie an der bis zum Ende des Satzprozesses stetig steigenden Hexanoatkonzentration zu erkennen ist.

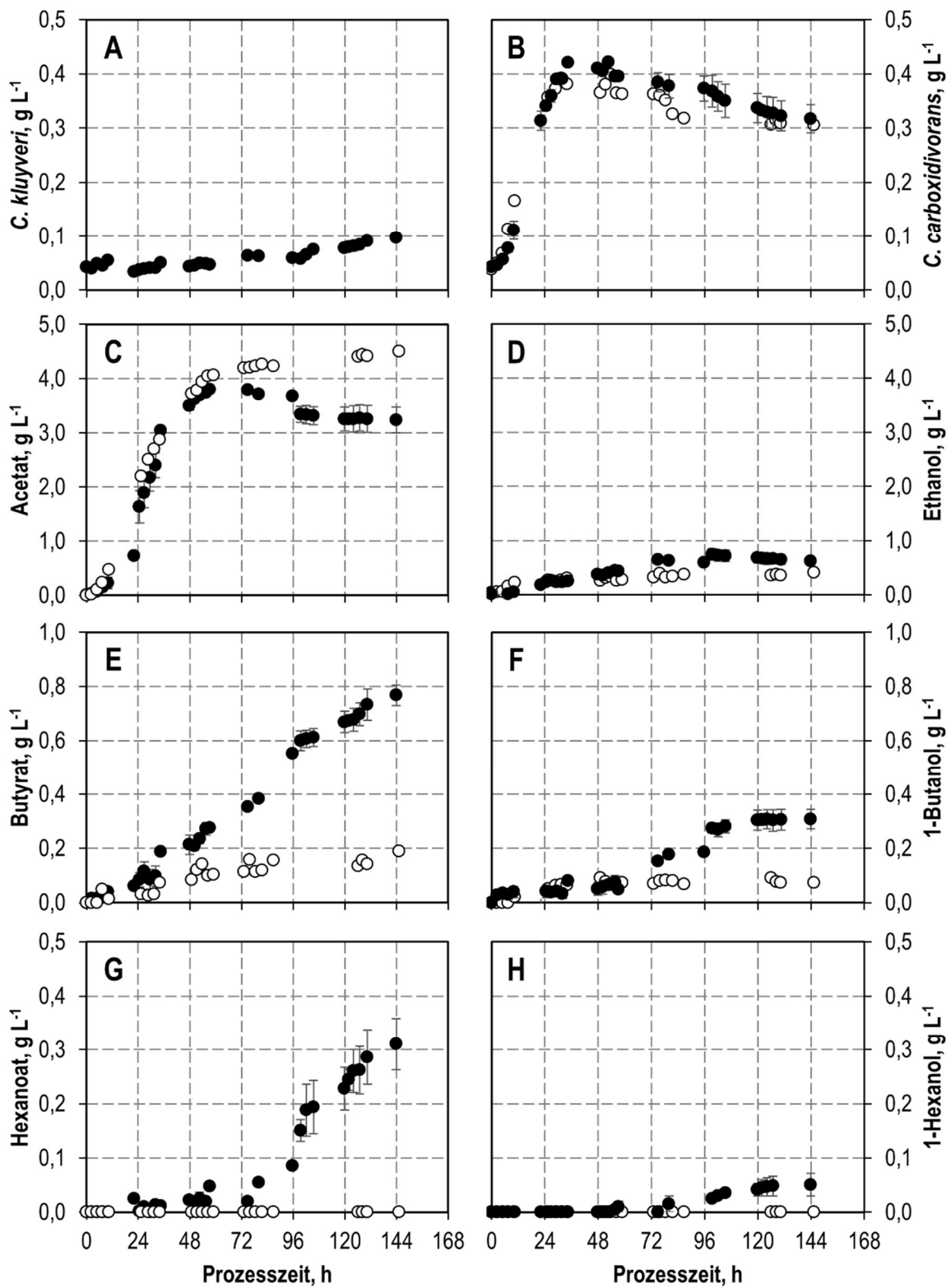


**Abbildung 6-2** Autotrophe Satzprozesse mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (schwarz) und einer Monokultur von *C. carboxidivorans* (weiß) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei einem CO-Partialdruck  $p_{\text{CO},\text{in}} = 800$  mbar. Die Fehlerbalken geben die Abweichung des Minimal- und Maximalwertes vom Mittelwert zweier unabhängiger Satzprozesse an. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (80:20 CO:CO<sub>2</sub>)).

Die endgültige Butanolkonzentration von  $0,8 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  in der Ko-Kultur war im Vergleich zur Monokultur von *C. carboxidivorans* um den Faktor 3,1 erhöht. Hexanol wurde nur in der Ko-Kultur produziert, was zu einer Konzentration von  $0,24 \text{ g L}^{-1}$  nach 144 Stunden führte. Insgesamt wurden von *C. carboxidivorans* in der Ko-Kultur 820 mmol CO verbraucht, verglichen mit 477 mmol CO in der Monokultur (Anstieg um den Faktor 1,7). Bei *C. carboxidivorans* war der CO-Verbrauch in der Ko-Kultur höher als in der Monokultur, wobei die Partialdrücke beider Gase in den Rührkesselreaktoren aufgrund der geringen Biomassekonzentrationen und der Überschussbegasung nicht wesentlich verringert wurde (s. Abb. 6-5). Die Kohlenstoffbilanzen wurden innerhalb des Schätzfehlers auf der Grundlage von biologischen Duplikaten mit einer Kohlenstoffrückgewinnung von 97 % mit der Ko-Kultur und 97 % mit der Monokultur von *C. carboxidivorans* geschlossen (s. Tabelle 6-1).

Entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 5.3 war bei einem Eingangs-CO-Partialdruck von 800 mbar kein Wachstum von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur zu verzeichnen. Daher wurde eine zweite Ko-Kultivierung mit einem reduzierten Eingangs-CO-Partialdruck von 100 mbar bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden wiederum zusammen mit den Ergebnissen eines Satzprozesses mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur bei gleicher Eingangsgaszusammensetzung verglichen (Abbildung 6-3). Die sich ergebenden Partialdrücke im Abgas sowie die Verbrauchsraten von CO und CO<sub>2</sub> der Ko-Kultur sind in Abbildung 6-5 dargestellt. Beide Prozesse wurden reproduziert, wobei keine Änderungen der Prozessleistungen innerhalb des Schätzfehlers auf der Grundlage der biologischen Duplikate festgestellt werden konnte.

Das Wachstum von *C. carboxidivorans* begann unmittelbar nach der Inokulation. Nach 48 Stunden wurde eine Biomassekonzentration von  $0,41 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Danach wurde sowohl in der Ko-Kultur als auch in der Reinkultur ein konstanter Rückgang von *C. carboxidivorans* beobachtet. Schließlich wurde die Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* um mehr als 30 % auf  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  gesenkt. Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* wurde bei *C. kluyveri* innerhalb der ersten 48 Stunden der Ko-Kultur kein signifikantes Wachstum beobachtet. Das Wachstum von *C. kluyveri* setzte erst nach längerer Verzögerungsphase ein und zeigte einen konstanten Anstieg der Biomassekonzentration, der nach 144 Stunden eine Biomassekonzentration von  $0,12 \text{ g L}^{-1}$  erreichte. Die Acetat- und Ethanolbildung war nach 48 Stunden in beiden Prozessen vergleichbar, während die Ethanolkonzentration in der Ko-Kultur nach 48 Stunden leicht reduziert war ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$  in der Ko-Kultur im Vergleich zu  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  in der Monokultur).

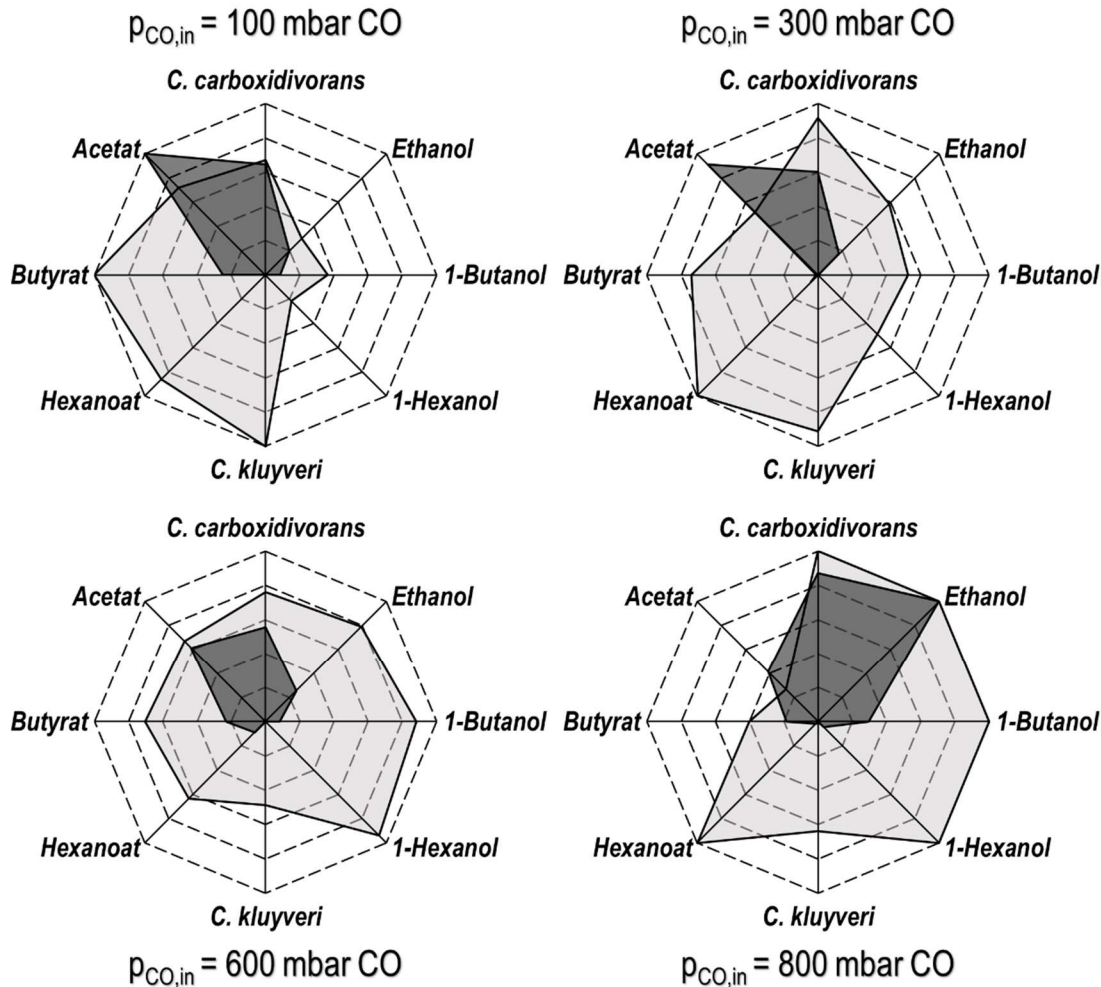


**Abbildung 6-3** Autotrophe Satzprozesse mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluuyveri* (schwarz) und einer Monokultur von *C. carboxidivorans* (weiß) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei einem CO-Partialdruck  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100$  mbar. Die Fehlerbalken geben die Abweichung des Minimal- und Maximalwertes vom Mittelwert zweier unabhängiger Satzprozesse an. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (10:20 CO:CO<sub>2</sub>)).

Obwohl *C. kluyveri* in den ersten 48 Stunden nicht wuchs, wurde die Bildung von Butyrat von Anfang an beobachtet und die Bildung von Hexanoat begann nach 72 Stunden, was auf eine Kettenverlängerungsaktivität von *C. kluyveri* hindeutete. Infolgedessen stiegen die Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen in der Ko-Kultur an, so dass nach 144 Stunden  $0,77 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat im Vergleich zu  $0,19 \text{ g L}^{-1}$  in der Monokultur von *C. carboxidivorans* und  $0,31 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat im Vergleich zu  $0 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurden. Mit Ausnahme von Butanol wurde in der Ko-Kultur mit 100 mbar CO in der Eingangsgasphase keine signifikant erhöhte Bildung von Alkoholen durch *C. carboxidivorans* beobachtet. Insgesamt wurden in der Ko-Kultur bei reduzierten CO- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Eingangsgasphase 472 mmol CO verbraucht, verglichen mit 820 mmol CO bei 80 % CO. Aufgrund des niedrigen CO-Einlasspartialdrucks (100 mbar) wurde der CO-Partialdruck im Rührkesselreaktor bis auf ein Minimum von 58 mbar reduziert. Die Kohlenstoffbilanzen wurden innerhalb des Schätzfehlers auf der Grundlage von biologischen Duplikaten mit einer Kohlenstoffausbeute von 96 % mit der Ko-Kultur geschlossen. Aus unbekanntem Gründen konnte die Kohlenstoffbilanz bei der Monokultur von *C. carboxidivorans* nur zu 93 % geschlossen werden.

Der Vergleich der relativen Endprodukt- und Biomassekonzentrationen der Satzprozesse von Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* mit *C. carboxidivorans* Reinkulturen sind in Abbildung 6-4 grafisch dargestellt, wobei die erzielten maximalen Biomasse- und Produktkonzentrationen bei initialen CO-Partialdrücken von 100 mbar, 300 mbar, 600 mbar und 800 mbar miteinander verglichen werden. Der höchste Wert wurde pro Produkt und Stamm auf 1 normiert und die anderen Werte daran bemessen. Alle maximalen Konzentrationen sowie die Gasaufnahmen und Säure:Alkohol-Verhältnisse sind in Tabelle 6-1 aufgelistet.

Die höchsten Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* konnten bei dem niedrigsten initialen CO-Partialdruck von 100 mbar erreicht werden, wohingegen die maximal erreichte Konzentration mit steigendem CO-Gehalt sank. Erstaunlicherweise war bei einem CO-Gehalt von 60 % im Eingangsvolumenstrom ein geringeres Wachstum als bei 80 % CO zu verzeichnen. Die Biomassekonzentrationen von *C. carboxidivorans* verhielten sich gegenläufig, indem die höchste Konzentration bei dem höchsten initialen CO-Partialdruck messbar war, wohingegen ein niedriger CO-Gasgehalt zu niedrigeren Konzentrationen führt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Reinkultur-Versuche mit *C. carboxidivorans*, konnten durch die Ko-Kultivierung zusammen mit *C. kluyveri* die maximalen Konzentrationen in jedem Fall gesteigert werden.



**Abbildung 6-4** Vergleich der Biomasse-Endkonzentrationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie der Endkonzentrationen von Alkoholen und organischen Säuren während der autotrophen Synthesegasumwandlung mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (hellgrau) sowie einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* (dunkelgrau) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei CO-Partialdrücken von  $p_{CO,in} = 100$  mbar,  $p_{CO,in} = 300$  mbar,  $p_{CO,in} = 600$  mbar und  $p_{CO,in} = 800$  mbar. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ ;  $t = 144 \text{ h}$ ). Die höchste erreichte Konzentration wurde auf 1 normiert.

Die Bildung von Acetat war insbesondere bei niedrigen CO-Partialdrücken in der *C. carboxidivorans* Reinkultur zu beobachten wohingegen Acetat bei Ko-Kultivierungen zusammen mit *C. kluyveri* deutlich aufgenommen und zu länger-kettigen Produkten umgesetzt wurde. Dies bestätigt sich in der um das Vierfache erhöhten Butyratkonzentration sowie einer ermöglichten Hexanoatkonzentrationen bei einem Anteil von 100 mbar CO im Eingangsvolumenstrom. Die höchsten Hexanoatkonzentrationen wurden mit  $0,36 \text{ g L}^{-1}$  bei Ko-Kultivierungen mit initialen CO-Konzentrationen von 300 mbar und 800 mbar erzielt. Die maximalen Alkoholkonzentrationen wurden mit jeder Erhöhung des initialen CO-Partialdrucks gesteigert, sodass die höchsten Werte bei 800 mbar CO sowohl für Ethanol, Butanol als auch für Hexanol erreicht werden konnten. Im Vergleich dazu

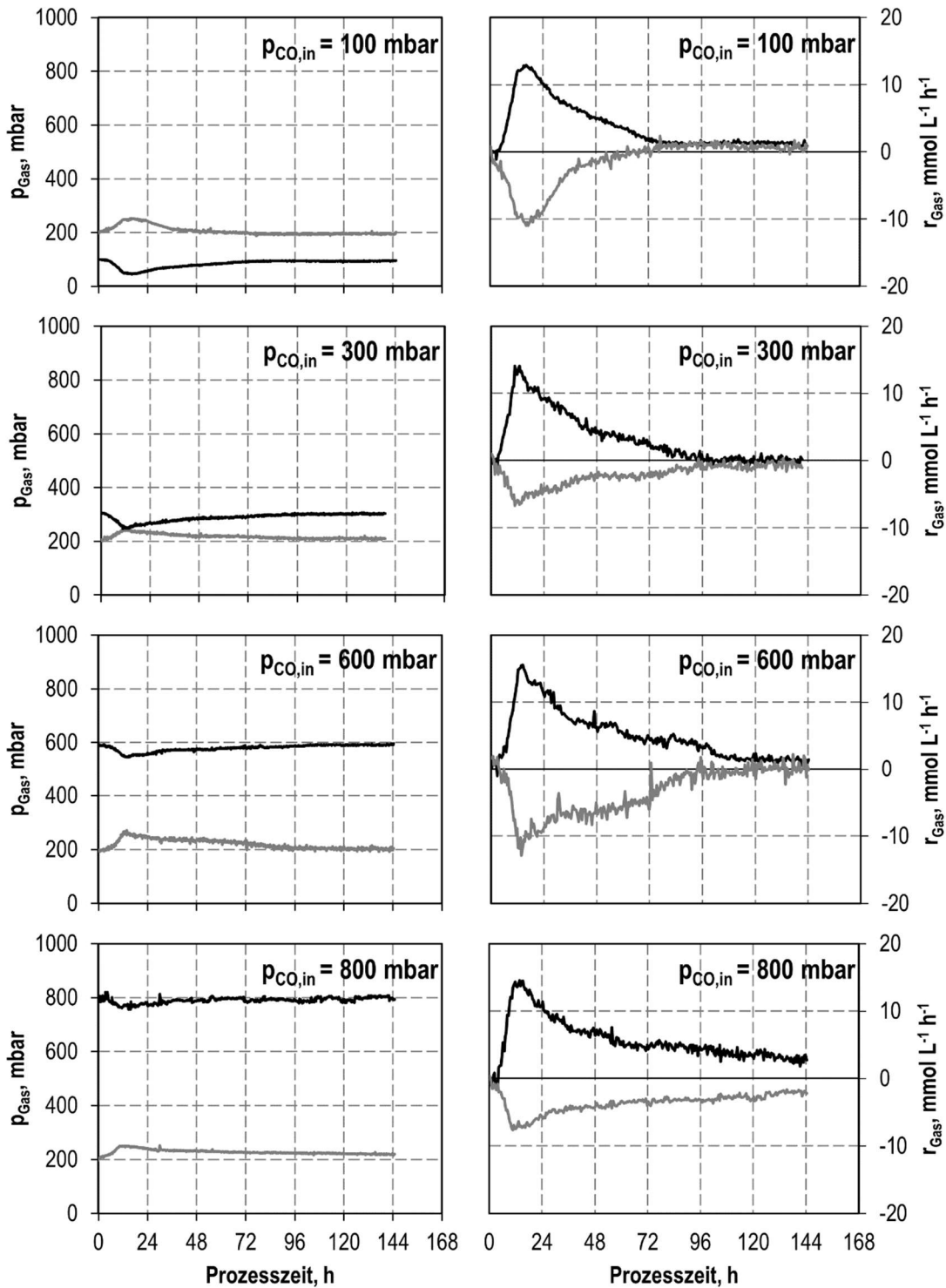
konnten in den Versuchen bei identischen Prozessbedingungen mit einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* bis 300 mbar CO keine längerkettigen Alkohole über Ethanol hinaus gemessen werden. Bei einem initialen CO Partialdruck von 600 mbar und 800 mbar konnten geringe Butanolkonzentrationen aber keine Hexanolbildung festgestellt werden.

Analog dazu zeigte sich Reduktion des aufgenommenen CO mit abnehmendem CO-Gehalt in der Gasphase. Während bei einer Ko-Kultivierung mit 800 mbar CO 820 mmol CO aufgenommen wurden, reduzierte sich die Aufnahme auf 728 mmol bei 600 mbar und weiter zu 454 mmol bei 300 mbar CO. Interessanterweise war die CO-Aufnahme bei 100 mbar CO mit 472 mmol wiederum leicht erhöht. Das gleiche Verhalten zeigt sich bei den Versuchen mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur, wobei die insgesamt aufgenommenen CO-Mengen mit Werten zwischen 340-475 mmol CO generell niedriger liegen (S. Tabelle 6-1).

### Diskussion

Der initiale CO-Partialdruck hat sowohl bei einer Satzkultivierung einer *C. carboxidivorans* Reinkultur als auch bei einer Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* einen großen Einfluss auf die Produktverteilung.

Die Verringerung des Eingangspartialdrucks auf 100 mbar CO erzielte das gewünschte verbesserte Wachstum von *C. kluyveri* bei pH 6,0 in Ko-Kultur. Im Vergleich zu den Ergebnissen der *C. kluyveri* Reinkultur bei identischen Bedingungen konnte sogar eine um den Faktor 1,4 erhöhte maximale Biomassekonzentration erzielt werden. Dies lässt sich durch die Aufnahme von CO durch *C. carboxidivorans* erklären. Durch die kontinuierliche CO-Aufnahme wurde ein Minimum von 58 mbar CO im Ausgangsvolumenstrom gemessen. Durch diese Aufnahme war der CO-Gehalt in der Flüssigphase, so weit reduziert, dass ein leicht verbessertes Wachstum von *C. kluyveri* eintreten konnte. Die Bildung der von Butyrat und Hexanoat kommt somit erhöht werden, wobei die Reduktion zu den korrespondierenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* bei diesem niedrigem CO-Partialdruck verringert war. Die Produktion der entsprechenden Alkohole ist aufgrund der eingeschränkten Wassergas-Shift-Reaktion in *C. carboxidivorans* bei niedrigen CO-Konzentrationen reduziert, was zu fehlenden Reduktionsäquivalenten führt. Wenn im Methylzweig des Wood-Ljungdahl-Wegs keine Oxidation von Kohlenmonoxid zu Kohlenstoffdioxid stattfindet, wird von *C. carboxidivorans* kein reduziertes Ferredoxin gebildet, was zu einem Mangel an Reduktionsäquivalenten und einer verminderten Fähigkeit zur Reduktion von Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen führt (Lee et al. 2008).



**Abbildung 6-5** Partialdrücke und Gasverbrauchsraten von CO (schwarz) und CO<sub>2</sub> (dunkelgrau) von autotrophen Satzprozessen in kontinuierlich begasteten Rührkessel-Bioreaktoren mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* mit CO-Partialdrücken  $p_{\text{CO,in}} = 100$  mbar,  $p_{\text{CO,in}} = 300$  mbar,  $p_{\text{CO,in}} = 600$  mbar und  $p_{\text{CO,in}} = 800$  mbar. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ ;  $t = 144 \text{ h}$ ).



Die bifurkierende Hydrogenase von *C. kluyveri* kann ebenfalls reduziertes Ferredoxin aus dem von *C. kluyveri* selbst produzierten  $H_2$  herstellen (s. Kapitel 3.2.2). Tatsächlich konnte eine Nettoproduktion von 8,5 mmol  $H_2$  während der Ko-Kultivierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist die Konzentration der vorhandenen Reduktionsäquivalente zu gering, um eine Reduktion der Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* zu ermöglichen. Darüber hinaus ist reduziertes Ferredoxin auch für die Schaffung eines Protonengradienten über die Zellmembran von *C. carboxidivorans* mittels des membrangebundenen RNF-Komplexes und der Nutzung der ATPase zur Erzeugung von ATP in der Acetogenese unerlässlich (Mock et al. 2015).

Die abnehmenden Biomassekonzentrationen von *C. carboxidivorans* bei niedrigen  $CO$ -Partialdrücken sowohl in Monokultur als auch in Ko-Kultur lassen sich durch die erhöhten Acetat- und Butyratkonzentrationen erklären. Es wurde berichtet, dass Konzentrationen von 4 g  $L^{-1}$  Acetat und 2 g  $L^{-1}$  Butyrat bereits die maximalen Biomassekonzentrationen von *C. carboxidivorans* in Satzprozessen mit anfänglich pH 6,0 ohne weitere pH-Kontrolle um 50 % reduzieren (Zhang et al. 2016), da undissoziierte Säuren in die Zelle diffundieren und intern dissoziieren, was sich negativ auf den für die ATP-Regeneration erforderlichen Ionengradienten auswirkt (Dürre 2005).

Eine leichte Erhöhung des initialen  $CO$ -Partialdrucks auf 300 mbar führte zu einer Erhöhung der maximalen Hexanoatkonzentration. Diese Beobachtung zeigt deutlich den Einfluss des Ethanol:Acetat-Verhältnisses, da bei diesen Ko-Kultivierungsversuchen zusätzlich vermehrt Ethanol durch *C. carboxidivorans* gebildet wurde. Das Ethanol:Acetat-Verhältnis und die Verfügbarkeit in der Ko-Kultur hat einen signifikanten Einfluss auf das Produktspektrum von *C. kluyveri*, da höhere Ethanol:Acetat-Verhältnisse zu einer erhöhten Butyratproduktion und einer reduzierten Hexanoatproduktion führen (Kucek et al. 2016; Bornstein und Barker 1948a; Weimer und Stevenson 2012; Yin et al. 2017). Butyryl-CoA wird durch die Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase vermehrt in Butyrat umgewandelt, was zu einer verminderten Verfügbarkeit von Butyryl-CoA für die Bildung von Hexanoyl-CoA führt (Bielzer 2019). Eine Folge des Ethanol:Acetat-Verhältnisses als Folge des erhöhten  $CO$ -Einlasspartialdrucks war daher eine verbesserte Kettenlänge der produzierten organischen Säuren (siehe Tabelle 6-1).

**Tabelle 6-1** Maximale Biomasse- und Produktkonzentrationen, maximale Alkohol:Säure-Verhältnisse sowie die kummulierte CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion nach 144 h Prozesszeit gemessen in autotrophen Monokulturen von *C. carboxidivorans* und Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in pH-kontrollierten Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung in Rührkesselreaktoren mit einem initialen CO-Partialdruck von 100 – 800 mbar CO.

	100 mbar		300 mbar		600 mbar		800 mbar	
	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.
BTM <sub><i>C. carboxidivorans</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,31	0,42 ± 0,01	0,29	0,52	0,26	0,44 ± 0,07	0,41	<b>0,48</b>
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	-	<b>0,11 ± 0,01</b>	-	0,10	-	0,07 ± 0,01	-	0,07
Acetat, g L <sup>-1</sup>	<b>4,5</b>	3,73 ± 0,03	4,11	3,35	2,76	3,15 ± 0,42	2,70 ± 0,17	3,01 ± 0,16
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	0,19	<b>0,77 ± 0,04</b>	0,01	0,57	0,18	0,64 ± 0,08	0,15 ± 0,05	0,48 ± 0,04
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	0	0,32 ± 0,07	0,02	0,36	0,03	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,01	<b>0,36 ± 0,03</b>
Ethanol, g L <sup>-1</sup>	0,41	0,75 ± 0,11	0,36	1,32	0,53	1,24 ± 0,49	2,09 ± 0,03	<b>2,11 ± 0,22</b>
Butanol, g L <sup>-1</sup>	0,07	0,32 ± 0,06	-	0,44	0,07	0,56 ± 0,18	0,25 ± 0,05	<b>0,84 ± 0,06</b>
Hexanol, g L <sup>-1</sup>	0	0,05 ± 0,02	-	0,12	-	0,08	-	<b>0,24 ± 0,01</b>
EtOH/AC, g g <sup>-1</sup>	0,09	0,31	0,09	0,53	0,19	<b>4,99</b>	0,77	1,74
ButOH/But, g g <sup>-1</sup>	0,39	0,55	-	0,84	0,39	0,87	1,67	<b>2,79</b>
HexOH/Hex, g g <sup>-1</sup>	-	0,27	-	0,48	-	0,35	-	<b>0,85</b>
CO-Aufnahme, mmol	376	472	340	454	384	728	475	<b>820</b>
CO <sub>2</sub> -Produktion, mmol	170	241	166	226	242	493	280	<b>571</b>
C-Wiederfindung, %	93	96	95	99	97	97	97	<b>97</b>

Durch die erhöhte Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten aufgrund der höheren CO-Konzentration im Eingangsgasstrom fand ebenfalls eine verbesserte Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* statt.

Bei einem initialen CO-Partialdruck von 600 mbar war die Fähigkeit zur Alkoholbildung von *C. carboxidivorans* deutlich erhöht. Auch wenn keine höheren Fettkonzentrationen gemessen werden konnten, kann eine stetige Aufnahme dieser Fettsäuren durch *C. carboxidivorans* nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere der Vergleich zu den Ergebnissen einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* zeigt, dass die Monokultur alleine nicht in der Lage, ist vergleichbare Alkoholkonzentrationen von Butanol und Hexanol zu bilden.

Die höchsten Endkonzentrationen von Alkoholen sowie von Hexanoat wurden bei einem hohem CO-Partialdruck von 800 mbar gemessen. Trotz der niedrigen Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur mit einem Verhältnis von 13 % *C. kluyveri* zu 87 % *C. carboxidivorans* nach 48 Stunden zeigte die Anwesenheit von *C. kluyveri* auch hier einen deutlich positiven Einfluss. Mittels Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* sowie der Reduktion von Butyrat und Hexanoat durch *C. carboxidivorans* zu Butanol und Hexanol wurde die Bildung längererkettiger Produkte in Ko-Kultur im Vergleich zu einem Satzprozess mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur unter den gleichen Reaktionsbedingungen erheblich verbessert. Die Konzentrationen der C4- und C6-Endprodukte wurden auf Kosten der C2-Produkte, hauptsächlich Acetat, erhöht (Abb. 6-4). Auch hier ist wieder die bevorzugte Bildung von Hexanoat gegenüber Butyrat bei einem höheren Ethanol:Acetat durch *C. kluyveri* zu verzeichnen. Trotz des hohen initialen CO-Partialdrucks und der damit verbundenen Inhibierung des Wachstums, lässt sich diese bemerkenswerte Kettenverlängerungsaktivität von *C. kluyveri* trotz niedriger Biomassekonzentrationen in der Ko-Kultur vermutlich damit begründen, dass die Kettenverlängerung auf Kosten der Biomasseerzeugung effizienter wird, um die verringerte ATP-Produktion auszugleichen (González-Cabaleiro et al. 2013; Gildemyn et al. 2017). Auch wenn eine Produktion von Hexanoat durch *C. carboxidivorans* bei einem niedrigeren pH möglich wäre (Doll et al. 2018), wurde dies bei einem pH 6,0 in einer Monokultur nicht beobachtet (Abb. 6-4).

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass die Anwesenheit von *C. kluyveri* in jedem Fall zu einer deutlichen Steigerung der längererkettigen Produktkonzentrationen geführt hat. Durch Anwendung einer Ko-Kultur wurde das Alkohol:Säure:Verhältnis im Vergleich zu einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* in jedem Fall deutlich gesteigert (s. Tabelle 6-1). Insbesondere bei einem Einlasspartialdruck von 800 mbar CO bei pH 6,0 wurde in

der Ko-Kultur trotz des eingeschränkten Wachstums von *C. kluyveri* eine starke Kettenverlängerungsaktivität beobachtet. Durch die Reduktion dieser Säuren zu den korrespondierenden Alkoholen von *C. carboxidivorans* konnten Endkonzentrationen von  $1,15 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat/Butanol und  $0,60 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat/Hexanol erreicht werden. Dies ist ein Anstieg um fast das Dreifache in Bezug auf die C4-Verbindungen im Vergleich zu einer Monokultur von *C. carboxidivorans*, sowie einer ermöglichten Bildung von C6-Verbindungen.

Eine von Diender et al. (2016) untersuchte synthetische Ko-Kultur aus *C. autoethanogenum* und *C. kluyveri* in Anaerobflaschen mit einem ebenfalls hohen anfänglichen CO-Partialdruck von 1100 mbar CO im Kopfraum führte zu Endproduktkonzentrationen von  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat und  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat sowie  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  Butanol und  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  Hexanol nach 12 Tagen. Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden nach der Verdopplung der Prozesszeit höhere Konzentrationen der Fettsäuren produziert, wobei jedoch erwähnt werden muss, dass zu Beginn  $4,9 \text{ g L}^{-1}$  Acetat zugesetzt wurden, um das Wachstum von *C. kluyveri* zu fördern. In Bezug auf Butanol konnten in dieser Arbeit bei *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* bereits nach einer Prozessdauer von 6 Tagen höhere Konzentrationen nachgewiesen werden, was auf eine bessere Verfügbarkeit von CO aufgrund des hohen Energieeintrags zurückzuführen sein könnte. Eine Verlängerung der Prozesszeit würde wahrscheinlich auch zu höheren Produktkonzentrationen führen, wie (Diender et al. 2016) gezeigt haben.

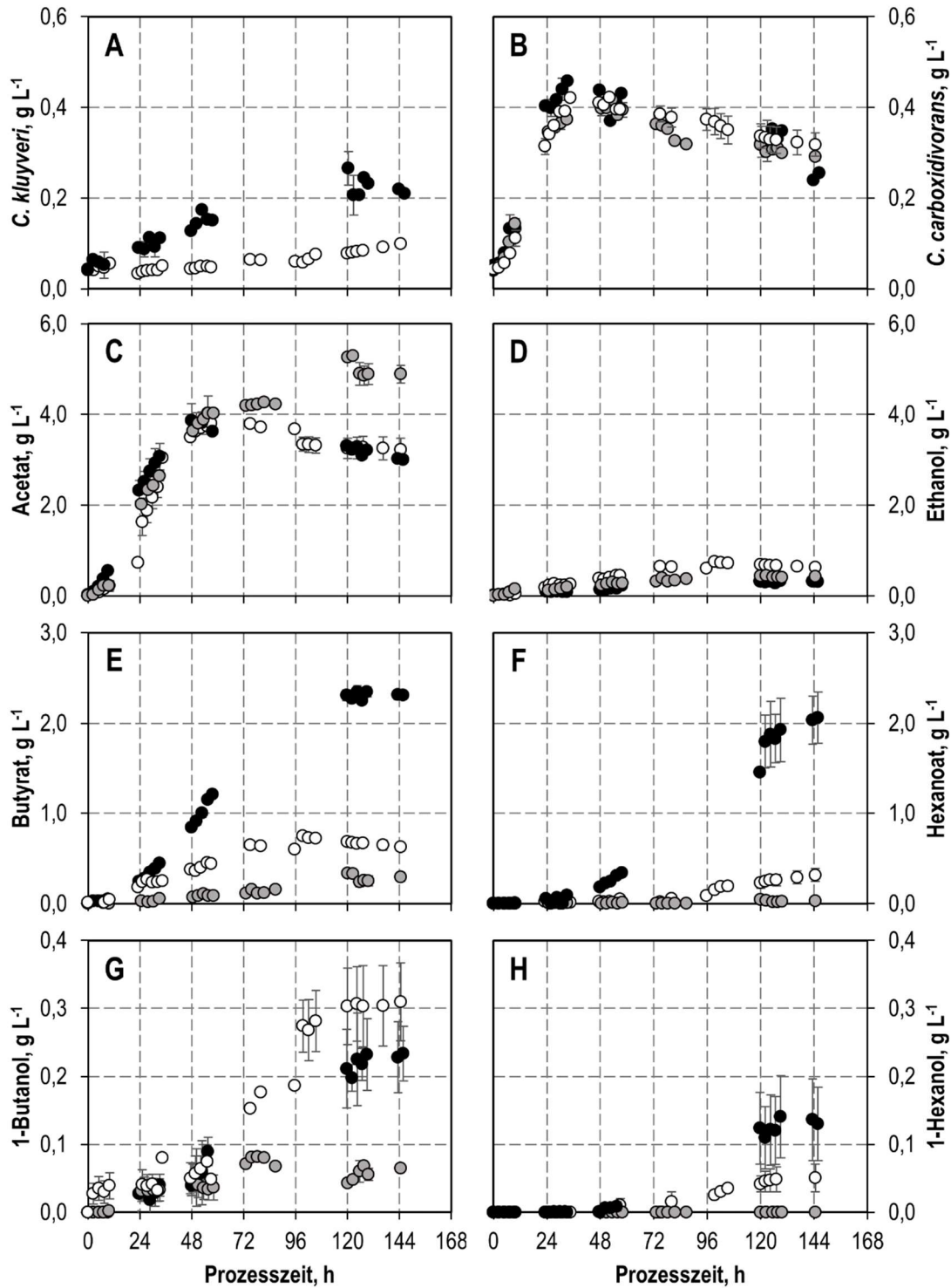
Eine Ko-Kultur aus *Clostridium aceticum* und *C. kluyveri* in einem Rührkesselreaktor bei pH 7,5 mit kontinuierlicher Begasung von 30 % CO, 5 % CO<sub>2</sub>, 15 % H<sub>2</sub> und 50 % N<sub>2</sub> erreichte maximale Konzentrationen  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat,  $8,2 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat und  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  Butanol nach einer Prozesszeit von 900 h unter zusätzlicher Ethanolzufuhr. Bei einem Vergleich der Butanolkonzentrationen konnten in dieser Arbeit bei einem vergleichbaren Eingangs-CO-Partialdruck von 30 %  $0,44 \text{ g L}^{-1}$  Butanol bereits nach 144 h produziert werden, wohingegen bei 80 % CO nach 144 h Prozess bereits eine um den Faktor 1,2 erhöhte Butanolkonzentration gemessen werden konnte ohne die Zugabe weiterer Substrate (Fernández-Blanco et al. 2022).

### 6.2.2. Variation des Gasvolumenstroms

Wie in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt, spielt die Anwesenheit von CO und dessen Verfügbarkeit im Medium eine wichtige Rolle bei der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*. Um den Einfluss des Gasvolumenstromes und der damit einhergehenden veränderten CO-Verfügbarkeit zu untersuchen, wurden die gleichen Ko-Kultivierungen wie in Abschnitt 6.2.1 mit sonst identischen Prozessparametern bei einem reduzierten Gasvolumenstrom von  $F_{\text{Gas}} = 0,042$  vvm im Gegensatz zu dem ursprünglichen Gasvolumenstrom von 0,083 vvm durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind vergleichend mit den Ergebnissen der Ko-Kultivierungen aus Abschnitt 6.2.1. in Abbildung 6-6 dargestellt. Da insbesondere eine weitere Reduktion des CO-Gehalts für eine erhöhte Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* vielversprechend sein könnte, sind die Ergebnisse bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar ausführlich in Abbildung 6-6 vergleichend mit den Ergebnissen bei 100 mbar CO einer *C. carboxidivorans* Reinkultur bei  $F_{\text{Gas}} = 0,042$  vvm sowie der Ko-Kultur bei  $F_{\text{Gas}} = 0,083$  vvm dargestellt.

Das Wachstum von *C. kluyveri* setzte bei einem reduzierten Gasvolumenstrom direkt ein und stieg bis zu der doppelten maximalen Biomassekonzentration von  $0,21 \text{ g L}^{-1}$  an. *C. carboxidivorans* begann ebenfalls unmittelbar nach der Inokulation der Ko-Kultur mit dem Wachstum.

Der Verlauf der Acetatbildung war nach 48 Stunden zunächst vergleichbar, wobei in den beiden Ko-Kultivierungen danach eine Konzentrationsabnahme hin zu  $3 \text{ g L}^{-1}$  gemessen wurde. Die Reinkultur von *C. carboxidivorans* zeigte jedoch bei einem reduzierten Gasvolumenstrom einen stetigen Anstieg bis zu einer finalen Konzentration von  $4,9 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  Acetat. Die finale Ethanolkonzentration war mit  $0,31 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  in der Ko-Kultur mit reduziertem Gasvolumenstrom gegenüber der Ergebnisse bei einem höheren Gasvolumenstrom um die Hälfte reduziert. Eine Betrachtung der Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen zeigte den deutlichsten Einfluss des reduzierten Volumenstroms, da hierdurch maximal  $2,35 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat und  $2,06 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat bei der Ko-Kultivierung gebildet werden konnten. In Reinkultur konnten hingegen lediglich Konzentrationen von  $0,30 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat und  $0,03 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat produziert werden. Entsprechend gering fiel ebenfalls die Bildung der Alkohole in der Reinkultur von *C. carboxidivorans* aus. Im Gegensatz dazu führte die Wiederaufnahme von Butyrat und Hexanoat durch *C. carboxidivorans* Ko-Kultur zu  $0,23 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  Butanol und  $0,13 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  Hexanol nach einer Prozesszeit von 144 h.



**Abbildung 6-6** Autotrophe Satzprozesse mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* bei reduziertem Gasvolumenstrom von  $F_{\text{gas}} = 0,042$  vvm (schwarz) und einer Monokultur von *C. carboxidivorans* bei  $F_{\text{gas}} = 0,042$  vvm (grau) im Vergleich zu einer Ko-Kultur bei dem erhöhten Gasvolumenstrom von  $F_{\text{gas}} = 0,083$  vvm (weiß) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei einem  $\text{CO}$ -Partialdruck  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100$  mbar. Die Fehlerbalken geben die Abweichung des Minimal- und Maximalwertes vom Mittelwert zweier unabhängiger Satzprozesse an. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 10,5 - 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 - 0,083$  vvm (10:20  $\text{CO}:\text{CO}_2$ )).

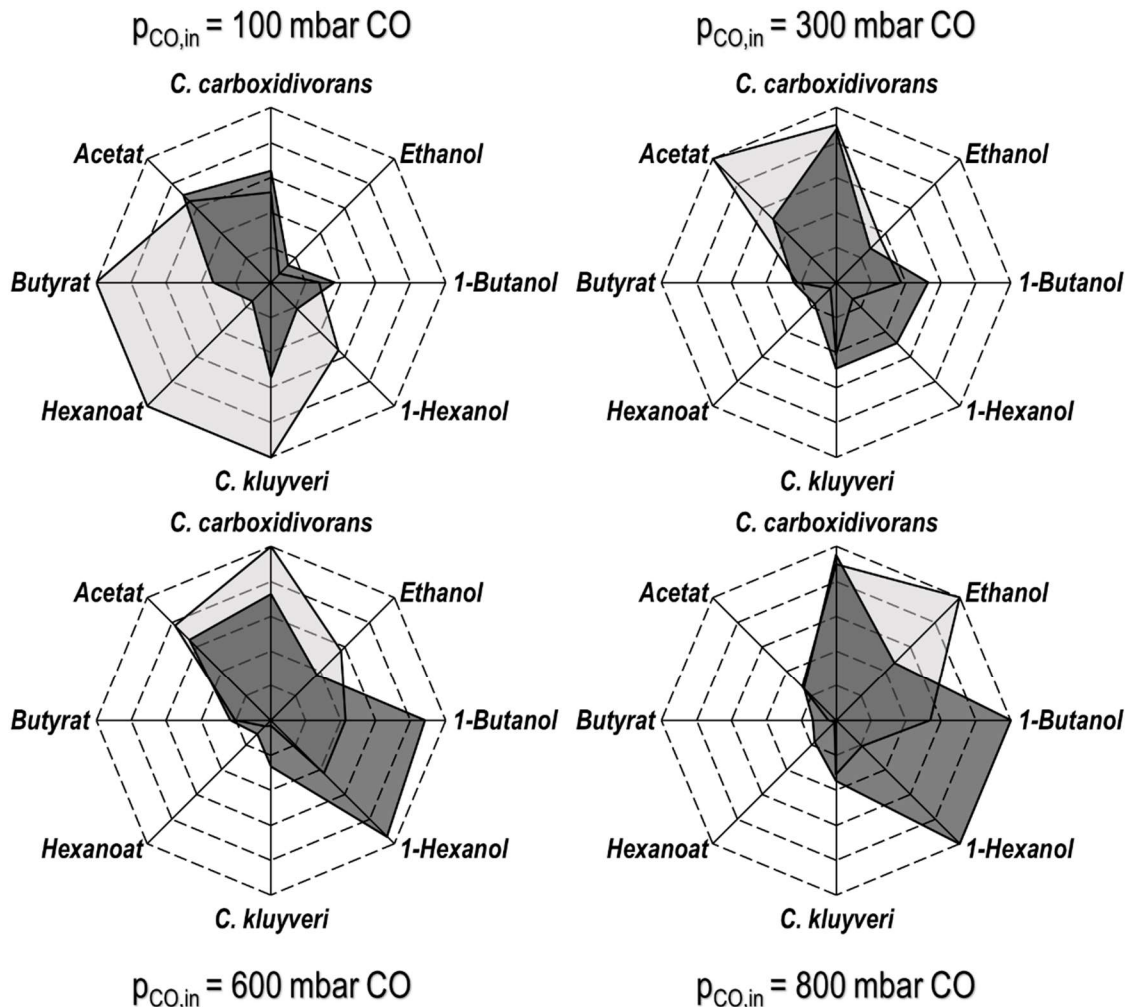
Die relativen Endprodukt- und Biomassekonzentrationen der Satzprozesse von Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* mit einem reduzierten Gasvolumenstrom sind vergleichend mit den Ergebnissen der Versuche mit einem erhöhten Gasvolumenstrom bei initialen CO-Partialdrücken von 100 mbar, 300 mbar, 600 mbar und 800 mbar in Abbildung 6-7 grafisch dargestellt. Der höchste Wert wurde pro Produkt und Stamm auf 1 normiert und die anderen Werte daran bemessen. Alle maximalen Konzentrationen sowie die Gasaufnahmen und Säure:Alkohol-Verhältnisse sind in Tabelle 6-2 aufgelistet.

**Tabelle 6-2** Maximale Biomasse- und Produktkonzentrationen, maximale Alkohol:Säure-Verhältnisse sowie die kummulierte CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion gemessen in autotrophen Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in pH-kontrollierten Satzprozessen mit reduzierter kontinuierlicher Begasung in Rührkesselreaktoren mit einem initialen CO-Partialdrücken von 100 - 800 mbar CO. (T = 37°C; pH = 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10,5 W L<sup>-1</sup>; F<sub>gas</sub> = 0,042 vvm; t = 144 h).

p <sub>CO,in</sub>	100 mbar	300 mbar	600 mbar	800 mbar
BTM <sub><i>C. carboxidivorans</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,46 ± 0,01	0,51	<b>0,52 ± 0,02</b>	0,51 ± 0,01
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	<b>0,21 ± 0,01</b>	0,10	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Acetat, g L <sup>-1</sup>	3,87 ± 0,37	<b>5,01</b>	3,98 ± 1,22	3,40 ± 0,74
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	<b>2,35 ± 0,05</b>	0,52	0,62 ± 0,04	0,15 ± 0,01
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	<b>2,06 ± 0,28</b>	0,10	0,10 ± 0,07	0,05 ± 0,01
Ethanol, g L <sup>-1</sup>	0,33 ± 0,02	1,60	2,52 ± 1,84	<b>4,44 ± 0,18</b>
Butanol, g L <sup>-1</sup>	0,23 ± 0,04	0,31	0,36 ± 0,02	<b>0,45 ± 0,10</b>
Hexanol, g L <sup>-1</sup>	<b>0,13 ± 0,05</b>	0,03	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,03
EtOH/AC, g g <sup>-1</sup>	0,10	0,35	0,74	<b>3,54</b>
ButOH/But, g g <sup>-1</sup>	0,12	0,61	0,84	<b>5,57</b>
HexOH/Hex, g g <sup>-1</sup>	0,08	1,30	0,50	<b>2,03</b>
CO-Aufnahme, mmol	806	656	679	662
CO <sub>2</sub> -Produktion, mmol	437	361	377	368
C-Wiederfindung, %	99	98	98	97

Neben einer Verdopplung der maximal erzielten Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* durch eine Reduktion des Gasvolumenstroms konnten die Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen in der Ko-Kultur bei einem Eingangs-CO-Partialdruck von 100 mbar um die Faktoren 3,1 und 6,4 erhöht werden. Auch wenn die maximale Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* leicht reduziert war, war die Bildung von Hexanol hier um das 2,6-fache erhöht. Bereits bei einer Erhöhung auf 300 mbar CO im Eingangsgasvolumenstrom verschob sich das Produktspektrum der Ko-Kultur weg von den C4-C6

Produkten hin zu Acetat als Hauptprodukt. Bei einer vergleichbaren Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* wurde die Fähigkeit der Alkoholbildung durch eine Erhöhung des Gasvolumenstroms bereits verbessert.



**Abbildung 6-7** Vergleich der Biomasse-Endkonzentrationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie der Endkonzentrationen von Alkoholen und organischen Säuren während der autotrophen Synthesegasumwandlung mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* bei einem reduzierten Gasvolumenstrom von  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (hellgrau) sowie bei einem Gasvolumenstrom von  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (dunkelgrau) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei CO-Partialdrücken von  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO},\text{in}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO},\text{in}} = 600 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{CO},\text{in}} = 800 \text{ mbar}$ . ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 10,5 - 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 - 0,083 \text{ vvm}$ ;  $t = 144 \text{ h}$ ). Die höchste Konzentration wurde auf 1 normiert.

Bei einem initialen CO-Partialdruck von 600 mbar war ebenfalls eine vermehrte Bildung der C2-Produkte durch einen reduzierten Gasvolumenstrom zu verzeichnen, wobei aufgrund des höheren CO-Gehalts neben Acetat nun auch Ethanol gebildet wurde. Das Wachstum von *C. carboxidivorans* führte unter diesen Versuchsbedingungen zu der höchsten maximalen Biomassekonzentration. Die Erhöhung des Gasvolumenstroms hatte hier einen noch deutlicheren Einfluss auf die Verschiebung des Produktspektrums,

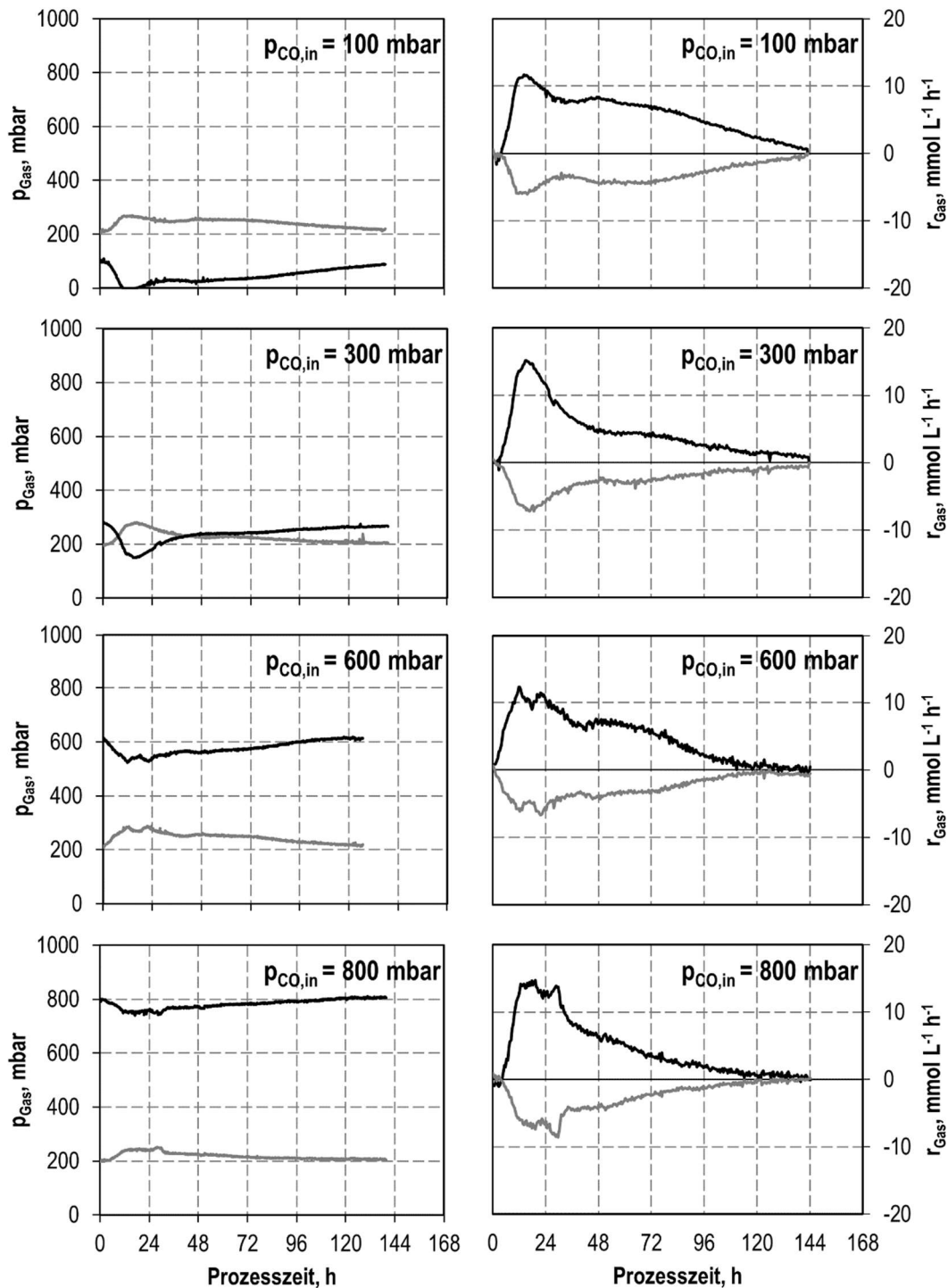


da hier deutlich höhere Konzentrationen der längerkettigen Alkohole Butanol und Hexanol verzeichnet werden konnten. Unter diesen Versuchsbedingungen war zu Versuchsende fast keine Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* mehr nachzuweisen. Das gleiche Verhalten ist bei dem höchsten untersuchten CO-Partialdruck von 800 mbar zu beobachten: Während ein Gasvolumenstrom von 0,042 vvm zu hohen *C. carboxidivorans* und hohen Ethanolkonzentrationen führte, konnte mit einem erhöhten Gasvolumenstrom von 0,083 vvm ein klarer Trend zur Bildung von Butanol und Hexanol bei gleichbleibender Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* erkannt werden. Die Biomassekonzentration von *C. kluyveri* war bei beiden Gasvolumenströmen gleichbleibend konstant.

Die Partialdrücke sowie die Gasaufnahmeleistungen von CO und CO<sub>2</sub> sind in Abbildung 6-8 gezeigt. Eine Betrachtung des aufgenommenen CO zeigte bei einem Gasvolumenstrom von 0,042 vvm zwischen 300-800 mbar vergleichbare Konzentrationen, wohingegen die CO-Aufnahme bei 100 mbar CO mit 806 mmol um das 1,2-fache gegenüber 662 mmol bei 800 mbar CO im Zulaufvolumenstrom erhöht war (Tabelle 6-2). Im Fall der geringsten CO-Konzentration konnte zum einen eine zeitweise komplette Aufnahme von CO verzeichnet werden (16-22 h der Prozesszeit) sowie eine erhöhte Aufnahmeleistung von CO für eine längere Zeit im Vergleich zu den anderen Prozessen. Verglichen mit den CO-Aufnahmen bei einem Gasvolumenstrom von 0,083 vvm führte eine Reduktion des Gasvolumenstroms insgesamt zu einer erhöhten Kohlenstofffixierung von durchschnittlich 315 mmol im Gegensatz zu 236 mmol. Bei dem niedrigsten initialen CO-Partialdruck von 100 mbar wurde mit 806 mmol sogar eine um den Faktor 1,7 erhöhte CO-Aufnahme ermittelt, wohingegen bei einem CO-Partialdruck von 800 mbar die CO-Aufnahme mit 662 mmol um 19 % reduziert war (s. Tabelle 6-2 und 6-1).

## Diskussion

Insbesondere bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar konnte für einen kurzen Zeitraum kein CO mehr im Abgas gemessen werden (Abb. 6-8). Das bedeutet, dass der Gehalt an CO in der Flüssigphase deutlich reduziert wurde, sodass aufgrund der Aktivität von *C. carboxidivorans* sogar eine zeitweise komplette Aufnahme von CO verzeichnet werden konnte. Dadurch war eine maximale Wachstumsrate von *C. kluyveri* mit 0,10 h<sup>-1</sup> sowie eine deutlich erhöhte Kettenverlängerung von 0,76 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Butyrat und 0,57 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Hexanoat möglich (s. Tabelle 6-3). Unter diesen Prozessbedingungen war sogar eine erhöhte Hexanol-Bildung zu beobachten, welche sich durch den Effekt der adaptiven Antwort auf den inhibitorischen Effekt des gebildeten Hexanoats durch *C. kluyveri* erklären lässt. *C. carboxidivorans* ist dadurch gezwungen, Hexanoat zu dem korrespondierenden Alkohol Hexanol zu reduzieren um den lebenswichtigen Protonengradienten der Zelle zu schützen (Dürre 2005; Kumar et al. 2014).



**Abbildung 6-8** Partialdrücke und Gasverbrauchsraten von CO (schwarz) und CO<sub>2</sub> (dunkelgrau) von autotrophen Satzprozessen in kontinuierlich begasten Rührkessel-Bioreaktoren mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* mit CO-Partialdrücken  $p_{\text{CO,in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO,in}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO,in}} = 600 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{CO,in}} = 800 \text{ mbar}$  bei einem reduzierten Gasvolumenstrom  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ . ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P_{V^{-1}} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (20% CO<sub>2</sub>);  $t = 144 \text{ h}$ ).

Auch wenn insgesamt ein erhöhter Umsatz der Gase CO und CO<sub>2</sub> festgestellt werden konnte, hat sich das ausgebildete Produktspektrum der Ko-Kultur in Abhängigkeit des eingestellten Gasvolumenstroms in Richtung der C<sub>2</sub>-Produkte verschoben. Durch eine

Verringerung des Gasvolumenstrom und des damit verbundenen CO-Gehalts wurden zusätzlich weniger Reduktionsäquivalente für eine erfolgreiche Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* bereitgestellt, sodass die gebildete Produktpalette beschränkt wurde. Auch bei einem hohen Eingangs-CO-Partialdruck von 800 mbar war zwar die volumetrische Produktbildungsrate von Ethanol mit  $1,09 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  um den Faktor 1,8 erhöht, aber die Produktbildungsraten von Butanol und Hexanol betragen nur noch 58 % und 12,5 % der mit einem hohen Gasvolumenstrom erreichten Produktivitäten (s. Tabelle 6-3).

**Tabelle 6-3** Maximale Wachstums- und maximale volumetrische Produktbildungsraten gemessen in autotrophen Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in pH-kontrollierten Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung in Rührkesselreaktoren mit einem initialen CO-Partialdruck von 100, 300, 600 und 800 mbar CO bei variierenden Gasvolumenströmen. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 10,5 - 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042\text{-}0,083 \text{ vvm}$  (20%  $\text{CO}_2$ );  $t = 144 \text{ h}$ ).

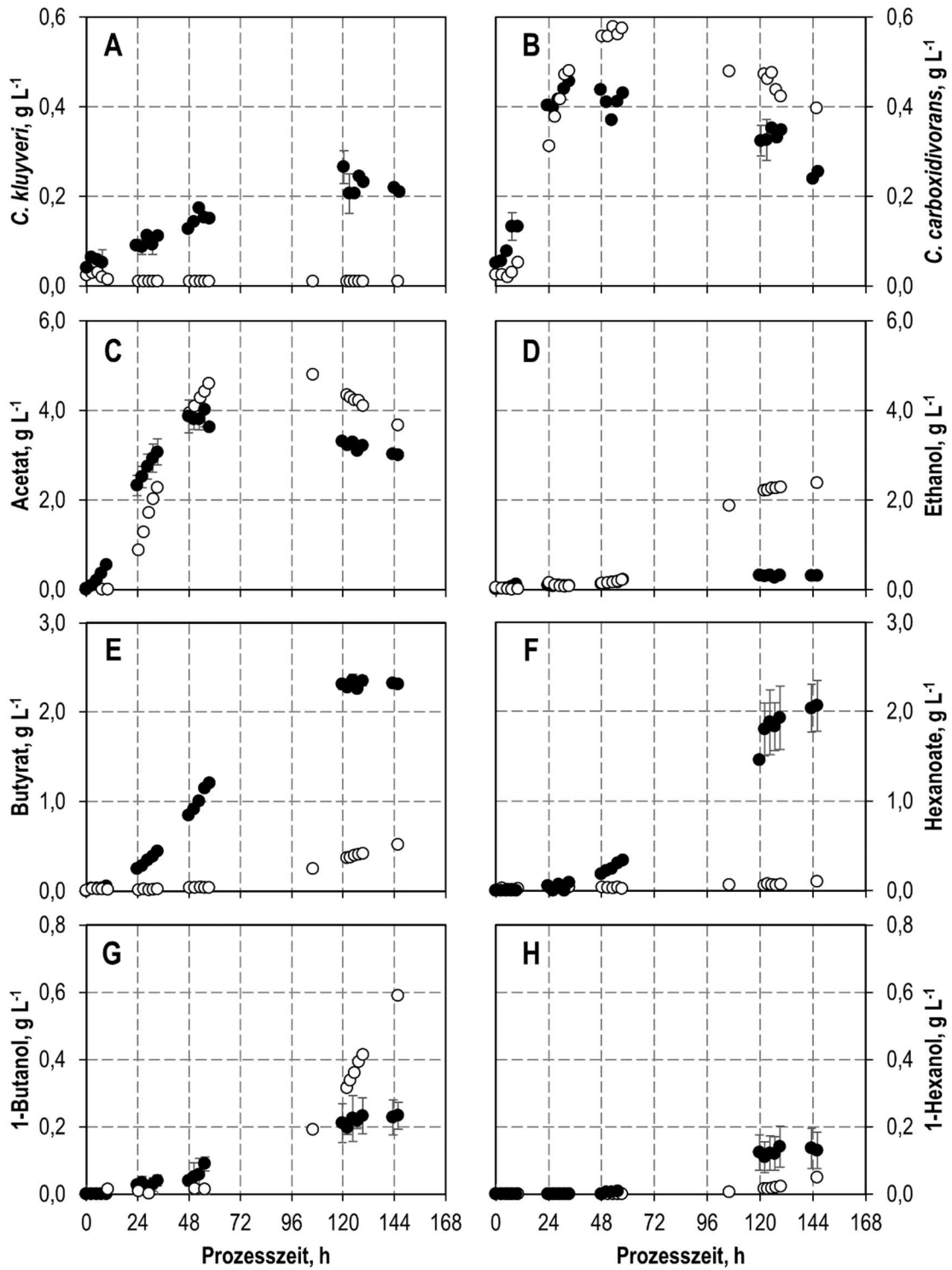
	100 mbar		300 mbar		600 mbar		800 mbar	
	0,042	0,083	0,042	0,083	0,042	0,083	0,042	0,083
	vvm	vvm	vvm	vvm	vvm	vvm	vvm	vvm
$\mu_{\text{max}, C. carboxidivor.}, \text{ h}^{-1}$	0,14	0,14	<b>0,27</b>	0,20	0,21	0,16	0,18	0,19
$\mu_{\text{max}, C. kluyveri}, \text{ h}^{-1}$	<b>0,10</b>	0,08	0,07	0,07	0,04	0,03	0,06	0,07
$r_{\text{max. Acetat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	2,71	3,75	<b>3,95</b>	2,44	2,88	3,37	3,22	4,15
$r_{\text{max. Butyrat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	<b>0,76</b>	0,18	0,12	0,17	0,15	0,38	0,06	0,51
$r_{\text{max. Hexanoat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	<b>0,57</b>	0,17	0,03	0,11	0,04	0,06	-	0,12
$r_{\text{max. Ethanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,07	0,25	0,39	0,37	0,63	0,74	<b>1,09</b>	0,59
$r_{\text{max. Butanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,06	0,12	0,08	0,11	0,10	0,15	0,19	<b>0,33</b>
$r_{\text{max. Hexanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,05	0,02	0,02	0,03	0,04	0,05	0,01	<b>0,08</b>

### 6.2.3. Zusätzliche Wasserstoffbereitstellung

Die Ergebnisse aus den beiden vorherigen Kapiteln haben gezeigt, dass die Verwendung niedriger CO-Partialdrücke in Kombination mit einem geringeren Gasvolumenstrom für das Wachstum sowie eine gute Kettenverlängerungsaktivität von *C. kluyveri* erforderlich sind. Dies führte zu einer verringerten Alkoholbildungsfähigkeit durch *C. carboxidivorans*. Da das Ethanol:Acetat-Verhältnis aber einen entscheidenden Einfluss auf die Länge der gebildeten Fettsäure durch *C. kluyveri* hat, muss die Ethanolproduktion von *C. carboxidivorans* gesteigert werden. Hierfür wurde eine zusätzliche Begasung mit Wasserstoff für eine kontinuierliche Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für *C. carboxidivorans* untersucht. Dabei wurde eine Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* im vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor untersucht, wobei die Begasung mit  $F_{\text{gas}} = 0,042$  vvm und die Gaszusammensetzung mit 10 % CO, 20 % CO<sub>2</sub>, 50 % N<sub>2</sub> sowie 20 % H<sub>2</sub> gewählt wurde. Als Referenzprozess wird eine Ko-Kultivierung ohne H<sub>2</sub> bei sonst identischen Reaktionsbedingungen in Abb. 6-9 gezeigt.

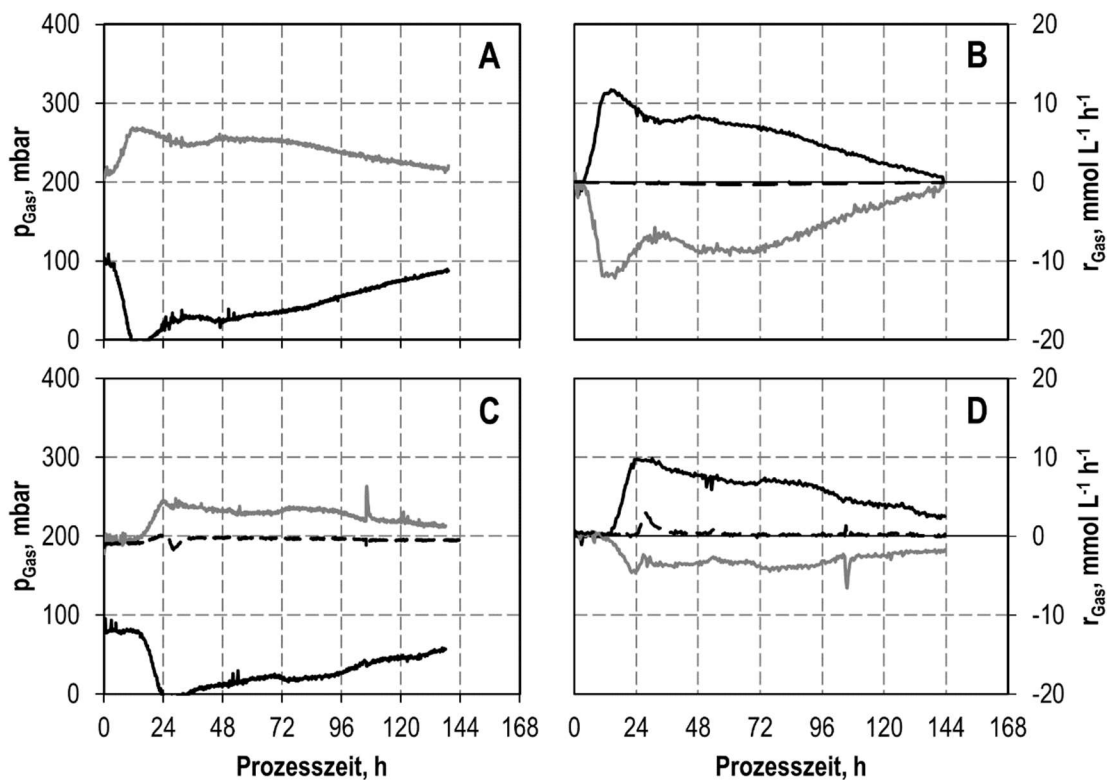
Während *C. kluyveri* im Referenzprozess mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,10 h<sup>-1</sup> eine maximale Biomassekonzentration von 0,21 g L<sup>-1</sup> erreichte, war in der Ko-Kultur mit zusätzlicher Wasserstoffbegasung ein Rückgang der Biomassekonzentration zu beobachten. Nach 24 h konnte *C. kluyveri* nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte *C. carboxidivorans* nach einer kurzen Verzögerungszeit ein starkes Wachstum bis zu einer maximalen Biomassekonzentration von 0,58 g L<sup>-1</sup> nach 58 h. Anschließend war auch hier ein Rückgang der Zellkonzentration zu beobachten. Die Acetatproduktion erreichte mit 4,80 g L<sup>-1</sup> eine 1,24-fach erhöhte Maximalkonzentration im Vergleich zum Referenzprozess. Diese sank im Anschluss wieder auf eine finale Konzentration von 3,67 g L<sup>-1</sup>. Mit zusätzlicher Wasserstoffbegasung konnte eine Erhöhung der maximal erreichten Konzentration um das 7,2-fache auf eine Maximalkonzentration von 2,38 g L<sup>-1</sup> erzielt werden.

Während im Referenzprozess hohe Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen erreicht wurden, führte eine zusätzliche Begasung mit Wasserstoff zu einer Reduktion um 78 % und 95 % für Butyrat und Hexanoat. Dennoch konnte eine um den Faktor 2,6 erhöhte Butanolbildung bis zu einer maximalen Konzentration von 0,59 g L<sup>-1</sup> nachgewiesen werden, während die Hexanolproduktion durch eine Wasserstoffzugabe mit maximal 0,05 g L<sup>-1</sup> nicht erhöht werden konnte.



**Abbildung 6-9** Autotrophe Satzprozesse mit einer Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei einem initialen CO-Partialdruck  $p_{\text{CO},\text{in}} = 100$  mbar mit zusätzlicher Begasung von 200 mbar H<sub>2</sub> (weiß) sowie ohne zusätzliche Wasserstoffbegasung (schwarz). Die Fehlerbalken geben die Abweichung des Minimal- und Maximalwertes vom Mittelwert zweier unabhängiger Satzprozesse an. ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (10:20 CO:CO<sub>2</sub>)).

Ein Vergleich der Partialdrücke von CO und CO<sub>2</sub> zeigt zum Zeitpunkt der vollständigen CO-Aufnahme eine zeitlich begrenzte Aufnahme von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> bei einer zusätzlichen Begasung mit Wasserstoff (Abb. 6-10). Insgesamt wurden dabei 48,5 mmol Wasserstoff aufgenommen, während im Referenzprozess 50,9 mmol Wasserstoff produziert wurden. Die Aufnahme von CO war mit 733 mmol bei zusätzlicher Wasserstoffbegasung gegenüber dem Referenzprozess um 9 % reduziert (Tabelle 6-4).



**Abbildung 6-10** Partialdrücke und Gasverbrauchsraten von CO (schwarz), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau) und H<sub>2</sub> (gestrichelt) von autotrophen Satzprozessen in kontinuierlich begasteten Rührkessel-Bioreaktoren mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* ohne zusätzliche Wasserstoffbegasung (A+B) sowie mit zusätzlicher Begasung von 200 mbar H<sub>2</sub> (C+D). (T = 37°C; pH = 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10,5 W L<sup>-1</sup>; F<sub>gas</sub> = 0,042 vvm (10:20 CO:CO<sub>2</sub>)).

## Diskussion

Die gemessenen Partialdrücke am Reaktorausgang sowie die Gasaufnahmeleistungen haben gezeigt, dass keine simultane Aufnahme von CO und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> stattfindet. Erst bei einer vollständigen Aufnahme von CO kommt es zu einer Aufnahme von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Dieser Umstand könnte auf eine reversible Bindung von CO in den aktiven Zentren der Hydrogenasen und einer damit verbundenen unterdrückten H<sub>2</sub>-Aufnahme zurückzuführen sein (Ragsdale 2004; Bennett et al. 2000).

Da der Acetyl-CoA-Stoffwechselweg Wasserstoff als Energiequelle und zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten nutzt, führte eine zusätzliche Zufuhr von H<sub>2</sub> zu einer erhöhten Alkoholbildungsfähigkeit durch *C. carboxidivorans*. Entsprechend der Erwartungen konnte dadurch die Bildung von Ethanol und sogar Butanol gesteigert werden. Eine Erhöhung der Hexanolkonzentration war nicht zu verzeichnen, wobei eine Reinkultur von *C. carboxidivorans* unter diesen Bedingungen bisher auch noch keine Bildung von C6-Verbindungen gezeigt hat. Daher lässt sich dies durch die fehlende Anwesenheit von *C. kluyveri* erklären. Denn obwohl H<sub>2</sub> ein essenzieller Bestandteil des Energiestoffwechsels von *C. kluyveri* ist, lässt sich anhand der Ergebnisse eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum und die Produktbildung von *C. kluyveri* durch zusätzliche Begasung mit Wasserstoff feststellen. Dies deckt sich auch mit früheren Erkenntnissen, bei denen die Anwesenheit von H<sub>2</sub> nicht nur als inhibierend für das Wachstum von *C. kluyveri* sondern auch für die Kettenverlängerungsaktivität beobachtet wurde (Angenent et al. 2016; Schoberth und Gottschalk 1969).

**Tabelle 6-4** Maximale Biomasse- und Produktkonzentrationen, maximale Alkohol:Säure-Verhältnisse sowie die kummulierte CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion gemessen in autotrophen Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in pH-kontrollierten Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung in Rührkesselreaktoren mit und ohne zusätzlicher Wasserstoffbegasung bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar CO. (T = 37°C; pH = 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10,5 W L<sup>-1</sup>; F<sub>gas</sub> = 0,042 vvm (10:20 CO:CO<sub>2</sub>); t = 144 h).

pH <sub>2,in</sub>	0 mbar	200 mbar
BTM <sub><i>C. carboxidivorans</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,46 ± 0,01	<b>0,58</b>
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	<b>0,21 ± 0,01</b>	0,01
Acetat, g L <sup>-1</sup>	3,87 ± 0,37	<b>4,80</b>
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	<b>2,35 ± 0,05</b>	0,52
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	<b>2,06 ± 0,28</b>	0,10
Ethanol, g L <sup>-1</sup>	0,33 ± 0,02	<b>2,38</b>
Butanol, g L <sup>-1</sup>	0,23 ± 0,04	<b>0,59</b>
Hexanol, g L <sup>-1</sup>	<b>0,13 ± 0,05</b>	0,05
EtOH/Ac, g g <sup>-1</sup>	0,10	<b>0,65</b>
ButOH/But, g g <sup>-1</sup>	0,12	<b>1,13</b>
HexOH/Hex, g g <sup>-1</sup>	0,08	<b>0,49</b>
CO-Aufnahme, mmol	806	733
CO <sub>2</sub> -Produktion, mmol	437	425
C-Bilanz, %	99	97

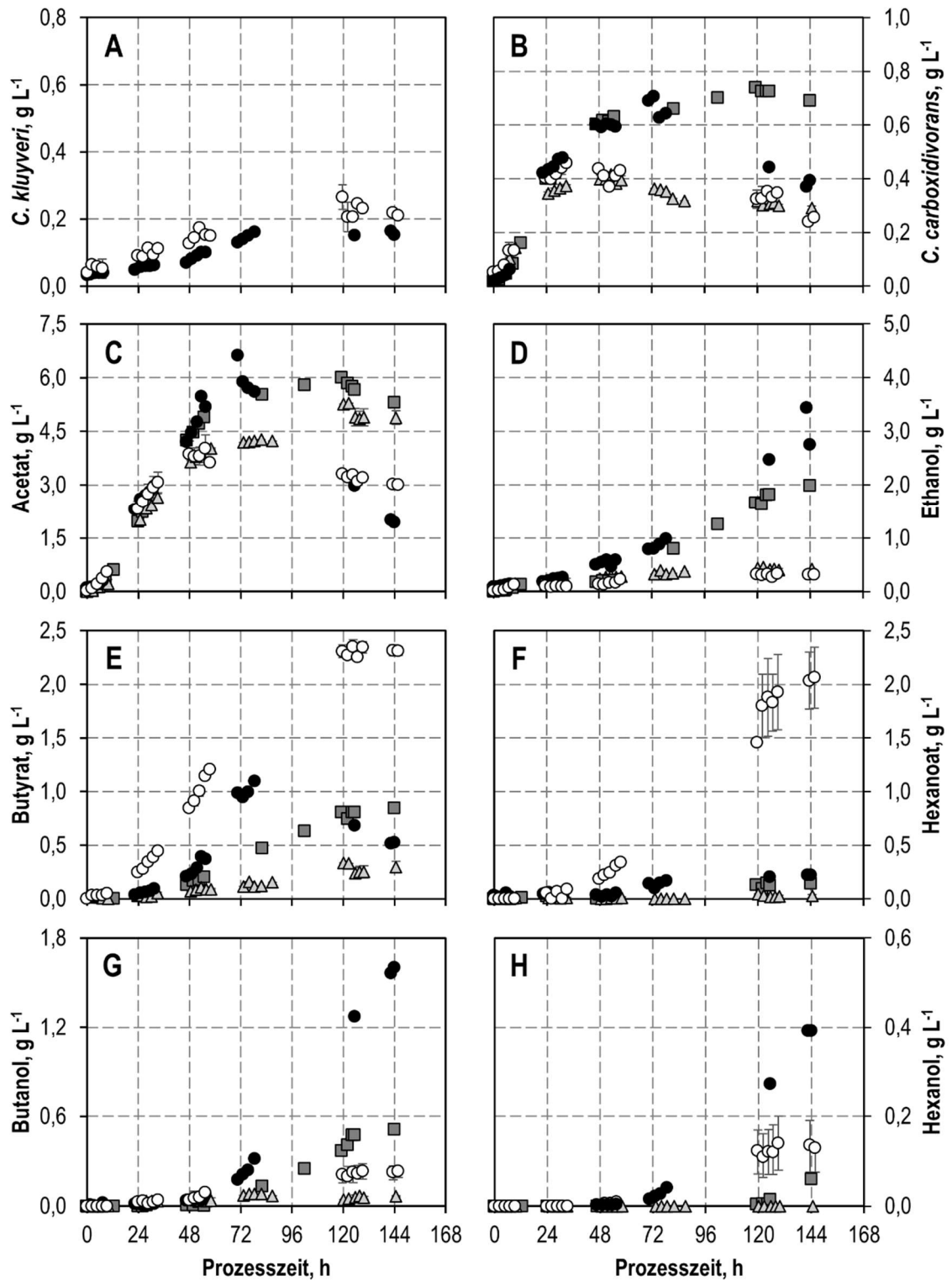
## 6.3. Kontinuierliche Sulfidzugabe

### 6.3.1. Sulfidzugabe bei niedrigem CO-Partialdruck

Da eine zusätzliche Zufuhr von Wasserstoff starke inhibitorische Effekte auf *C. kluyveri* zeigte, wurde stattdessen die Auswirkung einer kontinuierlichen Sulfidzufuhr untersucht. Eine Bereitstellung von Sulfid führte in Satzprozessen ohne pH-Kontrolle zu einer Verdopplung der maximalen Biomasse- und Ethanolkonzentrationen mit *C. carboxidivorans* Monokulturen (s. Kapitel 3). Daher wurde in autotrophen Satzprozessen eine kontinuierlichen Sulfidbereitstellung ( $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) bei einem reduzierten CO-Partialdruck von  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$  in einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* untersucht und mit einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* verglichen. Diese Ergebnisse sind vergleichend mit den Daten der Versuche bei identischen Prozessparametern aber ohne Sulfidzugabe in Abbildung 6-11 dargestellt. Finale Konzentrationen sind ebenfalls Tabelle 6-5 zu entnehmen.

*C. kluyveri* zeigte in beiden Ko-Kultivierungen ein vergleichbares Wachstum wobei die finale Biomassekonzentration ( $0,15 \text{ g L}^{-1}$ ) 71 % der im Referenzprozess erzielten Konzentration entsprach. Das Wachstum von *C. carboxidivorans* war in beiden Ko-Kultivierungen unabhängig von einer zusätzlichen Sulfidbereitstellung in den ersten 30 h des Prozesses. Im Anschluss zeigte sich durch die zusätzliche Sulfidbereitstellung sowohl in Ko-Kultur als auch in Reinkultur eine weiter steigende Biomasse-Konzentration bis zu  $0,71 \text{ g L}^{-1}$  nach 72 h. Dies entsprach einer Verdopplung gegenüber der *C. carboxidivorans* Konzentrationen ohne Sulfidzufuhr. Während bei der Reinkultur bis zum Ende der Prozesszeit von 144 h kein Wachstum mehr stattfand und somit eine finale Biomassekonzentration von  $0,69 \text{ g L}^{-1}$  erzielt wurde, sank die Biomassekonzentration in Ko-Kultur bis zum Prozessende auf  $0,39 \text{ g L}^{-1}$  ab (Tab. 6-5). Auch die Acetatproduktion war in allen Prozessen in den ersten 48 h zunächst vergleichbar. Im Anschluss war in den beiden Prozessen mit kontinuierlicher Sulfidzugabe eine weiterhin ungehemmte Acetatbildung bis zu durchschnittlich  $6 \text{ g L}^{-1}$  zu verzeichnen. Bis zum Prozessende sank die Acetatkonzentration in der Ko-Kultur mit Sulfidzufuhr mit  $1,94 \text{ g L}^{-1}$  auf den niedrigsten finalen Wert der vier Prozesse.





**Abbildung 6-11** Vergleich der Zulaufprozesse mit einer Ko-Kultur aus *C. kluveri* und *C. carboxidivorans* bei kontinuierlicher Sulfidzufuhr ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ ) mit  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (schwarz) und ohne Sulfidzufuhr (weiß) sowie mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur mit  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraues Viereck) und ohne Sulfidzufuhr (hellgraues Dreieck). ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (10:20  $\text{CO}:\text{CO}_2$ )).

Durch eine zusätzliche Sulfidzufuhr konnte bei der Ko-Kultur die Ethanolkonzentration auf eine maximale Konzentration von 3,44 g L<sup>-1</sup> nach 142 h gesteigert werden, was einer Erhöhung um den Faktor 11 gegenüber der Ko-Kultivierung ohne Sulfidzugabe bedeutete. Die anfängliche Ethanolbildung der *C. carboxidivorans* Reinkultur war in den ersten 55 Stunden vergleichbar mit den Prozessen ohne Sulfidzufuhr. Danach wurde die Ethanolproduktion durch die zusätzliche Sulfidzufuhr sehr stark verbessert, was zu einer 4,7-fach höheren Ethanolkonzentration von 1,99 g L<sup>-1</sup> nach 144 Stunden führte (Tab. 6-5).

**Tabelle 6-5** Finale Biomasse- und Produktkonzentrationen, maximale Alkohol:Säure-Verhältnisse sowie die kummulierte CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion gemessen in autotrophen Ko-Kulturen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* Reinkulturen in pH-kontrollierten Satzprozessen mit kontinuierlicher Begasung in Rührkesselreaktoren mit und ohne zusätzlicher Sulfidzufuhr von 0,05 mM L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar CO. (T = 37°C; pH = 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10,5 W L<sup>-1</sup>; F<sub>gas</sub> = 0,042 vvm (10:20:70 CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>); t = 144 h).

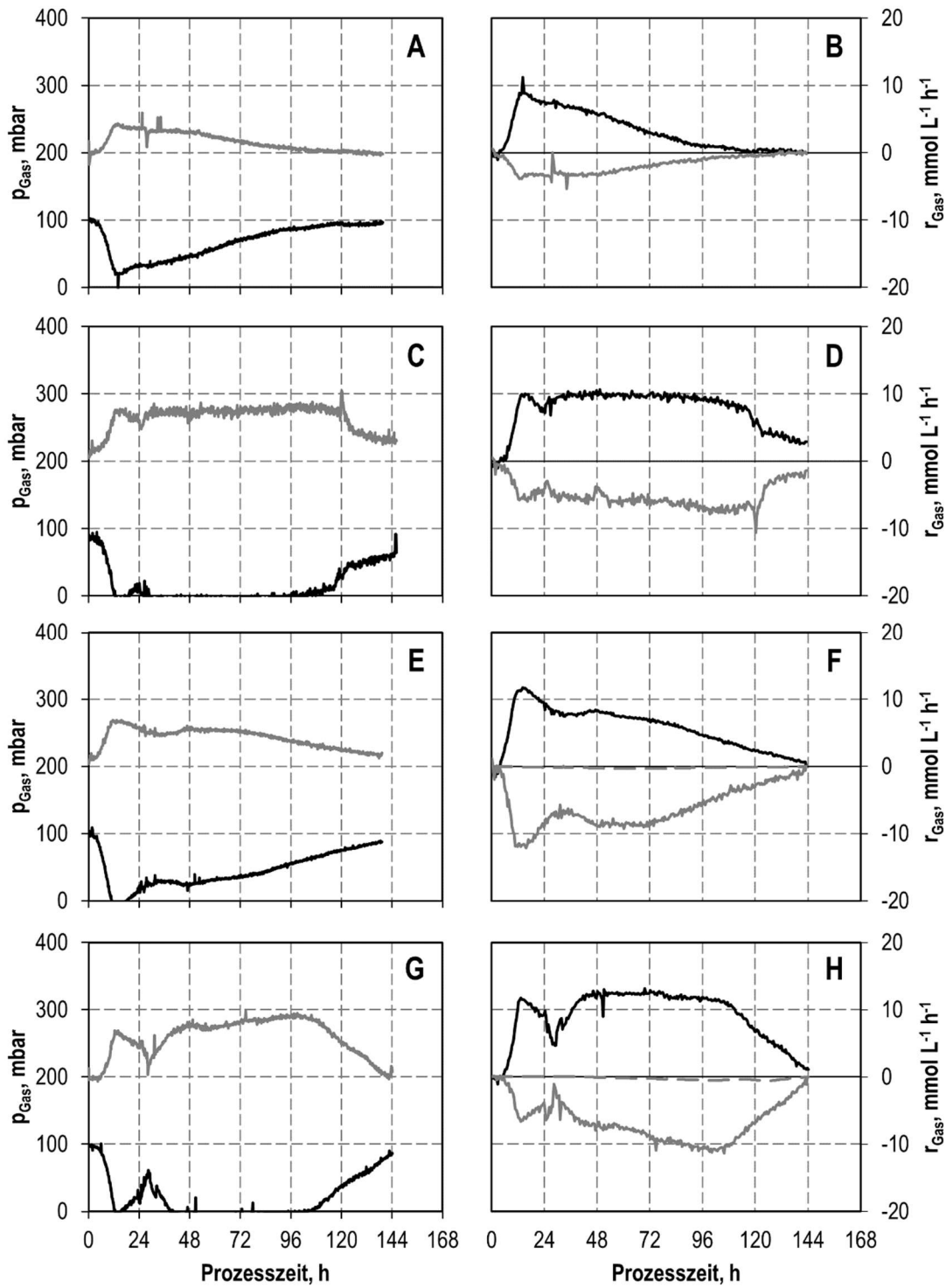
	Ohne Sulfidzufuhr		Mit Sulfidzufuhr	
	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.
BTM <sub><i>C. carboxidivorans</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	0,29 ± 0,01	0,26 ± 0,01	<b>0,69</b>	0,39
BTM <sub><i>C. kluyveri</i></sub> , g L <sup>-1</sup>	-	<b>0,21</b>	-	0,15
Acetat, g L <sup>-1</sup>	4,89 ± 0,19	3,0 ± 0,06	<b>5,31</b>	1,94
Butyrat, g L <sup>-1</sup>	0,30 ± 0,05	<b>2,31 ± 0,04</b>	0,85	0,53
Hexanoat, g L <sup>-1</sup>	0,03 ± 0,01	<b>2,06 ± 0,28</b>	0,14	0,22
Ethanol, g L <sup>-1</sup>	0,42 ± 0,00	0,31 ± 0,03	1,99	<b>2,75</b>
Butanol, g L <sup>-1</sup>	0,06 ± 0,00	0,23 ± 0,04	0,51	<b>1,60</b>
Hexanol, g L <sup>-1</sup>	-	0,13 ± 0,05	0,06	<b>0,39</b>
EtOH/Ac, g g <sup>-1</sup>	0,09	0,10	0,37	<b>1,72</b>
ButOH/But, g g <sup>-1</sup>	0,22	0,12	0,60	<b>3,05</b>
HexOH/Hex, g g <sup>-1</sup>	-	0,08	0,42	<b>1,77</b>
CO-Aufnahme, mmol	461	806	1107	1304
CO <sub>2</sub> -Produktion, mmol	245	437	735	950
C-Wiederfindung, %	97	99	99	99

Die Butyratbildung setzte in Ko-Kultur mit Sulfidzugabe zeitverzögert ein und erreichte das Maximum von 1,10 g L<sup>-1</sup> nach 79 h, wobei die Konzentration anschließend auf lediglich 23 % der im Referenzprozess erzielten Konzentration fiel. Interessanterweise führte eine zusätzliche Gabe von Sulfid dazu, dass die Reinkultur von *C. carboxidivorans* selbst in der Lage war, Butyrat mit einer maximalen Konzentration von 0,85 g L<sup>-1</sup> zu produzieren. Diese Beobachtung konnte auch bei der Hexanoatbildung gemacht werden, da *C. carboxidivorans* die 4-fache Menge Hexanoat bilden konnte. Durch die zusätzliche An-

wesenheit von *C. kluyveri* konnte jedoch nur eine geringe Steigerung der Hexanoatkonzentration erzielt werden. Durch die Sulfidzugabe wurde die finale Hexanoatkonzentration um 89 % reduziert.

Die Alkohole Butanol und Hexanol konnten jedoch durch die zusätzliche kontinuierliche Zugabe von Sulfid stark gesteigert werden. Die Butanolkonzentration konnte allein bei einer *C. carboxidivorans* Reinkultur um das 8,5-fache auf  $0,51 \text{ g L}^{-1}$  erhöht werden, wohingegen bei der Ko-Kultivierung eine Erhöhung um das 7-fache auf die in dieser Arbeit bisher höchsten Butanolkonzentration von  $1,60 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden konnte. Durch eine Ko-Kultivierung mit kontinuierlicher Sulfidbereitstellung konnte sogar schließlich die finale und somit maximal in dieser Arbeit erreichten Hexanolkonzentration um das Dreifache auf  $0,39 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden.

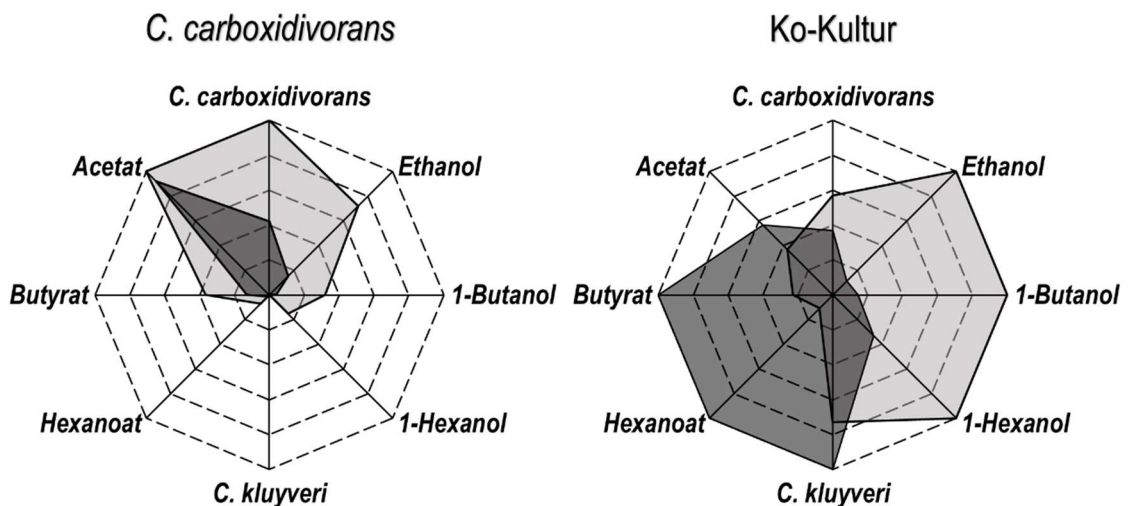
Die kontinuierliche Bereitstellung von Sulfid führte zu einer deutlich gesteigerten Gasaufnahme und Gasproduktion. Während bei einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* die CO-Aufnahme mit  $1107 \text{ mmol}$  um das 2,4-fache erhöht werden konnte, wurden in Ko-Kultur mit insgesamt  $1304 \text{ mmol}$  eine Erhöhung um das 1,6-fache gegenüber einer Ko-Kultur ohne Sulfid gemessen (Abb. 6-12).



**Abbildung 6-12** Partialdrücke und Gasverbrauchsrate von CO (schwarz), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau) und H<sub>2</sub> (gestrichelt) von autotrophen Zulaufprozesse mit einer Ko-Kultur aus *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* ohne Sulfidzufuhr (A+B), bei kontinuierlicher Sulfidzufuhr (Na<sub>2</sub>S · 9 H<sub>2</sub>O) mit 0,05 mmol S L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (C+D) sowie bei einer *C. carboxidivorans* Reinkultur ohne Sulfidzufuhr (E+H) und mit 0,05 mmol S L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (G+H). (T = 37°C; pH = 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10,5 W L<sup>-1</sup>; F<sub>gas</sub> = 0,042 vvm (10:20:70 CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>)).

## Diskussion

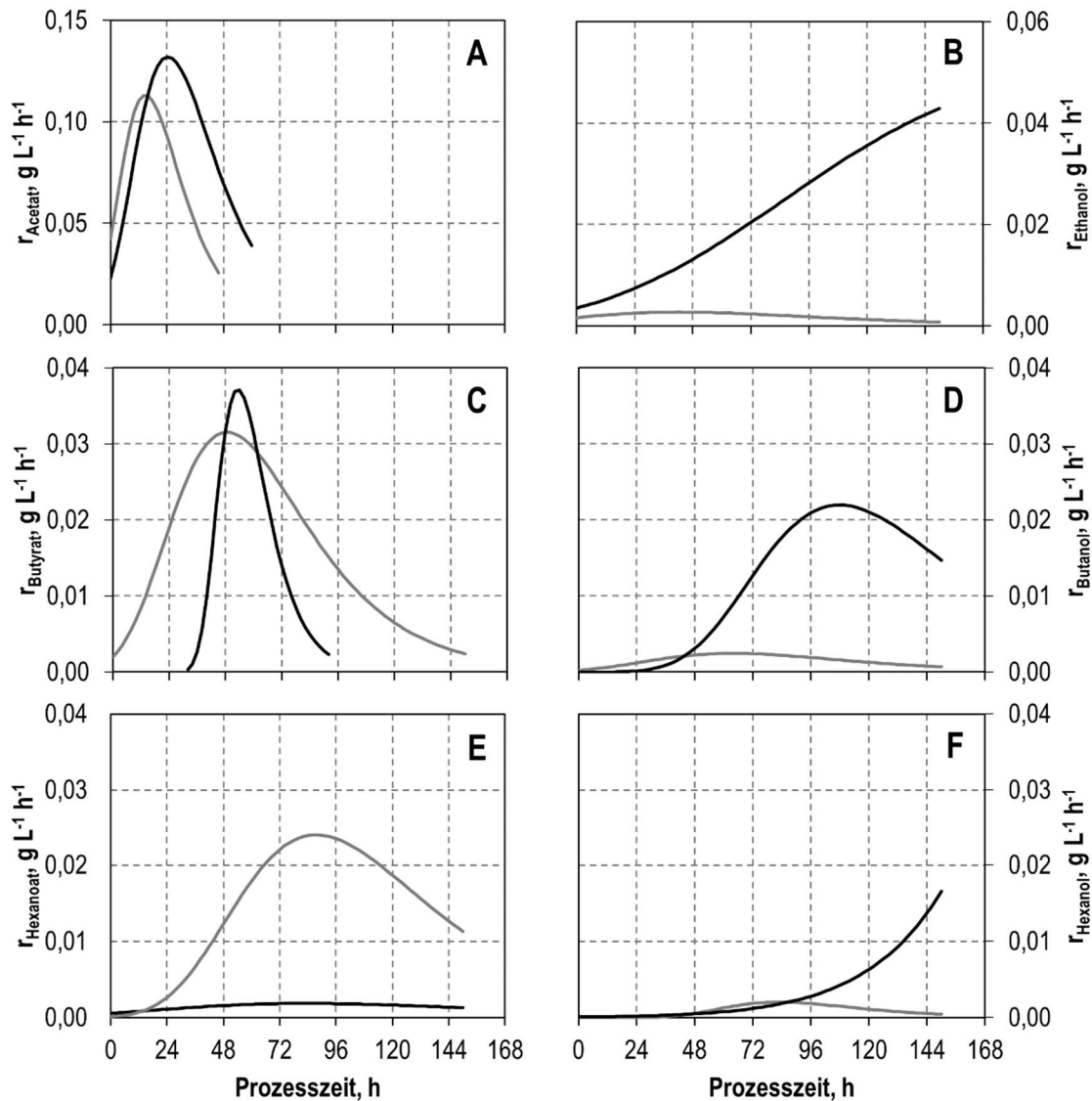
Durch die kontinuierliche Bereitstellung von Sulfid in Form von Natriumsulfid-Nonahydrat konnte eine deutliche Verbesserung der Alkohol:Säure-Verhältnisse trotz eines sehr niedrigen CO-Gehalts in der Flüssigphase erreicht werden. Die Zufuhr von Sulfid bei einer Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* führte zu einem sehr deutlichen Trend weg von den Fettsäuren zu den gewünschten Alkoholen Ethanol, Butanol und Hexanol (s. Abb. 6-13). Bei einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* konnte neben eines stark erhöhten Wachstums auch eine deutlich vermehrte Bildung von Ethanol sowie die Bildung von C4-Verbindungen verzeichnet werden. Eine kontinuierliche Sulfidzugabe hatte keine inhibitorischen Effekte auf *C. kluyveri* (s. Anhang Abb. 12-1).



**Abbildung 6-13** Vergleich der Biomasse-Endkonzentrationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie der Endkonzentrationen von Alkoholen und organischen Säuren während autotropher Zulaufprozesse mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur und einer Ko-Kultur aus *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* ohne Sulfidzufuhr (dunkelgrau) und bei kontinuierlicher Sulfidzufuhr ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ ) mit  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (hellgrau). ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (10:20:70  $\text{CO}:\text{CO}_2:\text{N}_2$ )). Die höchste Konzentration wurde auf 1 normiert.

Die volumetrischen Produktbildungsrate sind ebenfalls in Ko-Kultur mit Sulfidzugabe für alle Produkte außer Hexanoat erhöht. Butyrat wurde zunächst mit einer höheren Bildungsrate von  $0,89 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  produziert, wohingegen dann auch ein schneller Konzentrationsabfall zu verzeichnen war. Dieser lässt sich zum einen durch die Aufnahme von *C. kluyveri* für eine Kettenverlängerung hin zum Hexanoat, als auch durch eine Umsetzung von *C. carboxidivorans* zu dem korrespondierenden Alkohol Butanol erklären. Die Bildung von Hexanoat war jedoch gegenüber des Referenzprozesses stark reduziert, was

sich aber vermutlich mit der gleichzeitigen Umsetzung durch *C. carboxidivorans* zu Hexanol erklären lässt, da hier höhere Konzentrationen erreicht werden konnten (Abb. 6-14, Tab. 6-6).



**Abbildung 6-14** Volumetrische Produktbildungsrate bei der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* ohne (grau) und mit kontinuierlicher Sulfidzufuhr von  $0,05 \text{ mM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ) (schwarz) ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (10:20:70  $\text{CO}:\text{CO}_2:\text{N}_2$ )).

Bei dem fakultativ anaeroben Bakterium *Rhodospirillum rubrum* wurde bereits eine Zunahme der Biomassebildung in Gegenwart von Sulfid beobachtet, die auf die Stimulation der CO-Dehydrogenase zurückgeführt wurde (Do et al. 2007).  $\text{H}_2\text{S}$  wird insbesondere als Reduktionsmittel eingesetzt, da es das Redoxpotential des Mediums durch Elektronenspende senken kann. Hier wurde beobachtet, dass sich der Stoffwechsel von Clostridien in Richtung Solventogenese verschiebt, was mit der Verfügbarkeit von mehr reduzierenden Äquivalenten zur Bildung von NADH für die Umwandlung von Acetyl-CoA

in Ethanol zusammenhängt. Das Reduktionsmittel Sulfid bewirkt somit eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses auf die Bildung von Ethanol anstelle von Säuren (Mohammadi et al. 2011; Abubackar et al. 2011). Die Verschiebung des Stoffwechsels hin zur Solventogenese wurde beispielsweise bereits bei *C. ljungdahlii* beobachtet (Abubackar et al. 2011).

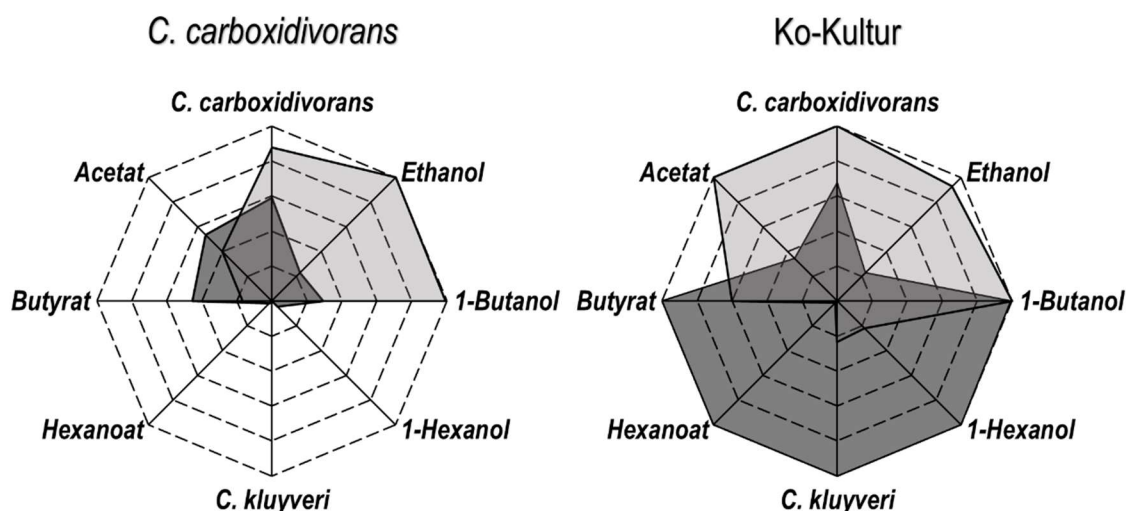
Im Vergleich zu dem von Rückel et al. (2021) durchgeführten Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* bei einer einmaligen Sulfid Zugabe von  $1 \text{ g L}^{-1}$  und nicht kontrolliertem pH 6,0 bei einem initialen CO-Partialdruck von 600 mbar, konnten die maximalen Produktkonzentrationen durch eine kontinuierliche Sulfidbereitstellung weiter gesteigert werden. Die maximal erreichten Konzentrationen konnten für Ethanol (Faktor 1,1), Butyrat (Faktor 5,5) und Butanol (Faktor 3,5) erhöht werden.

**Tabelle 6-6** Maximale volumetrische Produktbildungsraten bei der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* sowie der Reinkultur von *C. carboxidivorans* ohne und mit kontinuierlicher Sulfidzufuhr von  $0,05 \text{ mM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ) ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 10,5 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$  (10:20:70 CO:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>)).

	Ohne Sulfidzufuhr		Mit Sulfidzufuhr	
	<i>C. carboxidivorans</i>	Ko-Kul.	<i>C. carboxidivorans</i>	Ko-Kul.
$r_{\text{max. Acetat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	2,27	2,71	3,09	<b>3,17</b>
$r_{\text{max. Butyrat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,07	0,76	0,24	<b>0,89</b>
$r_{\text{max. Hexanoat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	-	<b>0,57</b>	0,04	0,04
$r_{\text{max. Ethanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,12	0,07	0,57	<b>1,03</b>
$r_{\text{max. Butanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	0,03	0,06	0,19	<b>0,53</b>
$r_{\text{max. Hexanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	-	0,05	-	<b>0,40</b>

### 6.3.2. Sulfidzugabe bei hohem CO-Partialdruck

Da sich ein kontinuierlicher Zulauf von Sulfid als vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung der Alkohol:Säure-Verhältnisse gezeigt hat, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob sich dadurch auch höhere Alkoholkonzentrationen bei einem hohen Anfangs-CO-Partialdruck von 800 mbar sowie einem höheren Gasvolumenstrom von 0,083 vvm erreichen lassen. Die Sulfidzugabe von  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde wiederum jeweils mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* untersucht und mit einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* verglichen. Die finalen Konzentrationen nach einer Prozesszeit von 144 h sind vergleichend mit den Ergebnissen der entsprechenden Versuche bei identischen Prozessbedingungen aber ohne kontinuierliche Sulfidbereitstellung in Abbildung 6-15 dargestellt.



**Abbildung 6-15** Vergleich der Biomasse-Endkonzentrationen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* sowie der Endkonzentrationen von Alkoholen und organischen Säuren während autotropher Satzprozesse mit einer *C. carboxidivorans* Reinkultur und einer Ko-Kultur aus *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* ohne Sulfidzufuhr (dunkelgrau) und bei kontinuierlicher Sulfidzufuhr ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ) mit  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (hellgrau). ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (80:20  $\text{CO}:\text{CO}_2$ )). Die höchste Konzentration wurde auf 1 normiert.

In der Ko-Kultur bei 800 mbar CO führte eine zusätzlichen Sulfidbereitstellung zu einem stark erhöhten Wachstum von *C. carboxidivorans* bis zu einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von  $1,94 \text{ g L}^{-1}$  nach 57 h mit anschließendem Abfall. Für *C. kluyveri* konnte kein Wachstum gemessen werden und gegen Ende des Prozesses eine Biomassekonzentration von  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Die Bildung von Acetat war mit einer finalen Konzentration von  $3,47 \text{ g L}^{-1}$  mit Sulfidzugabe um fast das Dreifache



erhöht. Ebenso konnten deutlich erhöhte Ethanolkonzentrationen von  $8,47 \text{ g L}^{-1}$  verzeichnet werden. Die Bildung von Butanol war vergleichbar mit den Ergebnissen einer Ko-Kultivierung ohne Sulfidzufuhr wohingegen die Hexanolbildung stark gesunken war.

Im Vergleich dazu hat sich gezeigt, dass eine kontinuierliche Sulfidzufuhr bei einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* zu einer Erhöhung der maximalen Biotrockenmassekonzentration um den Faktor 1,5 auf maximal  $2,1 \text{ g L}^{-1}$  nach 57 h führt. Zu Prozessende konnte eine finale Biomassekonzentration von  $0,61 \text{ g L}^{-1}$  gemessen werden. Die Reinkultur von *C. carboxidivorans* konnte maximal  $9,12 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $0,84 \text{ g L}^{-1}$  Butanol erzielen. Eine Bildung von C6-Verbindungen war nicht messbar. (s. Tab. 6-7).

**Tabelle 6-7** Finale BTM- und Produktkonzentrationen, maximale Alkohol:Säure-Verhältnisse sowie die kummulierte CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Produktion bei der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluveri* sowie der Reinkultur von *C. carboxidivorans* ohne und mit kontinuierlicher Sulfidzufuhr von  $0,05 \text{ mM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ). Aufgrund defekter  $\mu\text{GC}$  konnten keine Gasdaten für *C. carboxidivorans* mit Sulfidzufuhr aufgezeichnet werden ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (80:20 CO:CO<sub>2</sub>)).

	Ohne Sulfidzufuhr		Mit Sulfidzufuhr	
	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.	<i>C. carb.</i>	Ko-Kul.
BTM <sub><i>C. carboxidivorans</i></sub> , $\text{g L}^{-1}$	0,41	0,48	0,61	0,53
BTM <sub><i>C. kluveri</i></sub> , $\text{g L}^{-1}$	-	0,07	-	0,01
Acetat, $\text{g L}^{-1}$	$1,87 \pm 0,17$	$1,20 \pm 0,02$	1,40	3,47
Butyrat, $\text{g L}^{-1}$	$0,15 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,05$	0,05	0,19
Hexanoat, $\text{g L}^{-1}$	$0,01 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03$	0,01	0,01
Ethanol, $\text{g L}^{-1}$	$2,09 \pm 0,03$	$2,11 \pm 0,22$	9,12	8,47
Butanol, $\text{g L}^{-1}$	$0,25 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,06$	0,84	0,85
Hexanol, $\text{g L}^{-1}$	-	$0,24 \pm 0,01$	-	0,05
EtOH/Ac, $\text{g g}^{-1}$	1,14	1,74	6,53	2,44
ButOH/But, $\text{g g}^{-1}$	2,73	2,79	16,28	4,56
HexOH/Hex, $\text{g g}^{-1}$	-	0,85	-	9,52
CO-Aufnahme, mmol	475	820	-	1630
CO <sub>2</sub> -Produktion, mmol	280	571	-	1057
C-Wiederfindung, %	97	97	-	99

## Diskussion

Die kontinuierliche Zugabe von 0,05 mM Sulfid  $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  zeigte auch bei einer hohen Verfügbarkeit von CO eine stark erhöhte Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* sowohl in Ko-Kultur als auch in Reinkultur. Dies könnte eine Sulfidlimitierung beim Wachstum von *C. carboxidivorans* in Satzprozessen indizieren.

Im Vergleich zu dem von Rückel et al. (2021) durchgeführten Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* bei Sulfid Zugabe von  $1 \text{ g L}^{-1}$  und nicht kontrollierten pH 6,0 bei einem initialen CO-Partialdruck von 600 mbar konnte eine weitere Steigerung der Ethanolkonzentration durch die Verwendung einer Ko-Kultur mit kontinuierlicher Sulfidzugabe bei einem hohen CO-Gehalt von 800 mbar CO im Eingangsvolumenstrom erreicht werden. Die maximal erreichte Biomassekonzentration konnte in der Ko-Kultur um das 2,6-fache gesteigert werden. Die Alkohole Ethanol und Butanol wurden um das 2,6-fache und 1,9-fache erhöht.

Die bei einem autotrophen Satzprozess Prozess mit *C. ragsdalei* bei gleicher Sulfidzufuhr erreichte maximale Ethanolkonzentration von  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  konnte mit der Ko-Kultur um fast das Doppelte auf  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  erhöht werden. Das erreichte Ethanol:Acetat-Verhältnis entsprach mit  $2,44 \text{ g g}^{-1}$  jedoch nur 13,8 % des mit *C. ragsdalei* erreichten Verhältnisses von  $17,7 \text{ g g}^{-1}$  (Oliveira et al. 2022).

Es hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung des CO-Gehalts sowohl einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* als auch bei der Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* mit *C. kluyveri* zwar zu einer starken Erhöhung der Biomassekonzentrationen von *C. carboxidivorans* sowie zu stark erhöhten Ethanolkonzentrationen führt, aber keine Bildung der C4- und C6-Produkte fördert. Dies lässt sich insbesondere bei einer Ko-Kultivierung mit einer nahezu nicht messbaren Biomassekonzentration von *C. kluyveri* erklären, da unter diesen Umständen wohl eine doppelte Belastung durch CO und eine kontinuierliche Sulfidzufuhr vorliegt. Eine Erhöhung des CO-Gehalts führte zu einer Reduktion von Butanol und Hexanol um 47 % und 87 % in Ko-Kultur.

Die höchsten Butanol- und Hexanolkonzentrationen konnten mit einer Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* bei einem initialem CO-Partialdruck von 100 mbar sowie einer kontinuierlichen Sulfidzufuhr erreicht werden. Verglichen mit den bisher höchsten erzielten Butanol- und Hexanolkonzentrationen im Satzprozess mit einem initialen CO-Partialdruck von 800 mbar und einem Gasvolumenstrom von 0,083 vvm war damit eine Erhöhung um das 1,9-fache und 1,6-fache möglich.

## 7. Kontinuierliche Gasfermentation in zwei Rührkesselreaktoren in Serie<sup>2</sup>

Die Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* wurde bisher ausschließlich in Satzprozessen untersucht. Kontinuierliche Prozessführungen zeichnen sich jedoch im Gegensatz dazu durch höhere Raum-Zeit-Ausbeuten aus.

### 7.1. Kaskade von zwei Rührkesselreaktoren

Für eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeuten wurde eine räumlich entkoppelte und zwei-stufige Prozessführung in einer Kaskade aus zwei hintereinander geschalteten Rührkesselreaktoren durchgeführt. Der erste Rührkesselreaktor wurde dabei bei pH 6,0 und einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar bei einem reduzierten Gasvolumenstrom von 0,042 vvm betrieben, um Biomasse- und Säurebildung bei beiden Mikroorganismen zu ermöglichen. Im zweiten Rührkesselreaktor wurde pH 5,0 bei einem hohen CO-Gehalt von 800 mbar CO und einem Gasvolumenstrom von 0,083 vvm eingestellt, um die Reduktion der organischen Säuren mit *C. carboxidivorans* zu den korrespondierenden Alkoholen zu begünstigen.

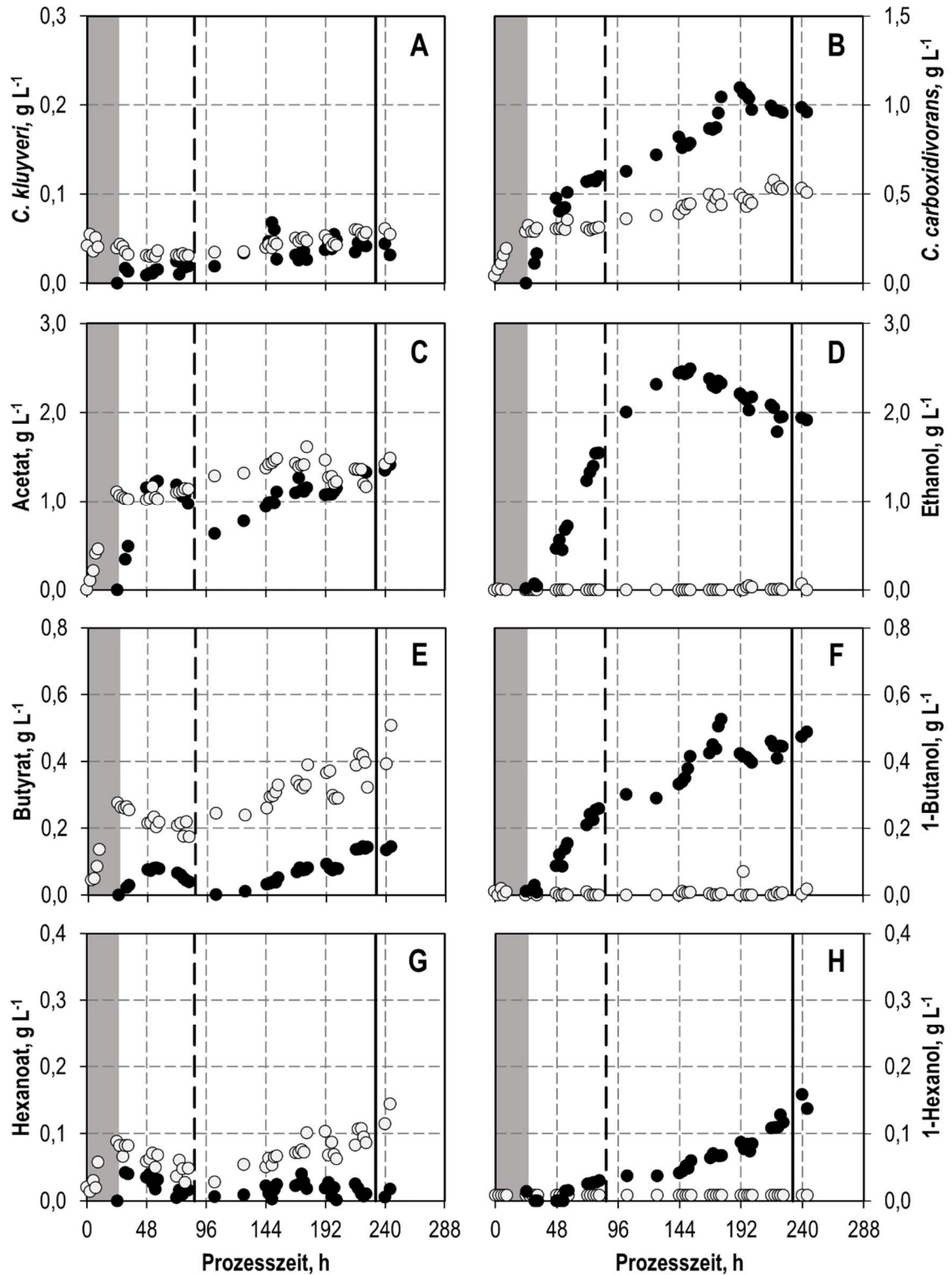
Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 5.2 ist im zweiten Reaktor weder mit Wachstum noch mit Produktbildung von *C. kluyveri* zu rechnen. Um die CO-Inhibierung von *C. kluyveri* zu adressieren, wurde im ersten Reaktor der CO-Gehalt durch einen initialen CO-Partialdruck von 100 mbar zusammen mit einer geringeren Gasvolumenstrom von 0,042 vvm niedrig gehalten, während im zweiten Reaktor ein hoher CO-Gehalt mit einem initialen CO-Partialdruck von 800 mbar bei einem hohen Gasvolumenstrom von 0,083 vvm gewählt wurde, um genügend Reduktionsäquivalente für die Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen bereitzustellen.

Der erste Reaktor wurde mit einem Arbeitsvolumen von 1 L betrieben, wohingegen der zweite Rührkesselreaktor ein Arbeitsvolumen von 1,5 L aufwies. Hierdurch konnte eine um den Faktor 1,5 höhere mittlere hydraulische Verweilzeit im zweiten Reaktor realisiert werden, um eine längere Reaktionszeit zur Umsetzung der organischen Säuren im zweiten Reaktor zu ermöglichen.

<sup>2</sup>Teile dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht in: Bäumler, Miriam; Burgmaier, Veronika; Herrmann, Fabian; Mentges, Julian; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin et al. (2023): Continuous Production of Ethanol, 1-Butanol and 1-Hexanol from CO with a Synthetic Co-Culture of Clostridia Applying a Cascade of Stirred-Tank Bioreactors. In: *Microorganisms* 11 (4), S. 1003. DOI: 10.3390/microorganisms11041003.

Die Verdünnungsrate  $D_{R1}$  des ersten Reaktors wurde mit der maximalen Wachstumsrate, die bei der Satzkultivierung bei identischen Reaktionsbedingungen des ersten Reaktors ermittelt worden war, bestimmt. Um ein Auswaschen der Zellen zu verhindern, wurde die Verdünnungsrate zu  $2/3$  der maximalen Wachstumsrate zu  $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die Verdünnungsrate des zweiten Reaktors ergab sich hieraus zu  $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$ . Der kontinuierliche Prozess wurde nach einer 24-stündigen Satzphase nach Inokulation des ersten Reaktors gestartet, um wachsende Zellen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-1 dargestellt.

Gemäß den Beobachtungen aus den Satzprozessen erfolgte sofortiges Anwachsen von *C. carboxidivorans* in der Satzphase im ersten Reaktor zu Beginn des Versuchs. Nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten der Bioreaktorkaskade (232 h) lag im ersten Reaktor eine Biotrockenmassekonzentration von *C. kluyveri* mit  $0,06 \text{ g L}^{-1}$  und von *C. carboxidivorans* mit  $0,53 \text{ g L}^{-1}$  und im zweiten Reaktor eine Biotrockenmassekonzentration von *C. kluyveri* mit  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  und von *C. carboxidivorans* mit  $0,97 \text{ g L}^{-1}$  vor. Dabei erhielt der zweite Reaktor kontinuierlich Zellen aus dem ersten Reaktor, weswegen der Anstieg der Biotrockenmassekonzentration im zweiten Reaktor leicht verzögert stattfand. Während des Zellwachstums stieg die Acetatkonzentration im ersten Reaktor an und erreichte eine Konzentration von  $1,29 \text{ g L}^{-1}$ . Entsprechend zeitverzögert stieg auch im zweiten Reaktor die Acetatkonzentration an und erreichte nach einem Absinken und Wiederanstieg eine Konzentration von  $1,34 \text{ g L}^{-1}$ . Eine Ethanolbildung konnte im ersten Reaktor nicht nachgewiesen werden wohingegen im zweiten Reaktor eine kontinuierliche Bildung bis zu einer Prozesszeit von 144 h mit anschließender Abnahme zu sehen war. Nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten war eine Konzentration von  $1,95 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Die kurzkettinge Säure Butyrat wurde in beiden Reaktoren mit finalen Konzentrationen von  $0,36$  und  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  gebildet. Butanol wurde im ersten Reaktor nicht gebildet, während im zweiten Reaktor eine Konzentration von  $0,46 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wurde. Die Bildung von Hexanoat fand im ersten Reaktor bis zu einer Konzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , welche im zweiten Reaktor zu  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  Hexanol nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten umgesetzt werden konnten. Die Bildung von Octanoat und Octanol konnte in keinem der beiden Reaktoren nachgewiesen werden. Nach Erreichen von theoretischen 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten wurde der Versuch abgebrochen.



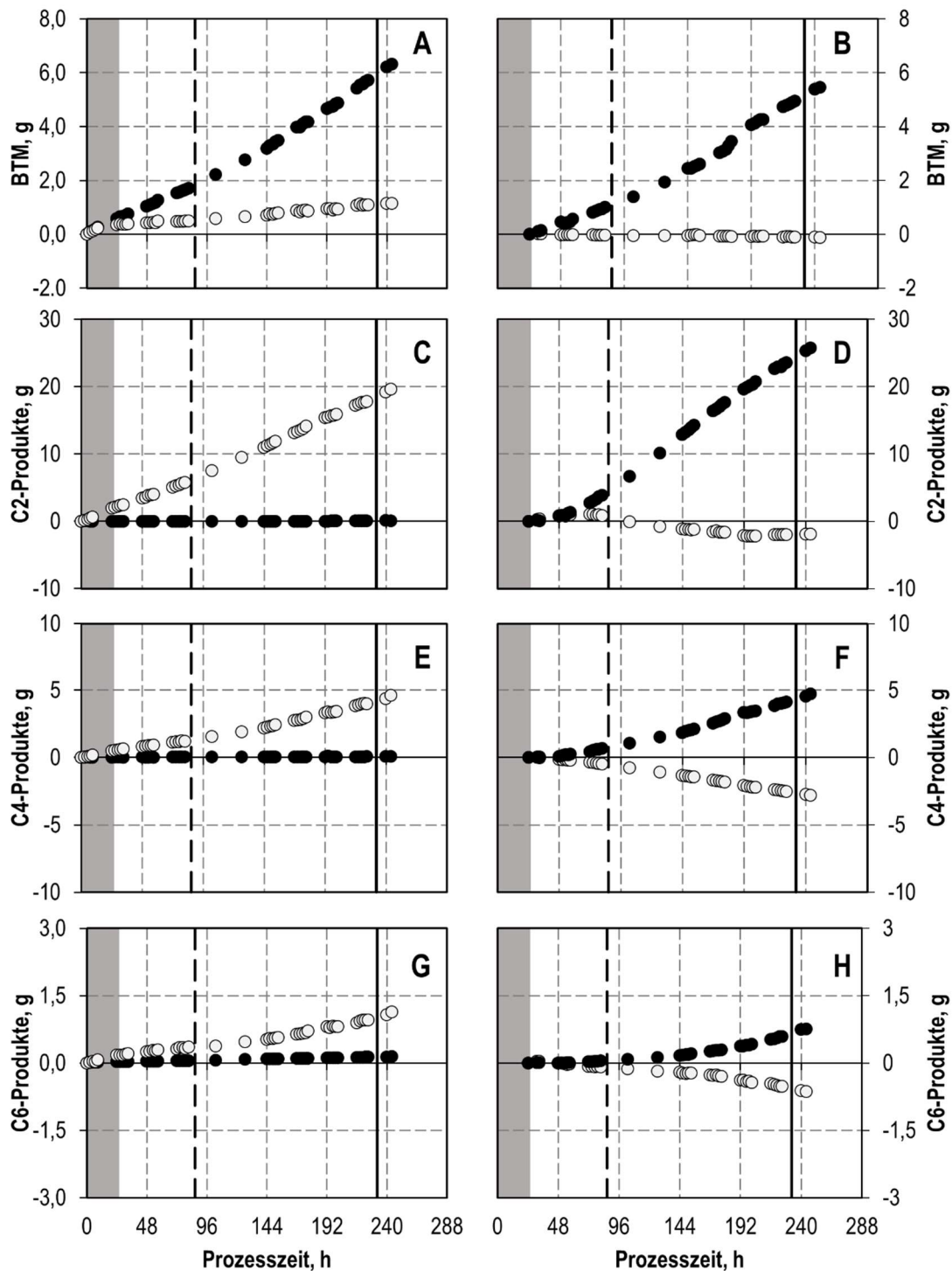
**Abbildung 7-1** Biomasse- und Produktkonzentrationen während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,04 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).

## Diskussion

Die kummulierte Darstellung der gebildeten Zellen und Produkten zeigt deutlich die gewünschte Trennung der Säurebildung (weiße Punkte) sowie der Alkoholbildung (schwarze Punkte). Im zweiten Reaktor sind negative Verläufe der Säurekonzentrationen zu sehen, was eine Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen im zweiten Reaktor bedeutet (Abb. 7-2). Die im zweiten Reaktor ermittelten Alkohol:Säure-Verhältnisse von 1,45 g Ethanol g<sup>-1</sup> Acetat, 3,32 g Butanol g<sup>-1</sup> Butyrat und 16,98 g Hexanol g<sup>-1</sup> Hexanoat zeigten eine erfolgreiche Trennung von Acidogenese und Solventogenese. Ein Fließgleichgewichtszustand konnte auch nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten nicht beobachtet werden (Müller-Erlwein 2015).

Eine Reduktion des CO-Gehalts im ersten Reaktor führte zwar zu einem Wachstum von *C. kluyveri* sowie einer Bildung von Butyrat, aber die Bildungsraten insbesondere von Hexanoat waren gering. Dies liegt an der geringen Verfügbarkeit von Ethanol im ersten Reaktor durch eine mangelnde Bildung durch *C. carboxidivorans* aufgrund des geringen CO-Partialdrucks. Da ein ungünstiges Ethanol:Acetat-Verhältnis Einfluss auf das Produktspektrum von *C. kluyveri* hat, wurde eine gesteigerte Butyrat- und reduzierte Hexanoatproduktion beobachtet (Bornstein und Barker 1948a; Weimer und Stevenson 2012; Yin et al. 2017), da Butyryl-CoA zunehmend durch die Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase zu Butyrat umgesetzt wird bei gleichzeitig geringerer Verfügbarkeit von Butyryl-CoA für die Bildung von Hexanoyl-CoA (Bielzer 2019).

Eine reduzierte Alkoholproduktion von *C. carboxidivorans* bei niedrigen CO-Partialdrücken wurde bereits beschrieben (Lee et al. 2008) als auch in dieser Arbeit bereits in vorangegangenen Versuchen belegt (Kapitel 6.2), da hierbei die Wasser-Gas-Shift Reaktion eingeschränkt ist. Sobald im Methyl-Zweig des Wood-Ljungdahl-Weg keine Oxidation von CO zu CO<sub>2</sub> mehr stattfindet, produziert der Organismus kein reduziertes Ferredoxin mehr, was in einem Mangel an Reduktionsäquivalenten für die Reduktion der Fettsäuren resultiert. Darüber hinaus ist reduziertes Ferredoxin für die Schaffung eines Protonengradienten mittels des Rnf-Komplexes und der ATP Bildung durch die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase für die Acidogenese zwingend notwendig (Mock et al. 2015).



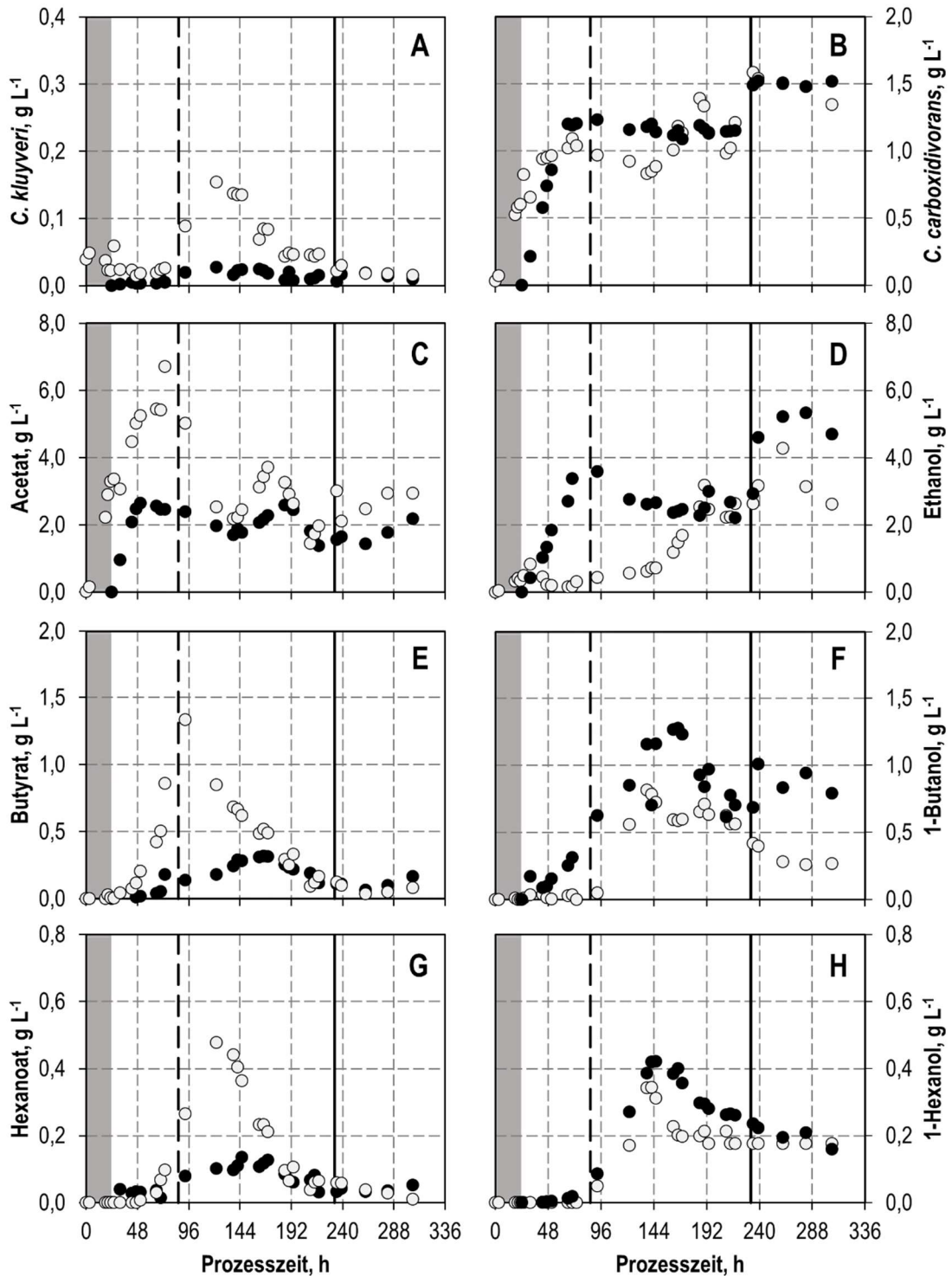
**Abbildung 7-2** Kumulierte Produktion/Verbrauch von Zellen und Produkten während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,04 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).

## 7.2. Zusätzliche Sulfidbereitstellung

Um die Umsetzung der organischen Säuren zu deren korrespondierenden Alkoholen zu erhöhen und eine erhöhte Ethanolproduktion durch *C. carboxidivorans* im ersten Reaktor trotz des geringen CO-Partialdrucks zu erreichen, wurde das Zulaufmedium mit Natriumsulfid supplementiert, um eine Sulfid-Bereitstellung von  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  zu gewährleisten (s. Kap. 6.4). Da während der kontinuierlichen Ko-Kultivierung in einer Kaskade aus zwei Rührkesselreaktoren (Kapitel 7.1) kein Ethanol im ersten Reaktor nachgewiesen werden konnte, sollte durch die Zugabe von Sulfid ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ) eine Ethanolbildung durch *C. carboxidivorans* erreicht werden. Alle weiteren Prozessparameter, einschließlich der Verdünnungsraten, blieben unverändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-3 dargestellt.

*C. kluyveri* zeigte im ersten Reaktor Wachstum und erreichte ein Maximum mit  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  nach 122 h woraufhin die Biomassekonzentration wieder abnahm. Im zweiten Reaktor wurden durchgehend sehr geringe Konzentrationen von *C. kluyveri* gemessen. Das Wachstum von *C. carboxidivorans* setzte direkt nach Inokulation ein und zeigte einen raschen Anstieg der Biomassekonzentration im ersten Reaktor auf etwa  $0,94 \text{ g L}^{-1}$  nach 43 h mit nachfolgendem stetigem Fortgang. Zeitversetzt stieg die Biomassekonzentration ebenfalls im zweiten Reaktor auf etwa  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  nach 77 h und blieb bis zu einer Prozesszeit von 218 h weitestgehend konstant. Danach stieg die Biomassekonzentration in beiden Reaktoren sprunghaft an und erreichte nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten (232 h) Konzentrationen von  $1,58 \text{ g L}^{-1}$  im ersten Reaktor beziehungsweise  $1,49 \text{ g L}^{-1}$  im zweiten Reaktor. Die Acetatkonzentrationen zeigten in beiden Reaktoren eine kohärente Oszillation mit globalen Maxima bei  $6,71 \text{ g L}^{-1}$  nach 73 h (1. Reaktor) und  $2,62 \text{ g L}^{-1}$  nach 194 h (2. Reaktor). In der Folge zeigten sich weitere lokale Maxima und Minima, wobei nach 232 h Acetatkonzentrationen von  $3,01 \text{ g L}^{-1}$  und  $1,56 \text{ g L}^{-1}$  gemessen wurden. Nach einem Durchlaufen mehrerer Maxima und Minima lagen die Ethanolkonzentrationen nach 5 theoretischen mittleren hydraulischen Verweilzeiten bei  $2,63 \text{ g L}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $2,93 \text{ g L}^{-1}$  im zweiten Reaktor. Im ersten Reaktor wurde ein stetiger Anstieg der Konzentration von Butyrat bis auf  $1,34 \text{ g L}^{-1}$  nach 93 h gefolgt von einem Abfall auf  $0,13 \text{ g L}^{-1}$  nach 232 h beobachtet. Ein ähnlicher Verlauf konnte im ersten Reaktor verzeichnet werden, wobei ein Maximum von  $0,48 \text{ g L}^{-1}$  nach 122 h erreicht wurde.





**Abbildung 7-3** Biomasse- und Produktkonzentrationen während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,04 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).

Auch bei der Alkoholbildung von Butanol und Hexanol wurde zunächst ein Maximum nach 144 h erreicht, welches mit einem Absinken auf Konzentrationen von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  (1. Reaktor) und  $0,69 \text{ g L}^{-1}$  (2. Reaktor) Butanol sowie  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  (1. Reaktor) und  $0,24 \text{ g L}^{-1}$  (2. Reaktor) Hexanol nach einem Ablaufen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten verbunden war. Octanol und Octanoat wurden in keinem Fall nachgewiesen.

## Diskussion

Durch die zusätzliche Bereitstellung von  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  durch das Medium der Kaskade aus zwei kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren sollte die Ethanolkonzentration im ersten Reaktor erhöht werden, sodass eine verbesserte Umsetzung zu den langkettigen Fettsäuren durch *C. kluyveri* erreicht werden kann. Dies konnte mit einer Erhöhung der Hexanoatkonzentration im ersten Reaktor nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten um den Faktor 1,8 beobachtet werden. Dadurch konnte eine 1,5-fache und 1,7-fache Steigerung der Butanol- und Hexanolkonzentrationen erreicht werden. Insgesamt wurde jedoch eine verschlechterte räumliche Trennung von Acidogenese und Solventogenese deutlich. Dies ist auf die Sulfid-Bereitstellung zurückzuführen, welche den Metabolismus in Richtung Solventogenese verlagert und bereits mit *C. ljungdahlii* beziehungsweise *C. ragsdalei* bei Sulfid Zugabe beobachtet wurde (Abubackar et al. 2011; Oliveira et al. 2022).

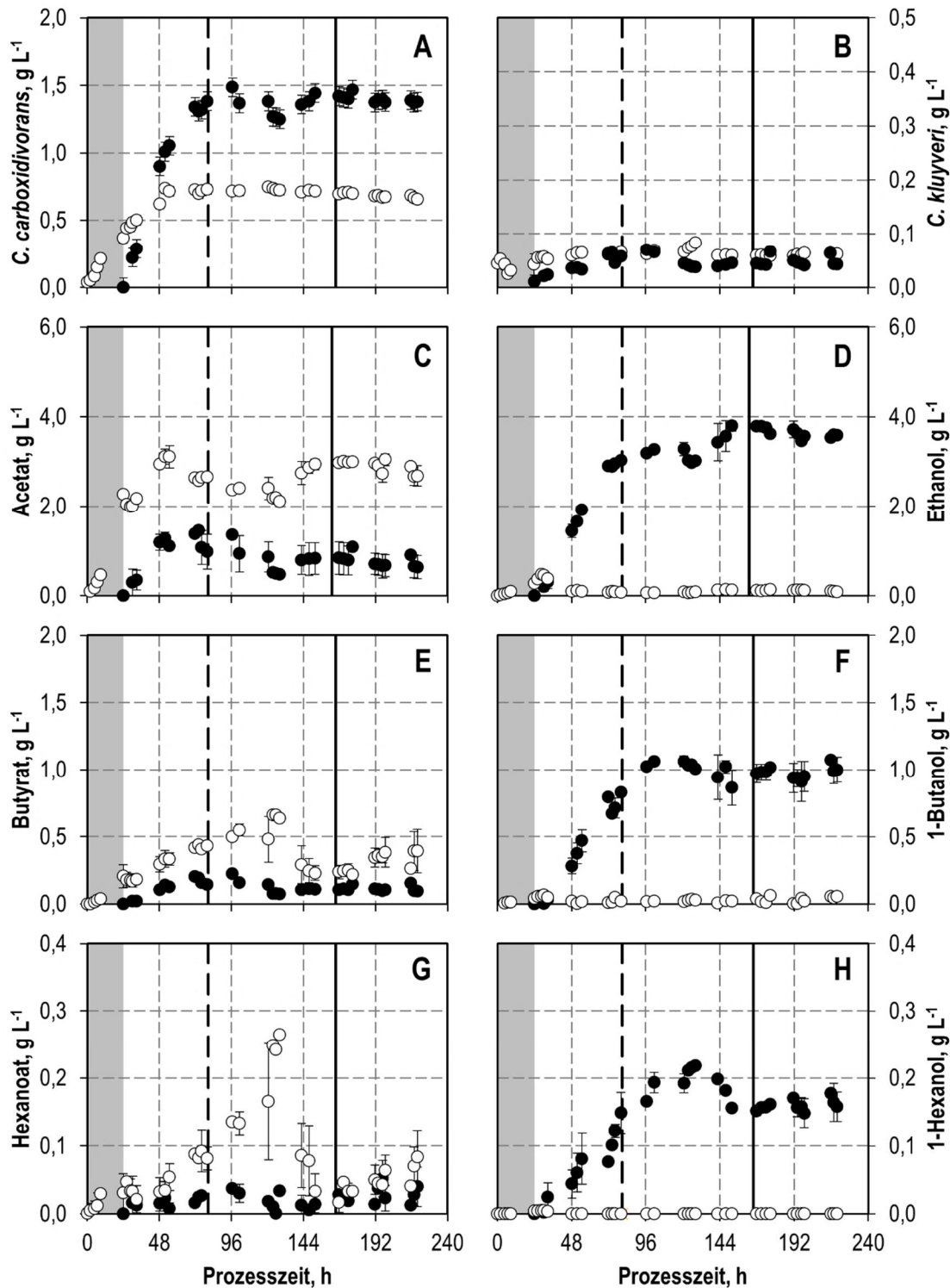
Dennoch stellte sich kein Fließgleichgewichtes trotz der erheblichen Verlängerung der Prozesszeit um weitaus mehr als 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten ein. Durch die Sulfid Bereitstellung wurde eher ein Durchlaufen von Maxima und Minima erreicht, was sich auf die geringen Verdünnungsraten von  $D_{R1} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ ,  $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$  zurückführen lässt (Doll 2018). Insbesondere auf die Biomassebildung von *C. carboxidivorans* hatte eine Sulfid Bereitstellung von  $0,05 \text{ mmol S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  einen erheblichen Einfluss. Eine oszillierende Biomasse- und Produktbildung, anstelle eines sich einstellenden Gleichgewichts, wurde bereits bei der Kultivierung von *C. acetobutylicum* im Chemostat zur Herstellung der Lösemittel Aceton, Butanol und Ethanol beschrieben (Clarke et al. 1988). Hierbei wurde festgestellt, dass die spezifischen Wachstumsraten mit den Produktausbeuten korrelierten. Geringere Wachstumsraten förderten die Produktbildung der Alkohole, wohingegen höhere spezifische Wachstumsraten die Säureausbeuten steigerten. Hieraus wurde abgeleitet, dass die Kultur gleichzeitig Alkohol- und Säurebildende Zellen enthielt, welche über die Prozesszeit hinweg variierten. Weiterhin konnte dies durch mikroskopische Morphologie Untersuchungen bestätigt werden und scheint auf eine Feedback-Hemmung zurückzuführen zu sein. Dies stellt somit eine mögliche Erklärung für das oszillierende Verhalten während der in diesem Versuch gemessenen Biomasse- und Produktkonzentrationen dar (Clarke et al. 1988).

### 7.3. Reduktion der hydraulischen Verweilzeit

Die vorangegangenen Ergebnisse haben das Potential einer kontinuierlichen Sulfidbereitstellung verdeutlicht. Da jedoch in keinem Fall ein Fließgleichgewicht erreicht werden konnte, sollte im weiteren Verlauf die Verdünnungsrate an die zellspezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase der Ko-Kultur mit zusätzlicher Sulfidzufuhr angepasst werden. Die Verdünnungsraten wurden daher im ersten Reaktor mit  $D_{R1} = 0,09 \text{ h}^{-1}$  und im zweiten Reaktor mit  $D_{R2} = 0,06 \text{ h}^{-1}$  gewählt, obwohl damit eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit eines Auswaschens von *C. kluyveri* mit sich zieht. Die mittlere hydraulische Verweilzeit wurde hierdurch reduziert. Die Ergebnisse bei sonst gleichbleibenden Bedingungen sind in Abb. 7-4 dargestellt.

Im ersten kontinuierlich betriebenen Bioreaktor wurde das Wachstum von *C. kluyveri* mit einer mittleren Wachstumsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  (Wachstumsrate = Verdünnungsrate im stationären Zustand) beobachtet, wobei die Biomassekonzentration von *C. kluyveri* über die gesamte Prozessdauer von 196 h Dauerbetrieb gleichbleibend war. Die Biomassekonzentrationen von *C. carboxidivorans* stiegen sowohl im ersten als auch im zweiten Reaktor nach der Umstellung auf eine kontinuierliche Betriebsweise schnell an. Nach 48 h Stunden wurde im ersten Reaktor eine konstante Konzentration von  $0,68 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Zwei Tage später, also nach insgesamt 4 Tagen, wurde im zweiten Reaktor ebenfalls eine konstante Zellmasse mit einer verdoppelten Biomassekonzentration von  $1,42 \pm 0,04 \text{ L}^{-1}$  im Fließgleichgewicht nach 5 hydraulischen Verweilzeiten der Kaskade (167 h) erreicht. Somit war die Biomassebildung von *C. carboxidivorans* in Ko-Kultur in beiden Bioreaktoren trotz der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen nahezu gleich. Die kumulative Nettoproduktion von *C. carboxidivorans*-Zellen in den beiden Bioreaktoren zeigt jedoch eine geringere Biomasseproduktion im zweiten Reaktor aufgrund der geringeren Verdünnungsrate (Abb. 7-5).

Die Bildung von Acetat, Butyrat und Hexanoat wurde im ersten Bioreaktor (Abb. 7-4) beobachtet und erreichte mehr oder weniger stabile Konzentrationen von  $2,89 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  Acetat,  $0,31 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat und  $0,05 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat nach 12,5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten. Die mittleren Bildungsraten sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.



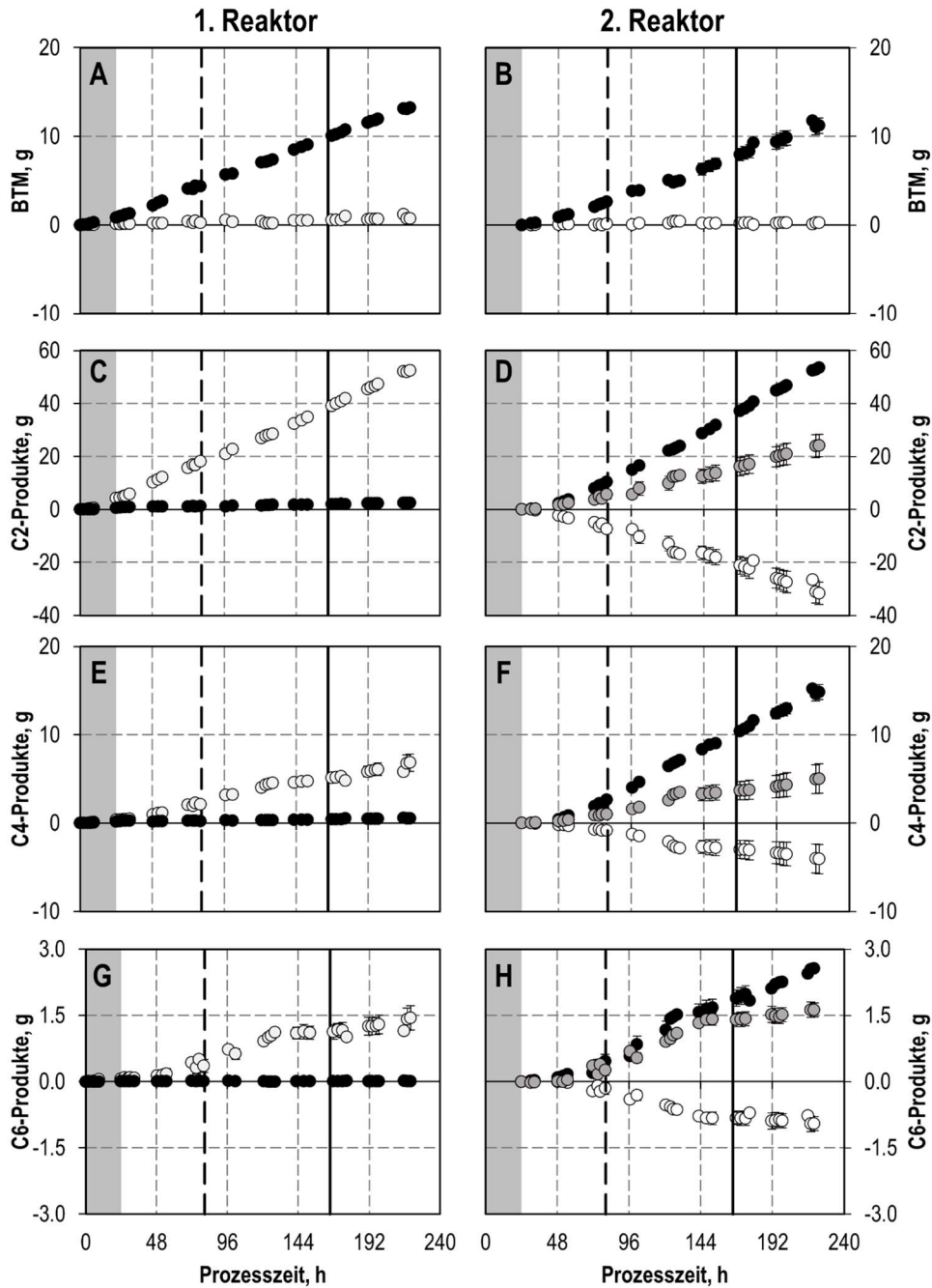
**Abbildung 7-4** Biomasse- und Produktkonzentrationen während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktor-kaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die Symbole zeigen den Mittelwert sowie die Minimal- und Maximaldaten von zwei unabhängigen Gasfermentationsversuchen, die in der Bioreaktor-kaskade durchgeführt wurden. Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).

Im Gegensatz dazu wurde im ersten Reaktor des kontinuierlichen Ko-Kultivierungsprozesses keine Bildung der Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol beobachtet. Die Alkoholbildung fand ausschließlich im zweiten Reaktor mit Gleichgewichtskonzentrationen von  $3,78 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $0,97 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol sowie  $0,16 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  1-Hexanol und  $0,77 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$  1-Octanol (Daten nicht gezeigt) statt (Abb. 7-4, Tab. 7-1).

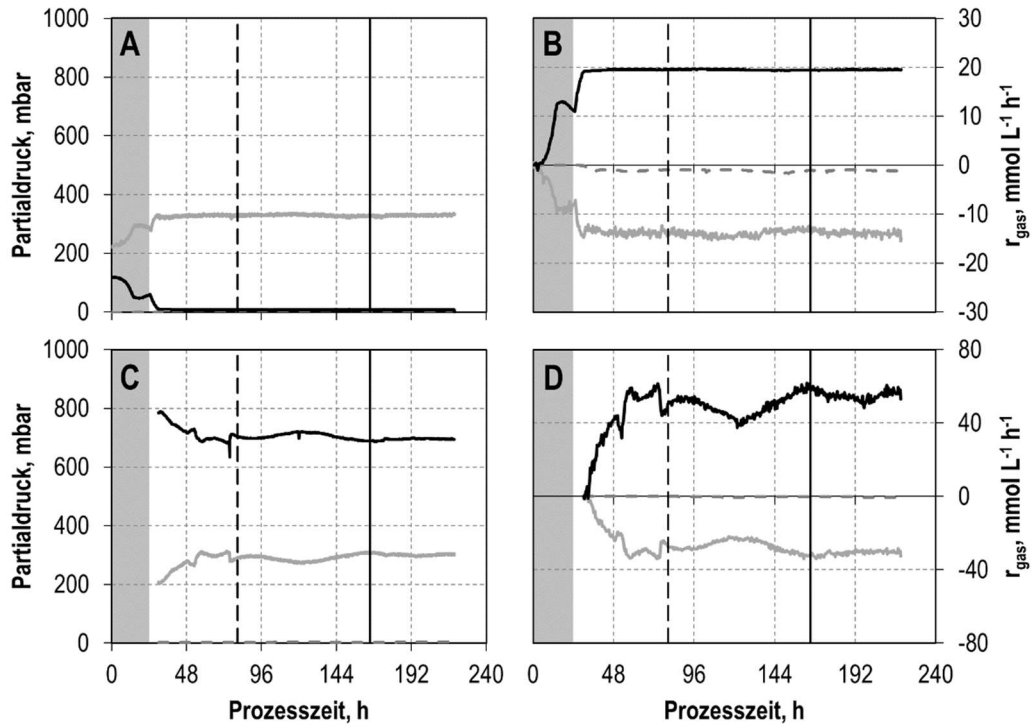
Auch wenn die im ersten Bioreaktor produzierten organischen Säuren im zweiten Bioreaktor der Kaskade nicht vollständig zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden konnten, wurden jedoch hohe Alkohol:Säure-Verhältnisse von  $4,5 \text{ g Ethanol g}^{-1}$  Acetat,  $9,1 \text{ g 1-Butanol g}^{-1}$  Butyrat und  $6,8 \text{ g 1-Hexanol g}^{-1}$  Hexanoat erreicht.

Zusätzlich zur Reduktion der im ersten Reaktor produzierten organischen Säuren wurde im zweiten Bioreaktor eine *de novo*-Synthese von Ethanol, Butanol und Hexanol beobachtet (Abb. 7-5). Nach einer Prozessdauer von 220 h wurden 121 % mehr Ethanol, 195 % mehr 1-Butanol und 58 % mehr 1-Hexanol produziert.

Wie bereits zuvor bei einer Monokultur von *C. carboxidivorans* und bei einer Ko-Kultur aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* bei niedrigem initialem CO-Partialdruck von 100 mbar bei einem geringen Gasvolumenstrom mit Sulfidzufuhr im Satzverfahren gezeigt (Kap. 6.3), wurde CO in der kontinuierlichen Ko-Kultivierung ab einer Prozesszeit von 30 h im ersten Reaktor vollständig von *C. carboxidivorans* verbraucht (Abb. 7-6). Insgesamt wurden 3952 mmol CO im ersten Reaktor und 9247 mmol CO im zweiten Bioreaktor aufgenommen. Darüber hinaus wurde im ersten Reaktor des kontinuierlichen Ko-Kultivierungsprozesses ab einer Prozessdauer von 32 Stunden eine Wasserstoffgasproduktionsrate von insgesamt 206 mmol gemessen.



**Abbildung 7-5** Kumulierte Produktion/Verbrauch von Zellen und Produkten während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Alkohole (Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol) sowie die BTM von *C. carboxidivorans* sind in vollen, schwarzen Kreisen dargestellt; Säuren (Acetat, Butyrat, Hexanoat) sowie die BTM von *C. kluyveri* sind in offenen Kreisen dargestellt. Graue Symbole zeigen die geschätzte Produktion von Alkoholen, wenn die entsprechenden organischen Säuren, die im zweiten Reaktor verbraucht werden, ausschließlich reduziert werden. Die Differenz zwischen dieser geschätzten kumulativen Produktion von Alkoholen und der gemessenen zeigt die *de novo*-Synthese. Die Symbole zeigen den Mittelwert sowie die Minimal- und Maximaldaten von zwei unabhängigen Gasfermentationsversuchen, die in der Bioreaktorkaskade durchgeführt wurden. Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).



**Abbildung 7-6** Partialdrücke (A+C) und Gasverbrauchsraten (B+D) von CO (schwarz), CO<sub>2</sub> (grau) und H<sub>2</sub> (grau gestrichelt) während der autotrophen Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in einer kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von 0,09 h<sup>-1</sup> im ersten Reaktor und 0,06 h<sup>-1</sup> im zweiten Reaktor ( $P = 1$  bar,  $T = 37$  °C,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200$  mbar CO<sub>2</sub>). ). Erster Reaktor (A+B): pH 6,0,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100$  mbar,  $F_{\text{gas}} = 0,042$  vvm, 0,05 mM S L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; zweiter Reaktor (C+D): pH 5,0,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800$  mbar,  $F_{\text{gas}} = 0,083$  vvm. Die anfängliche Satzphase ist grau schattiert. Vertikale Linien zeigen die Prozesszeit von fünf mittleren hydraulischen Verweilzeiten des ersten Reaktors (gestrichelte Linie) und der Bioreaktorkaskade (durchgezogene Linie).

## Diskussion

Mit diesem kontinuierlichen kaskadierten Ko-Kultivierungsprozess mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* konnte eine klare räumliche Trennung von Acidogenese im ersten Bioreaktor und Solventogenese im zweiten Bioreaktor erreicht werden (Abb. 7-5). Dies war nur möglich, weil *C. kluyveri* das gesamte von *C. carboxidivorans* produzierte Ethanol zur Kettenverlängerung im ersten Rührkessel-Bioreaktor verbrauchte. Die Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* in der Ko-Kultur führte zu deutlich höheren Butyratkonzentrationen (0,31 g L<sup>-1</sup> im Vergleich zu 0,08 g L<sup>-1</sup>) im Fließgleichgewicht und ermöglichte sogar eine erhebliche Hexanoatbildung im Vergleich zu einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* in einer Rührkesselkaskade mit Verdünnungsraten von  $D_{R1} = 0,12$  h<sup>-1</sup> im ersten Reaktor und  $D_{R2} = 0,08$  h<sup>-1</sup> im zweiten Reaktor (Doll et al. 2018).

Aufgrund der sehr stark reduzierten CO-Inhibierung von *C. kluyveri* im ersten Reaktor des kontinuierlichen Ko-Kultivierungsprozesses durch die vollständige Aufnahme durch *C. carboxidivorans* war die Biomassebildungsrate mit  $0,09 \text{ h}^{-1}$  nur leicht reduziert gegenüber der ermittelten maximalen Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  bei einer Kultivierung von *C. kluyveri* bei pH 6,0 ohne CO-Begasung (Kapitel 5.2).

Die maximalen volumetrischen Produktbildungsraten von  $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Butyrat und  $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Hexanoat, die eine *C. kluyveri* Reinkultur bei Vorlage von Ethanol und Acetat bei 100 mbar CO erzielte, konnten mit  $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  nicht erreicht werden. Dies lässt sich auf die mangelnde Substratverfügbarkeit im Ko-Kultivierungsprozess zurückführen verglichen mit den im Satzprozess vorgelegten Substratkonzentrationen und -verhältnissen. Selbst das hohe Biomasse-Verhältnis von *C. carboxidivorans* zu *C. kluyveri* von 17:1 im Fließgleichgewicht im ersten Bioreaktor der Kaskade reichte nicht aus, um genügend des limitierenden Substrats Ethanol bereitzustellen.

Das bereitgestellte Sulfid wurde im ersten Reaktor von *C. carboxidivorans* aufgenommen, um die Biomasse- und Produktbildung zu steigern. Der Großteil des verbleibenden  $\text{H}_2\text{S}$  wurde daraufhin im ersten Reaktor gestrippt, da im zweiten Reaktor kein Strippen von Schwefelwasserstoff mehr beobachtet werden konnte, obwohl die Senkung auf pH 5,0 eine Verlagerung des Dissoziationsgleichgewichts zu Seiten des Gases bewirkt (Binnewies et al. 2016).

Im Vergleich zu einem Satzprozess mit der identischen Ko-Kultur bei einem hohen anfänglichen CO-Partialdruck von 800 mbar waren die endgültigen Konzentrationen von Ethanol und Butanol im Fließgleichgewicht um die Faktoren 1,8 und 1,2 erhöht (Tab. 7-1). Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da üblicherweise Produktkonzentrationen in Satzprozessen im Vergleich zu kontinuierlichen Bioprozessen höher sind. Im Gegensatz dazu waren die Fließgleichgewichts-Konzentrationen der organischen Säuren in der Gesamtkaskade im Vergleich zum Satzprozess aufgrund der optimalen Bedingungen für die reduktive Bildung von Alkoholen durch *C. carboxidivorans* (pH 5,0, 800 mbar CO) deutlich reduziert.

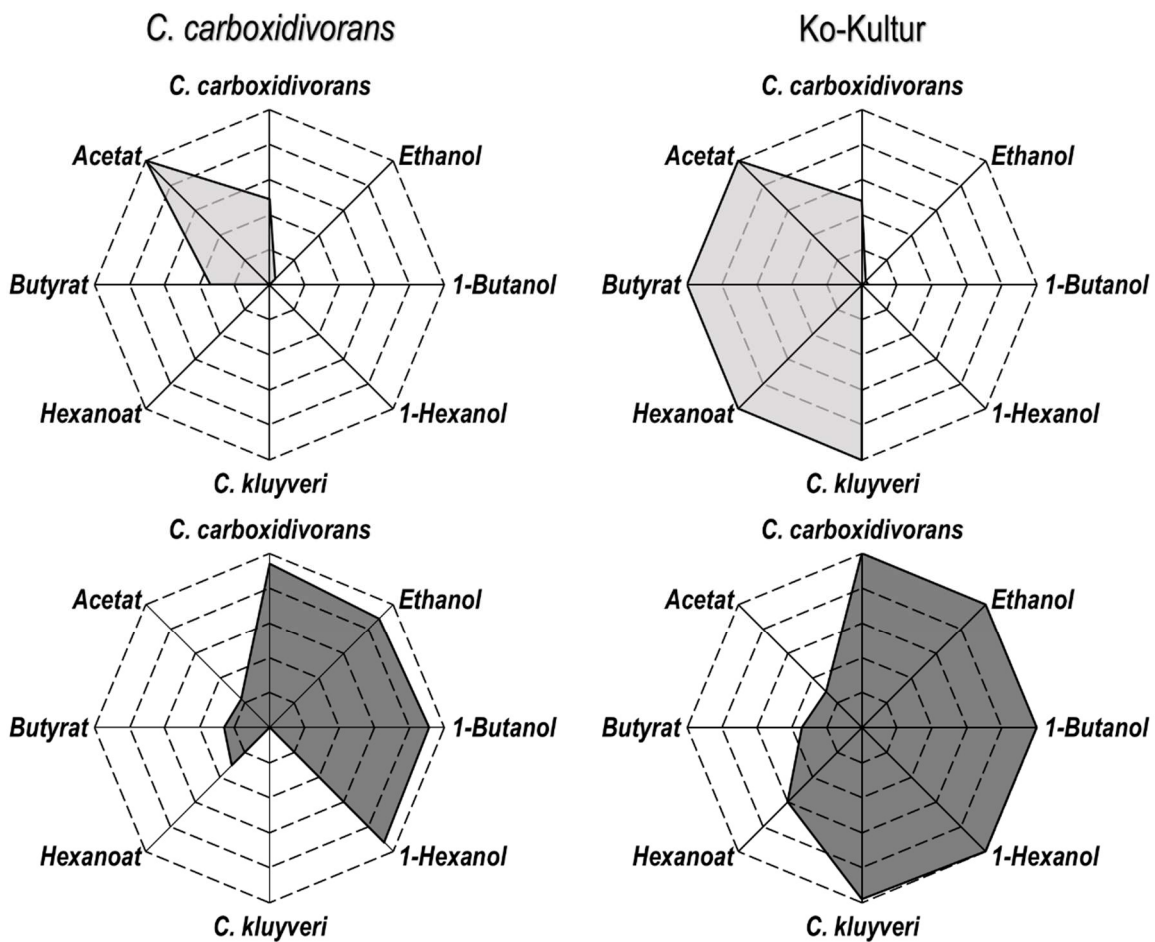
Infolgedessen waren die Raum-Zeit-Ausbeuten der Alkohole mit der kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade im Vergleich zum Satzverfahren sehr viel besser. Die volumetrischen Produktbildungsraten wurden für Ethanol (Faktor 5,3), Butanol (Faktor 2,7) und Hexanol (Faktor 1,9) deutlich gesteigert (Tab. 7-1).



**Tabelle 7-1** Vergleich der Gleichgewichts-Konzentrationen ( $c_{ss}$ ) und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) der kontinuierlich betriebenen autotrophen Rührkesselreaktor-Kaskade mit *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* nach 167 h (Abb. 7-4) und der Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* im Satzverfahren (Abb. 6-2). Kaskade: Verdünnungsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor:  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor:  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ ,  $\text{pH } 6,0$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ . Die Kohlenstoffbilanzen wurden mit 99 % Kohlenstoffrückgewinnung geschlossen.

	$c_{ss}, \text{ g L}^{-1}$		$c_{\text{final}}, \text{ g L}^{-1}$	RZA, $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$			
	1. Reaktor	2. Reaktor	Referenzprozess	1. Reaktor	2. Reaktor	Kaskade	Referenzprozess
<i>C. kluyveri</i>	$0,04 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$
<i>C. carboxidivorans</i>	$0,68 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,02$	$1,62 \pm 0,16$	$1,24 \pm 0,05$	$0,73 \pm 0,02$
Acetat	$2,89 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,36$	$1,20 \pm 0,02$	$6,62 \pm 0,15$	$-4,56 \pm 0,55$	$0,75 \pm 0,31$	$4,15 \pm 0,03$
Ethanol	$0,11 \pm 0,01$	<b><math>3,78 \pm 0,00</math></b>	$2,09 \pm 0,20$	$0,28 \pm 0,02$	$8,18 \pm 0,14$	<b><math>3,12 \pm 0,05</math></b>	$0,59 \pm 0,00$
Butyrat	$0,31 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,14$	$-0,72 \pm 0,25$	$0,11 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03$
1-Butanol	$0,03 \pm 0,01$	<b><math>0,97 \pm 0,07</math></b>	$0,84 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$	$2,38 \pm 0,12$	<b><math>0,89 \pm 0,06</math></b>	$0,33 \pm 0,03$
Hexanoat	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,05$	$-0,24 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$
1-Hexanol	-	$0,16 \pm 0,01$	<b><math>0,24 \pm 0,01</math></b>	-	$0,44 \pm 0,01$	<b><math>0,15 \pm 0,01</math></b>	$0,08 \pm 0,01$

Da ein langsames Wachstum von *C. kluyveri* nur im ersten kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktor der Kaskade beobachtet wurde und im zweiten Bioreaktor kein Wachstum von *C. kluyveri* stattfand, was zu einem hohen stationären Biomasseverhältnis von *C. carboxidivorans* zu *C. kluyveri* von 17:1 im ersten und 35,5:1 im zweiten Reaktor führte, wurde auch die Prozessleistung einer *C. carboxidivorans*-Monokultur in der Kaskade untersucht, um die Ergebnisse mit der kontinuierlichen Ko-Kultur zu vergleichen. Die in beiden Prozessen im stationären Zustand bei einer Prozessdauer von 167 Stunden gemessenen Endproduktkonzentrationen sind in Abbildung 7-7 gegenübergestellt.



**Abbildung 7-7** Vergleich der stationären Konzentrationen kontinuierlicher autotropher CO-Umwandlungsprozesse unter Verwendung einer Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor (weiße Symbole):  $\text{pH } 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor (schwarze Symbole):  $\text{pH } 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die höchste erreichte Konzentration, unabhängig vom ersten oder zweiten Reaktor, wurde auf 1 normiert.

Die Reinkultur von *C. carboxidivorans* produzierte im ersten Rührkesselreaktor aufgrund des niedrigen CO-Partialdrucks fast ausschließlich Acetat, während in der Ko-Kultur von *C. kluyveri* durch Kettenverlängerung Butyrat und Hexanoat produziert wurden, was zu einer dreifach höheren Konzentration von Butyrat im ersten Reaktor führte und auch die Produktion von Hexanoat ermöglichte. Aufgrund der erhöhten Fettsäurekonzentrationen im ersten Bioreaktor wurden im zweiten Reaktor mit der kontinuierlichen Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur von *C. carboxidivorans* etwa 10 % höhere Alkoholkonzentrationen erreicht. Darüber hinaus waren die Butyrat- und Hexanoatkonzentrationen im zweiten Reaktor des Ko-Kultivierungsprozesses höher, was darauf hindeutet, dass die mittlere hydraulische Verweilzeit möglicherweise nicht hoch genug war, um die vollständige Umsetzung der organischen Säuren aus dem ersten Rührkessel-Bioreaktor zu ermöglichen. Umgekehrt ist die Fähigkeit von *C. carboxidivorans* zur *de-novo*-Synthese von Alkoholen aus CO unter den im zweiten Bioreaktor der Kaskade gewählten Reaktionsbedingungen sehr hoch.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

Die Verringerung der CO<sub>2</sub>-Emissionen ist eine der wichtigsten Herausforderungen unserer Zeit, um die Auswirkungen des Klimawandels abzuschwächen. In diesem Zusammenhang besteht auch ein großes Interesse an biologischen CO<sub>2</sub>-Fixierungsprozessen, die in der Lage sind, CO<sub>2</sub>-Emissionen effektiv in organische Chemikalien umzuwandeln und somit eine Kohlenstoff-Kreislaufwirtschaft zu etablieren (Venkata Mohan et al. 2016). Strikt anaerobe Mikroorganismen sind in der Lage Synthesegas, welches bei industriellen Prozessen als Neben- und Abfallprodukt anfällt, zu langkettigen Alkoholen umsetzen, die sich wiederum für die industrielle Produktion von Biokraftstoffen, Lösungsmittel und Plattformchemikalien eignen (Daniell et al. 2012; Abubackar et al. 2011). *Clostridium carboxidivorans* ist im Vergleich zu vielen anderen acetogenen Organismen in der Lage, Synthesegase nicht nur zu kurzkettigen Produkten wie Acetat und Ethanol umzusetzen, sondern ebenfalls zu längerkettigen Fettsäuren und Alkoholen (Phillips et al. 2015). Die Produktausbeuten bei C4- oder C6-Verbindungen sind jedoch gering (Li et al. 2008). Der Wert des Fermentationsprodukts steigt aber mit der Anzahl der Kohlenstoffatome. Hexanoat/Hexanol besitzen beispielsweise einen doppelt so hohen Marktwert wie Ethanol (Reddy et al. 2018). Neben dem höheren Produktwert ist die Extraktion von mittelkettigen Fettsäuren aufgrund ihrer geringeren Wasserlöslichkeit im Gegensatz zu kurzkettigen Fettsäuren oder Ethanol kostengünstiger (Steinbusch et al. 2011; Spirito et al. 2014). Die mikrobielle Bildung von mittelkettigen Carbonsäuren aus Acetat und Ethanol, den Hauptprodukten von acetogenen Mikroorganismen, kann durch Kettenverlängerung mit anderen anaeroben Bakterien erreicht werden und hat in den letzten Jahren zunehmendes Interesse gefunden (Cavalcante et al. 2017). *Clostridium kluyveri* ist das am besten untersuchte kettenverlängernde Bakterium, das eine 2,5:1-Mischung aus Ethanol und Acetat in Butyrat, Hexanoat, Wasserstoffgas (H<sub>2</sub>) und sogar kleine Mengen von Octanoat umwandeln kann (Seedorf et al. 2008).

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer synthetischen Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri*, um mit *C. carboxidivorans* Ethanol und Acetat aus Kohlenmonoxid zu produzieren, diese direkt von *C. kluyveri* zu Butyrat und Hexanoat zu verlängern damit *C. carboxidivorans* mit CO die Fettsäuren Butyrat und Hexanoat zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren kann. Hierzu müssen geeignete Reaktionsbedingungen für eine stabile Ko-Kultivierung beider Mikroorganismen gefunden werden, wobei insbesondere der Einfluss des CO-Partialdrucks auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* unbekannt sind. Zeitlich veränderbare, unterschiedliche Reaktionsbedin-

gungen können falls erforderlich sowohl in Satzverfahren oder auch kontinuierlich in einer Rührkesselkaskade eingestellt werden. Letztere kann insbesondere auch höhere volumetrische Produktivitäten erreichen.

Zunächst wurde ein geeignetes *C. kluyveri* Isolat gewählt. Wachstum und Produktbildung verschiedener *C. kluyveri* Isolate (DSM 555, DSM 556, DSM 557, DSM 562, DSM 563 und DSM 564) wurden in parallelen Anaerobflaschen, mit  $6 \text{ g L}^{-1}$  Acetat und  $15 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol als Substrate untersucht. Während alle Isolate ein vergleichbares Wachstum aufwiesen, zeigte sich die höchste Hexanoatkonzentration bei dem Stamm *C. kluyveri* DSM 555.

Da Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* pH-abhängig sind, wurde der Einfluss des pH in vollständig kontrollierten Rührkesselreaktoren im Satzbetrieb untersucht. Das optimale Wachstum wird von *C. kluyveri* bei pH 6,8 erreicht (Barker und Taha 1941), während das pH-Optimum für Wachstum von *C. carboxidivorans* bei pH 6,0 liegt (Doll et al. 2018). Eine Verringerung von pH 6,8 auf pH 6,0 führte zu einer um 24 % reduzierten maximalen Biotrockenmassekonzentration von *C. kluyveri*. Dabei wurden die maximalen volumetrischen Substratverbrauchsraten von Acetat und Ethanol um 22 % und 45 % reduziert. Die volumetrischen Produktbildungsraten zeigten bei pH 6,0 eine Reduktion der Butyrat- und Hexanoatbildung um 51 % und 40 % gegenüber pH 6,8. Diese Fettsäuren können von *C. carboxidivorans* bei einem niedrigen pH 5,0 in der sogenannten solventogenen Phase zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden (Doll et al. 2018). Jedoch war bei pH 5,0 eine vollständige Inhibierung von Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* zu sehen. Auf der anderen Seite kann eine Erhöhung des pH  $>$  pH 6,0 eine eingeschränkte Reduktionsfähigkeit von *C. carboxidivorans* zur Folge haben. Dies würde eine mangelnde Umsetzung der von *C. kluyveri* produzierten Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen bedeuten (Fernández-Naveira et al. 2017). Daher wurde im Hinblick auf eine Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* mit *C. kluyveri* pH 6,0 gewählt.

Da Kohlenmonoxid das Hauptsubstrat von autotroph wachsenden *C. carboxidivorans* ist und *C. kluyveri* unter heterotrophen Bedingungen üblicherweise nicht mit CO in Kontakt kommt, wurden Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* in kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktoren mit variierenden Kohlenmonoxidpartialdrücken im Satzverfahren untersucht. Bei einem niedrigen CO-Partialdruck von 100 mbar CO war die maximale Biomassekonzentration bereits um 86 % reduziert. Eine Erhöhung auf 800 mbar CO führte zu einer totalen Wachstumsinhibierung von *C. kluyveri*, wobei die Zellkonzentra-

tion innerhalb einer Prozesszeit von 144 h konstant blieb. Die Ergebnisse der Inhibierungsstudie mit kontinuierlicher Begasung zeigten aber, dass ein Wachstum von *C. kluyveri* für eine erfolgreiche Kettenverlängerung nicht essenziell ist. Die maximalen Butyratkonzentrationen wurden, verglichen mit einem Satzprozess ohne CO in der Gasphase, bei 100 mbar CO um 24 % und bei 800 mbar CO um 48 % reduziert. Die maximalen Hexanoatkonzentrationen wurden mit zunehmendem CO-Partialdruck im Vergleich zu den maximalen Butyratkonzentrationen stärker verringert (60 % bei 100 mbar CO und 87 % bei 800 mbar CO). Die Auswirkung von CO auf *C. kluyveri* wurde daraufhin durch eine zeitlich begrenzte Begasung mit CO im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Satzverfahren analysiert. Während einer Begasung mit 100 mbar über 9 h in der exponentiellen Wachstumsphase von *C. kluyveri*, konnte im Gegensatz zu einem Prozess ohne CO-Zufuhr ein Einbruch der Wasserstoffproduktion verzeichnet werden. Da die Wasserstoffproduktion unmittelbar nach Beendigung der Begasung mit CO wieder auf ihren Ursprungswert anstieg, eröffnete sich die Hypothese einer reversiblen Hemmung der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase in *C. kluyveri* durch CO. Die Ferredoxin-abhängige Hydrogenase in *C. kluyveri* ist für die Produktion von Wasserstoff verantwortlich, wobei reduziertes Ferredoxin oxidiert und damit wiederverwendbar gemacht wird (Seedorf et al. 2008). Die Hemmung durch exogen zugesetztes CO konnte bei der Ferredoxin-abhängigen Hydrogenase in *C. pasteurianum*, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der von *C. kluyveri* besitzt, nachgewiesen werden (Lemon und Peters 1999, Seedorf et al. 2008).

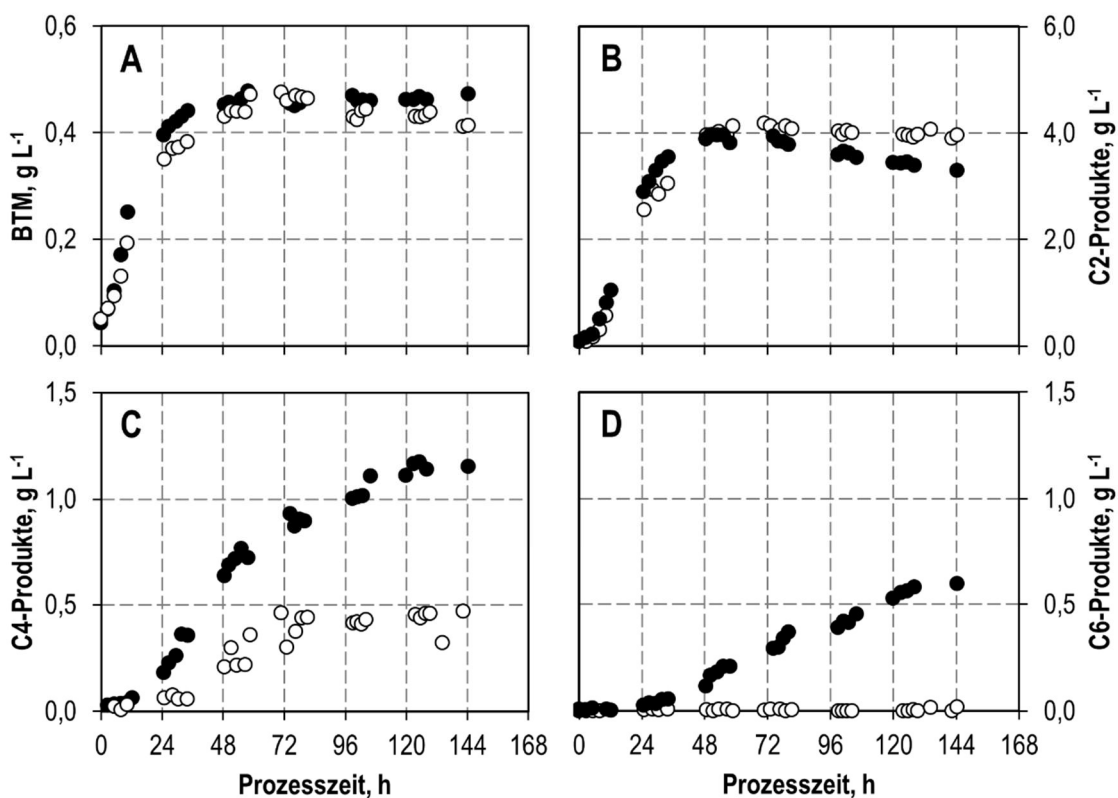
*C. kluyveri* bevorzugt unter idealen Prozessbedingungen ein Ethanol:Acetat-Verhältnis von 2,5:1 (Seedorf et al. 2008). Um zu untersuchen, welche geeignete Ethanol:Acetat-Verhältnisse in Gegenwart von CO sind, wurde der Einfluss der Substratzusammensetzung in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren im Satzverfahren bei einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar untersucht. Dabei wurden Ethanol:Acetat-Verhältnisse gewählt, die auch von *C. carboxidivorans* produziert werden können (Doll 2018). Die Reduktion des Ethanol:Acetat-Verhältnisses von 2,5:1 auf 1:1 zeigte keinen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri*. Eine weitere Reduktion des Ethanolgehalts auf die Verhältnisse 0,33:1 sowie 0,2:1 resultierte jedoch in reduzierten Biomassekonzentrationen um 22 % und 55 %. Dadurch war die Butyratbildung bevorzugt und die Bildung von Hexanoat um 79 % sowie 85 % reduziert. *C. carboxidivorans* kann ebenfalls Butyrat produzieren (Phillips et al. 2015), welches als zusätzliches Substrat für *C. kluyveri* dienen kann (San-Valero et al. 2019). Das manuelle Bereitstellen von Butyrat als weiteren Elektronenakzeptor bei einem Ethanol:Acetat-Verhältnis von 1:1 hatte höhere BTM- und Hexanoatkonzentration zur Folge.

Für den Nachweis und die Quantifizierung von *C. kluyveri* und *C. carboxidivorans* in Ko-Kulturen, wurden durch den Projektpartner (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Prof. Dr. Liebl) zwei spezifische Oligonukleotid-Sonden für 23S rRNA für beide Stämme entwickelt und bereitgestellt, um eine spezifische Markierung von Fermenterproben durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zu ermöglichen (Schneider et al. 2021). Um die Zellzahlen von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* in flüssigen Proben während einer Ko-Kultivierung über die gesamte Prozesszeit bestimmen zu können, wurde das Verfahren der *in solution* FISH in Kombination mit der Durchflusszytometrie (FC) etabliert. Dies ermöglichte die erfolgreiche Quantifizierung der Verhältnisse der beiden Mikroorganismen während einer Ko-Kultivierung im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor.

Aufgrund der CO-Sensitivität von *C. kluyveri* wurden Ko-Kultivierungen von *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* bei verschiedenen initialen CO-Partialdrücken in kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren im Satzverfahren untersucht. Beide Mikroorganismen wurden dabei im Verhältnis 1:1 mit der gleichen Biomassekonzentration inokuliert. Bei einem niedrigen Eingangs-CO-Partialdrucks von 100 mbar war eine, im Vergleich zu *C. kluyveri* bei 100 mbar CO erzielten, erhöhte maximale Biomassekonzentration von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur messbar. Dies korrelierte mit der kontinuierlichen Aufnahme von CO durch *C. carboxidivorans*, wodurch ein geringerer CO-Gehalt in der Flüssigphase vorlag und somit verbessertes Wachstum von *C. kluyveri* ermöglicht war. *C. carboxidivorans* setzte das CO zu Biomasse sowie Acetat und Ethanol um, wobei letztere durch *C. kluyveri* zu Butyrat und Hexanoat verlängert wurden. Die Fähigkeit von *C. carboxidivorans*, diese Produkte zu den korrespondierenden Alkoholen umzusetzen, war jedoch aufgrund der geringen CO-Konzentration und der damit verbundenen eingeschränkten Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten limitiert. Für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten muss CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> umgesetzt werden, weswegen eine ausreichende Verfügbarkeit von CO maßgeblich für die Alkoholbildung durch *C. carboxidivorans* ist (Lee et al. 2008).

Um die Bildung von Alkoholen durch *C. carboxidivorans* zu steigern und gleichzeitig Wachstum und Produktbildung von *C. kluyveri* zu erhalten, wurde der Eingangs-CO-Partialdruck daher zunächst auf 300 mbar erhöht. Dabei konnte vermehrt Ethanol durch *C. carboxidivorans* gebildet werden, sodass sich ein höheres Ethanol:Acetat-Verhältnis in der Fermentationsbrühe einstellte. Dies ermöglichte es, die Hexanoatkonzentrationen durch Kettenverlängerung von *C. kluyveri* im Vergleich zu einem Prozess mit einem Eingangspartialdruck von 100 mbar CO zu erhöhen. Da die Alkoholbildung durch *C. carboxidivorans* bei 300 mbar CO dennoch weiterhin eingeschränkt blieb, wurde der Eingangspartialdruck auf 600 mbar CO und 800 mbar CO gesteigert. Bei 800 mbar CO

konnte die höchste maximale Biotrockenmassekonzentration von *C. carboxidivorans* erreicht werden, während die Biomassekonzentration von *C. kluyveri* über den gesamten Prozesszeitraum hinweg stagnierte. Trotz der niedrigen Biomassekonzentrationen von *C. kluyveri* in der Ko-Kultur mit einem Verhältnis von 13 % *C. kluyveri* zu 87 % *C. carboxidivorans* nach 48 Stunden Prozesszeit, wurden die höchsten finalen Konzentrationen von Hexanoat sowie der angestrebten Alkohole Butanol und Hexanol bei dem höchsten untersuchten CO-Partialdruck von 800 mbar CO erreicht. Die Anwesenheit von *C. kluyveri* hatte in jedem Fall zu einer deutlichen Erhöhung der gewünschten Produktkonzentrationen gegenüber einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* geführt. Insbesondere bei einem hohen initialen CO-Partialdruck von 800 mbar konnten Endkonzentrationen von  $1,15 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat/Butanol sowie  $0,60 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat/Hexanol nach 144 Stunden im Satzverfahren erreicht werden. Dies ist ein Anstieg um fast das Dreifache in Bezug auf die C4-Verbindungen im Vergleich zu einer Monokultur von *C. carboxidivorans*. Zusätzlich war durch Ko-Kultivierung die Bildung von Hexanol im Gegensatz zu einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* ermöglicht (s. Abb. 8-1).



**Abbildung 8-1** Autotrophe Satzprozesse mit einer Ko-Kultur von *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* (schwarz) und einer Monokultur von *C. carboxidivorans* (weiß) in diskontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktoren mit kontinuierlicher Begasung bei einem anfänglichen CO-Partialdruck  $p_{\text{CO},\text{in}} = 800 \text{ mbar}$  ( $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P \text{ V}^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (80:20 CO:CO<sub>2</sub>)).



Diese Ergebnisse belegten, dass eine stabile Ko-Kultivierung von *C. carboxidivorans* mit *C. kluyveri* in kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren im Satzverfahren möglich ist. Dabei hat sich die Relevanz des CO-Gehalts bei der Prozessgestaltung der Ko-Kultivierung gezeigt, da dieser einen deutlichen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung beider Mikroorganismen hat. Insbesondere für *C. kluyveri* konnte ein ausbleibendes Wachstum bereits ab 300 mbar CO beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich die Auswirkung einer Reduktion des Gasvolumenstroms von 0,083 vvm auf 0,042 vvm untersucht, da hierbei die eingetragene CO-Konzentration reduziert wird. Dafür wurden Satzversuche mit variierenden Eingangs-CO-Partialdrücken in Rührkesselreaktoren durchgeführt.

Die Halbierung des Gasvolumenstroms führte bei einem geringen initialen CO-Partialdruck von 100 mbar mit einer maximalen Wachstumsrate von *C. kluyveri* von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  zu einer Verdopplung der maximalen Biotrockenmassekonzentration. Damit verbunden konnte eine deutlich erhöhte Kettenverlängerung mit  $0,76 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Butyrat und  $0,57 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Hexanoat in der Ko-Kultur erreicht werden. Dies begründet sich durch eine sehr niedrige CO-Konzentration im Bioreaktor aufgrund der kontinuierlichen Aufnahme durch *C. carboxidivorans*. Eine Reduktion des Gasvolumenstroms führte jedoch ebenfalls zu einer Verringerung der Reduktionsäquivalente, welche für eine erfolgreiche Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen durch *C. carboxidivorans* notwendig sind. Dadurch konnte keine gesteigerte Bildung von Butanol und Hexanol beobachtet werden. Obwohl bei einer Erhöhung auf 300 mbar CO, 600 mbar CO sowie 800 mbar CO mit einem reduzierten Gasvolumenstroms erhöhte Umsätze von CO und CO<sub>2</sub> messbar waren, wurde das ausgebildete Produktspektrum der Ko-Kultur im Satzprozess in Richtung der C2-Produkte Acetat und Ethanol verschoben. Bei einem hohen initialen CO-Partialdruck von 800 mbar war die volumetrische Produktbildungsrate von Ethanol mit  $1,09 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  um den Faktor 1,8 erhöht, während die Produktbildungsraten von Butanol und Hexanol nur noch 58 % und 12,5 % der mit einem höheren Gasvolumenstrom erreichten Produktbildungsraten entsprachen.

Die Aufrechterhaltung niedriger CO-Partialdrücke, die für Wachstum von *C. kluyveri* erforderlich sind, führen zu einer verringerten Fähigkeit von *C. carboxidivorans*, Alkohole zu bilden. Da aber ein hohes Alkohol:Säure-Verhältnis erstrebenswert ist, wurde eine Möglichkeit zur Verbesserung der Alkoholproduktion untersucht. Eine Bereitstellung in Form von Thioacetamid hatte bei *C. carboxidivorans* in Satzprozessen ohne pH-Kontrolle bereits zu einer Verdopplung der maximalen Biomasse- und Ethanolkonzentrationen geführt (Rückel et al. 2021). Eine kontinuierliche Zugabe von Sulfid hatte bei *C.*

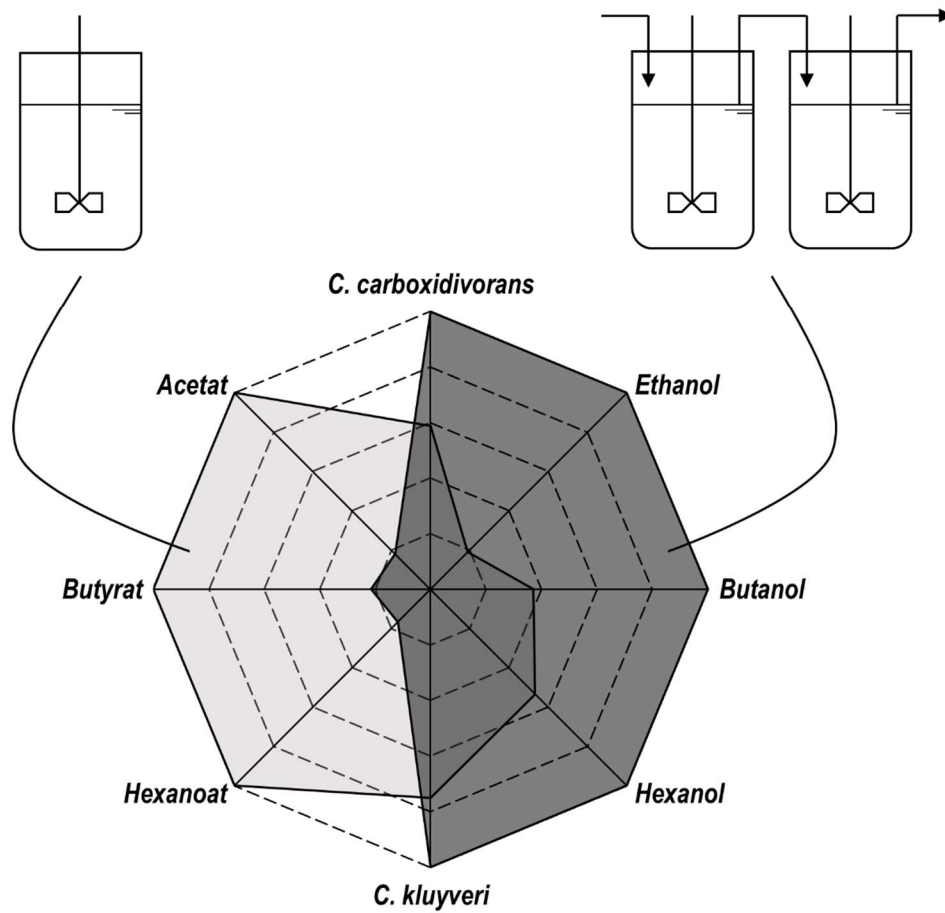
*ragdalei* bei einem kontrollierten pH 5,5 sogar eine dreifach erhöhte Ethanolkonzentration mit insgesamt verbesserten Alkohol:Säure-Verhältnissen zur Folge (Oliveira et al. 2022). Daher wurden die Auswirkungen einer kontinuierlichen Sulfidzufuhr in Form einer kontinuierlichen Zugabe einer Natriumsulfid-Nonahydrat-Lösung auf Wachstum und Produktbildung der Ko-Kultur in kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren im Satzverfahren untersucht. Eine kontinuierliche Sulfid-Bereitstellung führte bei einem geringen CO-Partialdruck von 100 mbar CO bei einem reduzierten Gasvolumenstrom von 0,042 vvm zu erhöhten Alkohol:Säure-Verhältnissen der Ko-Kultur ohne dabei einen negativen Einfluss auf beide Mikroorganismen zu bewirken. Die Sulfid-Bereitstellung führte zu einer deutlich verbesserten Alkoholbildung auf Kosten der Fettsäuren. Die Butanolkonzentration konnte durch Ko-Kultivierung auf die in dieser Arbeit bisher höchsten Butanolkonzentration im Satzprozess von  $1,60 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Die finale und somit maximal in dieser Arbeit in Satzprozessen erreichte Hexanolkonzentration konnte auf  $0,39 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Eine Erhöhung des CO-Partialdrucks von 100 mbar CO auf 800 mbar CO bei einem Gasvolumenstrom von 0,083 vvm führte bei zusätzlicher Sulfidzufuhr zu einer Reduktion der Butanol- und Hexanolkonzentrationen um 47 % und 87 % in der Ko-Kultur. Aufgrund der nahezu nicht messbaren Biomassekonzentration von *C. kluveri* konnte hier von einer ausbleibenden Kettenverlängerung ausgegangen werden, wodurch sich das Produktspektrum auf C2-Verbindungen beschränkte. Das Wachstum von *C. carboxidivorans* sowie die Bildung von Ethanol war in diesem Fall stark erhöht.

Für eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeuten wurde eine räumlich entkoppelte und zweistufige Prozessführung in einer Kaskade aus zwei hintereinander geschalteten Rührkesselreaktoren durchgeführt. Der erste Rührkesselreaktor wurde dabei bei pH 6,0 und einem initialen CO-Partialdruck von 100 mbar bei einem reduzierten Gasvolumenstrom von 0,042 vvm betrieben, um Biomasse- und Säurebildung bei beiden Mikroorganismen zu ermöglichen. Im zweiten Rührkesselreaktor wurde pH 5,0 eingestellt bei einem hohen CO-Gehalt von 800 mbar CO und einem Gasvolumenstrom von 0,083 vvm, um die Reduktion der organischen Säuren mit *C. carboxidivorans* zu den korrespondierenden Alkoholen zu begünstigen. Der zweite Rührkesselreaktor erhielt dabei kontinuierlich Fermentationsbrühe mit Biomasse und Säuren aus dem ersten Reaktor.

Aufgrund des geringen CO-Gehalts im ersten Reaktor war kaum Ethanolbildung durch *C. carboxidivorans* zu verzeichnen, wodurch *C. kluveri* aufgrund von Substratlimitierung wenig verlängerte Fettsäuren produzieren konnte. Auch wenn eine räumlich getrennte Acidogenese und Solventogenese festgestellt werden konnte, konnte nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten kein Fließgleichgewicht erreicht werden. Durch eine zusätzliche kontinuierliche Sulfid-Bereitstellung im ersten Bioreaktor konnte die Ethanolbildung

durch *C. carboxidivorans* angeregt werden, sodass eine verbesserte Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* festgestellt werden konnte. Dies konnte mit einer Erhöhung der Hexanoatkonzentration im ersten Reaktor nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten um das 1,8-fache beobachtet werden. Durch diese Erhöhung konnte eine 1,5-fache und 1,7-fache Steigerung der Butanol- und Hexanolkonzentrationen im zweiten Bioreaktor erzielt werden. Aufgrund der gewählten geringen Verdünnungsraten von  $D_{R1} = 0,06^{-1}$  und  $D_{R2} = 0,04 \text{ h}^{-1}$  war ein Durchlaufen von Maxima und Minima sowohl in den Biomasse- als auch den Produktkonzentrationen zu verzeichnen, sodass kein Fließgleichgewicht erreicht werden konnte.

Eine Erhöhung der Verdünnungsraten auf  $D_{R1} = 0,09^{-1}$  und  $D_{R2} = 0,06 \text{ h}^{-1}$  erzielte nach 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten (167 h) stabile Fließgleichgewichte mit einer klaren räumlichen Trennung von Acidogenese im ersten und Solventogenese im zweiten Reaktor. Somit konnten stabile Konzentrationen von  $2,89 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  Acetat und  $0,31 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat sowie  $0,05 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat nach 12,5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im ersten Bioreaktor erreicht werden. Die Alkoholbildung fand ausschließlich im zweiten Reaktor mit Gleichgewichtskonzentrationen von  $3,78 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol,  $0,97 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol,  $0,16 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  1-Hexanol und  $0,77 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$  1-Octanol statt. Im Vergleich zu einem Satzprozess mit der identischen Ko-Kultur bei einem hohen anfänglichen CO-Partialdruck von 800 mbar waren die Konzentrationen von Ethanol und Butanol im Fließgleichgewicht um das 1,8-fache und 1,2-fache erhöht. Wie erwartet waren die Raum-Zeit-Ausbeuten der Alkohole mit der kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Bioreaktorkaskade im Vergleich zum Satzverfahren deutlich erhöht. Die volumetrischen Produktionsraten wurden für Ethanol (Faktor 5,3), Butanol (Faktor 2,7) und Hexanol (Faktor 1,9) deutlich gesteigert (Abb. 8-2).



**Abbildung 8-2** Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten der Biomasse sowie der Produkte bei der Satz-Kultivierung von *C. carboxidivorans* zusammen mit *C. kluyveri* (hellgrau) ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,0$ ;  $P V^{-1} = 11,7 \text{ W L}^{-1}$ ;  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$  (80:20  $\text{CO}:\text{CO}_2$ )) und kontinuierlicher autotropher  $\text{CO}$ -Umwandlungsprozesse unter Verwendung einer Bioreaktorkaskade mit einer Verdünnungsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  im ersten Reaktor und  $0,06 \text{ h}^{-1}$  im zweiten Reaktor (dunkelgrau) ( $P = 1 \text{ bar}$ ,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 200 \text{ mbar CO}_2$ ). Erster Reaktor:  $\text{pH} 6,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 100 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,042 \text{ vvm}$ ,  $0,05 \text{ mM S L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; zweiter Reaktor:  $\text{pH} 5,0$ ,  $p_{\text{CO}_2, \text{in}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $F_{\text{gas}} = 0,083 \text{ vvm}$ . Die höchste erreichte RZA der Prozesse wurde auf 1 normiert.

Insgesamt konnten stabile synthetische Ko-Kulturen bestehend aus *C. carboxidivorans* und *C. kluyveri* zur Bildung von Alkoholen aus  $\text{CO}$  sowohl in Satzprozessen als auch in einer kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskade etabliert werden. Ebenfalls konnten in jedem Fall verbesserte Produktivitäten durch die Verwendung einer Ko-Kultur gegenüber einer Reinkultur von *C. carboxidivorans* belegt werden.

## Ausblick

Die Biomassekonzentration von *C. carboxidivorans* war bereits im ersten Bioreaktor der kontinuierlichen Kaskade im Vergleich zu *C. kluyveri* im stationären Zustand 17-Mal höher. Folglich sind in Zukunft weniger CO-empfindliche kettenverlängernde Mikroorganismen erforderlich, um kontinuierliche Ko-Kultivierungsprozesse mit acetogenen Bakterien wie *C. carboxidivorans*, die CO als Substrat verwenden, zu verbessern. Denn hohe CO-Partialdrücke sind sowohl für die Bildung günstiger Verhältnisse von Ethanol zu Acetat, die für eine gute Kettenverlängerung durch *C. kluyveri* notwendig sind, sowie für die Reduktion von Carbonsäuren zu den entsprechenden Alkoholen mit *C. carboxidivorans* erforderlich. Das Wachstum von *C. kluyveri* wird durch CO stark reduziert, aber die Zellen bleiben lebensfähig und metabolisch aktiv. Zu diesem Zweck wäre die automatisierte adaptive Laborevolution (ALE) in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkessel-Bioreaktoren ein interessanter Ansatz, um *C. kluyveri*-Stämme durch einen erhöhten CO-Partialdruck zu selektieren. Eine Genomsequenzierung der weiterentwickelten *C. kluyveri*-Stämme würde anschließend die Identifizierung von Mutationen im Genom ermöglichen, sodass ausgewählte Mutationen durch „Reverse Engineering“ im definierten Ausgangsstamm eingeführt und getestet werden könnten (Lee und Kim 2020; Godara und Kao 2020).

Da insbesondere die längerkettigen Produkte nicht nur von größerem industriellem Interesse sind (Köpke et al. 2011), sondern auch leichter aus der Fermentationsbrühe extrahiert werden können (Grootscholten et al. 2013), sollte eine vollständige Umsetzung der zuvor gebildeten Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen angestrebt werden. Durch eine Erhöhung der mittleren hydraulischen Verweilzeit im zweiten Rührkesselreaktor der Rührkesselkaskade entsteht mehr Zeit für die Reduktion der Fettsäuren sowie einer Alkoholneubildung. Zusätzlich sollte die Verwendung eines Membranreaktors als zweiten Rührkesselreaktor in der Rührkesselkaskade in Betracht gezogen werden, da sich durch einen Zellrückhalt die Biomassekonzentration und die damit verbundene Alkoholbildung erhöhen ließe (Shen et al. 2014). Dabei sollte eine Produktabtrennung integriert werden, um eine Inhibierung der Mikroorganismen durch zu hohe Produktkonzentration zu vermeiden (Li et al. 2016).

Biogene Synthesegase können Verunreinigungen wie beispielsweise  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$  enthalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere Stickoxide wie Nitrat und Nitrit negative Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* haben (Rückel et al. 2021). In diesem Zusammenhang sollten die Auswirkungen dieser Verunreinigungen auf *C. kluyveri* ebenfalls untersucht werden, sodass eine stabile Ko-Kultivierung auch mit realen Synthesegasen erfolgen kann.

## 9. Literaturverzeichnis

- Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2011): Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. In: *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 5 (1), S. 93–114. DOI: 10.1002/bbb.256.
- Agler, Matthew T.; Spirito, Catherine M.; Usack, Joseph G.; Werner, Jeffrey J.; Angenent, Largus T. (2012): Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. In: *Energy Environ. Sci.* 5 (8), S. 8189. DOI: 10.1039/c2ee22101b.
- Andrews, John F. (1968): A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. In: *Biotechnol. Bioeng.* 10 (6), S. 707–723. DOI: 10.1002/bit.260100602.
- Angenent, Largus T.; Richter, Hanno; Buckel, Wolfgang; Spirito, Catherine M.; Steinbusch, Kirsten J. J.; Plugge, Caroline M. et al. (2016): Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology To Produce Biochemicals. In: *Environmental Science & Technology* 50 (6), S. 2796–2810. DOI: 10.1021/acs.est.5b04847.
- Baerns, Manfred; Behr, Arno; Brehm, Axel; Gmehling, Jürgen; Hinrichsen, Kai-Olaf; Hofmann, Hanns et al. (2013): Technische Chemie. Zweite, erweiterte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.
- Barker, H. A.; Taha, M. (1941): *Clostridium kluuyveri*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. In: *Journal of Bacteriology* 43, S. 347–363.
- Bäumler, Miriam; Schneider, Martina; Ehrenreich, Armin; Liebl, Wolfgang; Weuster-Botz, Dirk (2022): Synthetic co-culture of autotrophic *Clostridium carboxidivorans* and chain elongating *Clostridium kluuyveri* monitored by flow cytometry. In: *Microbial Biotechnology* 15 (5), S. 1471–1485. DOI: 10.1111/1751-7915.13941.
- Bengelsdorf, Frank R.; Beck, Matthias H.; Erz, Catarina; Hoffmeister, Sabrina; Karl, Michael M.; Riegler, Peter et al. (2018): Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> Fermentation. In: *Advances in Applied Microbiology* 103, S. 143–221. DOI: 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. In: *Biochemistry* 39 (25), S. 7455–7460. DOI: 10.1021/bi992583z.
- Bielzer, Swen (2019): Herstellung von Butanol, Hexanol und Capronsäure auf Basis CO und CO<sub>2</sub> mittels Fermentation von acetogenen Bakterien zusammen mit C.

- kluyveri* und Untersuchung der beteiligten Faktoren. Dissertation. Universität Ulm, Ulm.
- Binnewies, Michael; Finze, Maik; Jäckel, Manfred; Schmidt, Peer; Willner, Helge; Rayner-Canham, Geoffrey (2016): Allgemeine und anorganische Chemie. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin: Springer Spektrum (Lehrbuch).
- Boiangiu, Clara D.; Jayamani, Elamparithi; Brügel, Daniela; Herrmann, Gloria; Kim, Jihoe; Forzi, Lucia et al. (2005): Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 10 (2-4), S. 105–119. DOI: 10.1159/000091558.
- Bornstein, B. T.; Barker, H. A. (1948a): The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids. In: *Journal of Biological Chemistry*, S. 659–669.
- Bornstein, B. T.; Barker, H. A. (1948b): The nutrition of *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of Bacteriology*, S. 223–230.
- Bowles, L. K.; Ellefson, W. L. (1985): Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 50 (5), S. 1165–1170. DOI: 10.1128/aem.50.5.1165-1170.1985.
- Bredwell, M. D.; Srivastava, P.; Worden, R. M. (1999): Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. In: *Biotechnology Progress* 15 (5), S. 834–844. DOI: 10.1021/bp990108m.
- Buckel, Wolfgang; Thauer, Rudolf K. (2018): Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD<sup>+</sup> (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 401. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00401.
- Candry, Pieter; van Daele, Timothy; Denis, Kyrina; Amerlinck, Youri; Andersen, Stephen J.; Ganigué, Ramon et al. (2018): A novel high-throughput method for kinetic characterisation of anaerobic bioproduction strains, applied to *Clostridium kluyveri*. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 9724. DOI: 10.1038/s41598-018-27594-9.
- Cavalcante, Willame de Araújo; Leitão, Renato Carrhá; Gehring, Tito A.; Angenent, LARGUS T.; Santaella, Sandra Tédde (2017): Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. In: *Process Biochemistry* 54, S. 106–119. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.024.
- Chmiel, Horst; Walitza, Eckehard (2018): Transportvorgänge in Biosuspensionen: Bioprozesstechnik. Hg. v. Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 131–156.
- Chmiel, Horst; Weuster-Botz, Dirk (2018): Bioreaktoren: Bioprozesstechnik. Hg. v. Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 157–230.

- Claassens, Nico J.; Cotton, Charles A. R.; Kopljar, Dennis; Bar-Even, Arren (2019): Making quantitative sense of electromicrobial production. In: *Nat Catal* 2 (5), S. 437–447. DOI: 10.1038/s41929-019-0272-0.
- Clarke, K. G.; Hansford, G. S.; Jones, D. T. (1988): Nature and significance of oscillatory behavior during solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. In: *Biotechnol. Bioeng.* 32 (4), S. 538–544. DOI: 10.1002/bit.260320417.
- Costa, J. M.; Moreira, A. R. (1983): Growth Inhibition Kinetics for the Acetone-Butanol Fermentation. In: Harvey W. Blanch, E. Terry Papoutsakis und Gregory Stephanopoulos (Hg.): *Foundations of Biochemical Engineering*, Bd. 207. WASHINGTON, D.C.: American Chemical Society (ACS Symposium Series), S. 501–512.
- Daniell, James; Köpke, Michael; Simpson, Séan (2012): Commercial Biomass Syngas Fermentation. In: *Energies* 5 (12), S. 5372–5417. DOI: 10.3390/en5125372.
- Decker, K.; Pfitzer, S. (1972): Determination of steady-state concentrations of adenine nucleotides in growing *C. kluyveri* cells by biosynthetic labeling. In: *Analytical Biochemistry* 50 (2), S. 529–539. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90063-2.
- Diender, Martijn; Stams, Alfons J. M.; Sousa, Diana Z. (2016): Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas. In: *Biotechnology for Biofuels* 9, S. 82. DOI: 10.1186/s13068-016-0495-0.
- Ding, Hong-Bo; Tan, Giin-Yu Amy; Wang, Jing-Yuan (2010): Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. In: *Bioresource Technology* 101 (24), S. 9550–9559. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.07.056.
- Do, Young S.; Smeenk, Jerod; Broer, Karl M.; Kisting, Clint J.; Brown, Robert; Heindel, Theodore J. et al. (2007): Growth of *Rhodospirillum rubrum* on synthesis gas: conversion of CO to H<sub>2</sub> and poly-beta-hydroxyalkanoate. In: *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2), S. 279–286. DOI: 10.1002/bit.21226.
- Doll, Kathrin (2018): Reaktionstechnische Untersuchungen zur autotrophen Herstellung von Alkoholen mit *Clostridium carboxidivorans*. Dissertation. Technische Universität München, Garching. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Doll, Kathrin; Rückel, Anton; Kämpf, Peter; Wende, Maximilian; Weuster-Botz, Dirk (2018): Two stirred-tank bioreactors in series enable continuous production of alcohols from carbon monoxide with *Clostridium carboxidivorans*. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41 (10), S. 1403–1416. DOI: 10.1007/s00449-018-1969-1.
- Doran, Pauline M. (2013): *Bioprocess engineering principles*. Chapter 10 - Mass Transfer. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press.



- Drake, H. L.; Küsel, K.; Matthies, C. (2006): Acetogenic Prokaryotes. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, E. Rosenberg und Schleifer, K.-H. u. Stackebrandt, E. (Hg.): *The prokaryotes*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer, S. 354–420.
- Drake, Harold L.; Gössner, Anita S.; Daniel, Steven L. (2008): Old acetogens, new light. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, S. 100–128. DOI: 10.1196/annals.1419.016.
- Du, Yuanfen; Zou, Wei; Zhang, Kaizheng; Ye, Guangbin; Yang, Jiangang (2020): Advances and Applications of Clostridium Co-culture Systems in Biotechnology. In: *Frontiers in Microbiology* 11, S. 560223. DOI: 10.3389/fmicb.2020.560223.
- Dürre, P. (2005): Formation of solvents in clostridia. In: P. Dürre (Hg.): *Handbook on clostridia*. Boca Raton: Taylor & Francis, S. 846–874.
- Dürre, Peter; Eikmanns, Bernhard J. (2015): C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. In: *Current Opinion in Biotechnology* 35, S. 63–72. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.03.008.
- European Commission; Directorate-General for Climate Action; Directorate-General for Energy; Directorate-General for Mobility and Transport; Vita, A. de; Capros, P. et al. (2021): *EU reference scenario 2020: energy, transport and GHG emissions: trends to 2050*: Publications Office.
- Fernández-Blanco, Carla; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2022): Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium aceticum* and *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of Environmental Management* 302 (Pt A), S. 113992. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113992.
- Fernández-Naveira, Ánxela; Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2016): Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (7), S. 3361–3370. DOI: 10.1007/s00253-015-7238-1.
- Fernández-Naveira, Ánxela; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2017): H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (4), S. 712–731. DOI: 10.1002/jctb.5194.
- Fernández-Naveira, Ánxela; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2019): Selective anaerobic fermentation of syngas into either C2-C6 organic acids or ethanol and higher alcohols. In: *Bioresource Technology* 280, S. 387–395. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.018.

- Ge, Shijian; Usack, Joseph G.; Spirito, Catherine M.; Angenent, LARGUS T. (2015): Long-Term n-Caproic Acid Production from Yeast-Fermentation Beer in an Anaerobic Bioreactor with Continuous Product Extraction. In: *Environmental Science & Technology* 49 (13), S. 8012–8021. DOI: 10.1021/acs.est.5b00238.
- Gey, Manfred H. (2015): Instrumentelle Analytik Und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 3. Aufl. 2015. Berlin, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Springer-Lehrbuch).
- Gildemyn, Sylvia; Molitor, Bastian; Usack, Joseph G.; Nguyen, Mytien; Rabaey, Korneel; Angenent, LARGUS T. (2017): Upgrading syngas fermentation effluent using *Clostridium kluyveri* in a continuous fermentation. In: *Biotechnology for Biofuels* 10, S. 83. DOI: 10.1186/s13068-017-0764-6.
- Godara, Avinash; Kao, Katy C. (2020): Adaptive laboratory evolution for growth coupled microbial production. In: *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 36 (11), S. 175. DOI: 10.1007/s11274-020-02946-8.
- González-Cabaleiro, Rebeca; Lema, Juan M.; Rodríguez, Jorge; Kleerebezem, Robert (2013): Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. In: *Energy Environ. Sci.* 6 (12), S. 3780. DOI: 10.1039/c3ee42754d.
- Griffin, Derek W.; Schultz, Michael A. (2012): Fuel and chemical products from biomass syngas: A comparison of gas fermentation to thermochemical conversion routes. In: *Environ. Prog. Sustainable Energy* 31 (2), S. 219–224. DOI: 10.1002/ep.11613.
- Grootscholten, T. I. M.; Steinbusch, K. J. J.; Hamelers, H. V. M.; Buisman, C. J. N. (2013): Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. In: *Bioresource Technology* 135, S. 440–445. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.165.
- Haroon, Mohamed F.; Skennerton, Connor T.; Steen, Jason A.; Lachner, Nancy; Hugenholtz, Philip; Tyson, Gene W. (2013): In-solution fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence-activated cell sorting for single cell and population genome recovery. In: *Methods in Enzymology* 531, S. 3–19. DOI: 10.1016/B978-0-12-407863-5.00001-0.
- Harris, Daniel C. (2014): Lehrbuch der Quantitativen Analyse. 8., vollst. überarb. erw. Aufl. 2014. Hg. v. Gerhard. Werner und Tobias. Werner. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer Spektrum.
- Herrero, A. A. (1983): End-product inhibition in anaerobic fermentations. In: *Trends in Biotechnology* 1 (2), S. 49–53.

- Hungate, R. (1976): A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: J. Norris (Hg.): *Methods in Microbiology*, Bd. 3. Unter Mitarbeit von A. Willis. London: Academic Press, S. 117–132.
- Hurst, Kendall M.; Lewis, Randy S. (2010): Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. In: *Biochemical Engineering Journal* 48 (2), S. 159–165. DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.004.
- Jones, D. T.; Woods, D. R. (1986): Acetone-butanol fermentation revisited. In: *Microbiological Reviews* 50 (4), S. 484–524. DOI: 10.1128/mr.50.4.484-524.1986.
- Jungermann, K.; Thauer, R. K.; Decker, K. (1968): The synthesis of one-carbon units from CO<sub>2</sub> in *Clostridium kluyveri*. In: *European Journal of Biochemistry* 3 (3), S. 351–359. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb19536.x.
- Kantzow, Christina; Weuster-Botz, Dirk (2016): Effects of hydrogen partial pressure on autotrophic growth and product formation of *Acetobacterium woodii*. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39 (8), S. 1325–1330. DOI: 10.1007/s00449-016-1600-2.
- Kenealy, W. R.; Cao, Y.; Weimer, Paul J. (1995): Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. In: *Applied Microbial Biotechnology*, S. 507–513.
- Kenealy, W. R.; Waselefsky, D. M. (1985): Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate. In: *Archives of Microbiology*, S. 187–194.
- Köpke, Michael; Mihalcea, Christophe; Liew, FunGMin; Tizard, Joseph H.; Ali, Mohammed S.; Conolly, Joshua J. et al. (2011): 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15), S. 5467–5475. DOI: 10.1128/AEM.00355-11.
- Kottenhahn, Patrick; Philipps, Gabriele; Jennewein, Stefan (2021): Hexanol biosynthesis from syngas by *Clostridium carboxidivorans* P7 - product toxicity, temperature dependence and *in situ* extraction. In: *Heliyon* 7 (8), e07732. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07732.
- Kucek, Leo A.; Spirito, Catherine M.; Angenent, LARGUS T. (2016): High n-caprylate productivities and specificities from dilute ethanol and acetate: chain elongation with microbiomes to upgrade products from syngas fermentation. In: *Energy Environ. Sci.* 9 (11), S. 3482–3494. DOI: 10.1039/C6EE01487A.

- Kumar, Manish; Saini, Supreet; Gayen, Kalyan (2014): Elementary mode analysis reveals that *Clostridium acetobutylicum* modulates its metabolic strategy under external stress. In: *Molecular BioSystems* 10 (8), S. 2090–2105. DOI: 10.1039/c4mb00126e.
- Laís Thomaz; Carlos Eduardo Ferreira de Carvalho (2011): The tortilla crisis in Mexico (2007): the upward trend in commodity prices, financial instability and food security (v. 3).
- Lauer, Ira; Philipps, Gabriele; Jennewein, Stefan (2022): Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. In: *Microbial Cell Factories* 21 (1), S. 85. DOI: 10.1186/s12934-022-01802-8.
- Lay, Christophe; Doré, Joël; Rigottier-Gois, Lionel (2007): Separation of bacteria of the *Clostridium leptum* subgroup from the human colonic microbiota by fluorescence-activated cell sorting or group-specific PCR using 16S rRNA gene oligonucleotides. In: *FEMS Microbiology Ecology* 60 (3), S. 513–520. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00312.x.
- Lee, Sang Yup; Park, Jin Hwan; Jang, Seh Hee; Nielsen, Lars K.; Kim, Jaehyun; Jung, Kwang S. (2008): Fermentative butanol production by Clostridia. In: *Biotechnol. Bioeng.* 101 (2), S. 209–228. DOI: 10.1002/bit.22003.
- Lee, SuRin; Kim, Pil (2020): Current Status and Applications of Adaptive Laboratory Evolution in Industrial Microorganisms. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (6), S. 793–803. DOI: 10.4014/jmb.2003.03072.
- Lemon, B. J.; Peters, J. W. (1999): Binding of exogenously added carbon monoxide at the active site of the iron-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum*. In: *Biochemistry* 38 (40), S. 12969–12973. DOI: 10.1021/bi9913193.
- Li, Fuli; Hinderberger, Julia; Sedorf, Henning; Zhang, Jin; Buckel, Wolfgang; Thauer, Rudolf K. (2008): Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of Bacteriology* 190 (3), S. 843–850. DOI: 10.1128/JB.01417-07.
- Li, Si-Yu; Chiang, Chung-Jen; Tseng, I-Ting; He, Chi-Ruei; Chao, Yun-Peng (2016): Bioreactors and in situ product recovery techniques for acetone-butanol-ethanol fermentation. In: *FEMS Microbiology Letters* 363 (13). DOI: 10.1093/femsle/fnw107.
- Liew, FungMin; Martin, Michael E.; Tappel, Ryan C.; Heijstra, Björn D.; Mihalcea, Christophe; Köpke, Michael (2016): Gas Fermentation-A Flexible Platform for Commercial Scale Production of Low-Carbon-Fuels and Chemicals from Waste and Renewable Feedstocks. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 694. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00694.

- Liou, Jack S-C; Balkwill, David L.; Drake, Gwendolyn R.; Tanner, Ralph 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. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (Pt 5), S. 2085–2091. DOI: 10.1099/ijs.0.63482-0.
- Liu, Yuhao; Lü, Fan; Shao, Liming; He, Pinjing (2016): Alcohol-to-acid ratio and substrate concentration affect product structure in chain elongation reactions initiated by unacclimatized inoculum. In: *Bioresource Technology* 218, S. 1140–1150. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.067.
- Ljungdahl, L. G.; Wood, H. (1969): Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by heterotrophic bacteria. In: *Annual Review of Microbiology* 23, S. 515–538. DOI: 10.1146/annurev.mi.23.100169.002503.
- Lonkar, Sagar; Fu, Zhihong; Holtzapfel, Mark (2016): Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate. In: *Bio-technology and Bioengineering* 113 (12), S. 2597–2604. DOI: 10.1002/bit.26024.
- Ludwig, Wolfgang; Strunk, Oliver; Westram, Ralf; Richter, Lothar; Meier, Harald; Yadhukumar et al. (2004): ARB: a software environment for sequence data. In: *Nucleic Acids Research* 32 (4), S. 1363–1371. DOI: 10.1093/nar/gkh293.
- Lynen, F.; Ochoa, S. (1953): Enzymes of fatty acid metabolism. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 12 (1-2), S. 299–314. DOI: 10.1016/0006-3002(53)90149-8.
- Mock, Johanna; Zheng, Yanning; Mueller, Alexander P.; Ly, San; Tran, Loan; Segovia, Simon et al. (2015): Energy Conservation Associated with Ethanol Formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in *Clostridium autoethanogenum* Involving Electron Bifurcation. In: *Journal of Bacteriology* 197 (18), S. 2965–2980. DOI: 10.1128/JB.00399-15.
- Mohammadi, Maedeh; Najafpour, Ghasem D.; Younesi, Habibollah; Lahijani, Pooya; Uzir, Mohamad Hekari; Mohamed, Abdul Rahman (2011): Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (9), S. 4255–4273. DOI: 10.1016/j.rser.2011.07.124.
- Molitor, Bastian; Richter, Hanno; Martin, Michael E.; Jensen, Rasmus O.; Juminaga, Alex; Mihalcea, Christophe; Angenent, LARGUS T. (2016): Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries. In: *Bioresource Technology* 215, S. 386–396. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.094.
- Monod, Jacques (1949): The Growth of Bacterial Cultures. In: *Annual Review of Microbiology* (3), S. 371–394.

- Müller, V.; Imkamp, Frank; Rauwolf, Andreas; Küsel, K.; Drake, Harold L. (2004): Molecular and cellular biology of acetogenic bacteria. In: Michiko M. Nakano und Peter Zuber (Hg.): *Strict and facultative anaerobes: Medical and environmental aspects*. Wymondham, Norfolk: Horizon Bioscience, S. 251–281.
- Müller-Erlwein, Erwin (2015): *Chemische Reaktionstechnik*. 3., überarb. Aufl. 2015. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden (Chemie in der Praxis).
- Munasinghe, Pradeep Chaminda; Khanal, Samir Kumar (2010): Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. In: *Bioresource Technology* 101 (13), S. 5013–5022. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.098.
- Oliveira, Luis; Röhrenbach, Simon; Holzmüller, Verena; Weuster-Botz, Dirk (2022): Continuous sulfide supply enhanced autotrophic production of alcohols with *Clostridium ragsdalei*. In: *Bioresour. Bioprocess.* 9 (1). DOI: 10.1186/s40643-022-00506-6.
- Perry, R. H.; Green, D. W.; Maloney, J. O.; Abbott, M. M.; Ambler, C. M. und Amero, R. (1997): *Perry's chemical engineers' handbook*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Phillips, John R.; Atiyeh, Hasan K.; Tanner, Ralph S.; Torres, Juan R.; Saxena, Jyotisna; Wilkins, Mark R.; Huhnke, Raymond L. (2015): Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. In: *Bioresource Technology* 190, S. 114–121. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.043.
- Quast, Christian; Pruesse, Elmar; Yilmaz, Pelin; Gerken, Jan; Schweer, Timmy; Yarza, Pablo et al. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. In: *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue), D590-6. DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- Quicker, Peter; Neuerburg, Florian; Noel, Yves; Huras, Adrianna; Eyssen, Ralf Georg; Seifert, Helmut et al.: *Sachstand zu den alternativen Verfahren für die thermische Entsorgung von Abfällen 2017*.
- Ragsdale, Stephen W. (2004): Life with carbon monoxide. In: *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39 (3), S. 165–195. DOI: 10.1080/10409230490496577.
- Ragsdale, Stephen W. (2008): Enzymology of the wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, S. 129–136. DOI: 10.1196/annals.1419.015.
- Ragsdale, Stephen W.; Pierce, Elizabeth (2008): Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (12), S. 1873–1898. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.08.012.

- Rajagopalan, Srinu; P. Datar, Rohit; Lewis, Randy S. (2002): Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. In: *Biomass and Bioenergy* 23 (6), S. 487–493. DOI: 10.1016/S0961-9534(02)00071-5.
- Reddy, M. Venkateswar; Mohan, S. Venkata; Chang, Young-Cheol (2018): Medium-Chain Fatty Acids (MCFA) Production Through Anaerobic Fermentation Using *Clostridium kluyveri*: Effect of Ethanol and Acetate. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 185 (3), S. 594–605. DOI: 10.1007/s12010-017-2674-2.
- Richter, Hanno; Martin, Michael; Angenent, LARGUS (2013): A Two-Stage Continuous Fermentation System for Conversion of Syngas into Ethanol. In: *Energies* 6 (8), S. 3987–4000. DOI: 10.3390/en6083987.
- Richter, Hanno; Molitor, Bastian; Diender, Martijn; Sousa, Diana Z.; Angenent, LARGUS T. (2016): A Narrow pH Range Supports Butanol, Hexanol, and Octanol Production from Syngas in a Continuous Co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with In-Line Product Extraction. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 1773. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01773.
- Roghair, Mark; Hoogstad, Tim; Strik, David P. B. T. B.; Plugge, Caroline M.; Timmers, Peer H. A.; Weusthuis, Ruud A. et al. (2018): Controlling Ethanol Use in Chain Elongation by CO<sub>2</sub> Loading Rate. In: *Environmental Science & Technology* 52 (3), S. 1496–1505. DOI: 10.1021/acs.est.7b04904.
- Rothe, G. (2006): Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Ulrich Sack, A. Tárnok und G. Rothe (Hg.): *Zelluläre Diagnostik*. Basel: Karger, S. 27–70.
- Rückel, Anton; Hannemann, Jens; Maierhofer, Carolin; Fuchs, Alexander; Weuster-Botz, Dirk (2021): Studies on Syngas Fermentation With *Clostridium carboxidivorans* in Stirred-Tank Reactors With Defined Gas Impurities. In: *Frontiers in Microbiology* 12, S. 655390. DOI: 10.3389/fmicb.2021.655390.
- San-Valero, P.; Fernández-Naveira, Á.; Veiga, M. C.; Kennes, C. (2019): Influence of electron acceptors on hexanoic acid production by *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of Environmental Management* 242, S. 515–521. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.04.093.
- San-Valero, Pau; Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2020): Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production. In: *Bioresource Technology* 300, S. 122659. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122659.
- Schneider, Martina; Bäumlner, Miriam; Lee, Natuschka M.; Weuster-Botz, Dirk; Ehrenreich, Armin; Liebl, Wolfgang (2021): Monitoring co-cultures of *Clostridium carbox-*

- divorans* and *Clostridium kluyveri* by fluorescence *in situ* hybridization with specific 23S rRNA oligonucleotide probes. In: *Systematic and Applied Microbiology* 44 (6), S. 126271. DOI: 10.1016/j.syapm.2021.126271.
- Schoberth, S.; Gottschalk, G. (1969): Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. In: *Archiv für Mikrobiologie* 65 (4), S. 318–328. DOI: 10.1007/BF00412211.
- Schuchmann, Kai; Müller, Volker (2014): Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. In: *Nature Reviews. Microbiology* 12 (12), S. 809–821. DOI: 10.1038/nrmicro3365.
- Seedorf, Henning; Fricke, W. F.; Veith, B.; Brüggemann, H.; Liesegang, H.; Strittmatter, A. (2008): The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (6), Artikel 105, S. 2128–2133.
- Shen, Yanwen; Brown, Robert; Wen, Zhiyou (2014): Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. In: *Biochemical Engineering Journal* 85, S. 21–29. DOI: 10.1016/j.bej.2014.01.010.
- Skoog, Douglas A.; Leary, James J. (1996): *Instrumentelle Analytik*: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Spirito, Catherine M.; Richter, Hanno; Rabaey, Korneel; Stams, Alfons J. M.; Angenent, LARGUS T. (2014): Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. In: *Current Opinion in Biotechnology* 27, S. 115–122. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.01.003.
- Steinbusch, Kirsten J. J.; Hamelers, Hubertus V. M.; Plugge, Caroline M.; Buisman, Cees J. N. (2011): Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. In: *Energy Environ. Sci.* 4 (1), S. 216–224. DOI: 10.1039/C0EE00282H.
- Thauer, R. K.; Rupprecht, E.; Jungermann, K. (1970): The synthesis of one-carbon units from CO<sub>2</sub> via a new ferredoxin dependent monocarboxylic acid cycle. In: *FEBS Letters* 8 (5), S. 304–307. DOI: 10.1016/0014-5793(70)80293-9.
- Tomlinson, N.; Barker, H. A. (1954): Carbon dioxide and acetate utilization by *Clostridium kluyveri*. In: *Journal of Biological Chemistry* (209), S. 585–595.
- Ukpong, Michael N.; Atiyeh, Hasan K.; Lorme, Marthah J. M. de; Liu, Kan; Zhu, Xiaoguang; Tanner, Ralph S. et al. (2012): Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. In: *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11), S. 2720–2728. DOI: 10.1002/bit.24549.



- Vasudevan, Divya; Richter, Hanno; Angenent, LARGUS T. (2014): Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. In: *Biore-source Technology* 151, S. 378–382. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.105.
- Venkata Mohan, S.; Modestra, J. Annie; Amulya, K.; Butti, Sai Kishore; Velvizhi, G. (2016): A Circular Bioeconomy with Biobased Products from CO<sub>2</sub> Sequestration. In: *Trends in Biotechnology* 34 (6), S. 506–519. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.012.
- Vollherbst-Schneck, K.; Sands, J. A.; Montenecourt, B. S. (1984): Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: *Applied and Environmental Microbiology* 47 (1), S. 193–194. DOI: 10.1128/aem.47.1.193-194.1984.
- Weimer, Paul J.; Stevenson, David M. (2012): Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (2), S. 461–466. DOI: 10.1007/s00253-011-3751-z.
- Weuster-Botz, Dirk; Kensy, Frank; Wever, Heleen de; Garcia-Gonzalez, Linsey (2020): Mikrobielle Verfahren zur Umsetzung von CO<sub>2</sub> und CO. In: Manfred Kircher und Thomas Schwarz (Hg.): CO<sub>2</sub> und CO – Nachhaltige Kohlenstoffquellen für die Kreislaufwirtschaft. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 121–150.
- Weuster-Botz, Dirk; Takors, Ralf (2018a): Prozessmodelle: Bioprozesstechnik. Hg. v. Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 71–105.
- Weuster-Botz, Dirk; Takors, Ralf (2018b): Wachstumskinetik: Bioprozesstechnik. Hg. v. Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 45–70.
- Wilkins, Mark R.; Atiyeh, Hasan K. (2011): Microbial production of ethanol from carbon monoxide. In: *Current Opinion in Biotechnology* 22 (3), S. 326–330. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.03.005.
- Woods, D. R. (1995): The genetic engineering of microbial solvent production. In: *Trends in Biotechnology* 13 (7), S. 259–264. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)88960-X.
- Yan, Shoubao; Dong, Dong (2018): Improvement of caproic acid production in a *Clostridium kluyveri* H068 and *Methanogen* 166 co-culture fermentation system. In: *AMB Express* 8 (1), S. 175. DOI: 10.1186/s13568-018-0705-1.
- Yin, Yanan; Zhang, Yifeng; Karakashev, Dimitar Borisov; Wang, Jianlong; Angelidaki, Iirini (2017): Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. In: *Bioresource Technology* 241, S. 638–644. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.184.

- Yu, Jiangnan; Huang, Zhenxing; Wu, Peng; Zhao, Mingxing; Miao, Hengfeng; Liu, Chunmei; Ruan, Wenquan (2019): Performance and microbial characterization of two-stage caproate fermentation from fruit and vegetable waste via anaerobic microbial consortia. In: *Bioresource Technology* 284, S. 398–405. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.124.
- Zhang, Jie; Taylor, Steven; Wang, Yi (2016): Effects of end products on fermentation profiles in *Clostridium carboxidivorans* P7 for syngas fermentation. In: *Bioresource Technology* 218, S. 1055–1063. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.071.
- Zlokarnik, Marko (1999): Rührtechnik. Theorie und Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Chemische Technik/Verfahrenstechnik).
- Zou, Wei; Ye, Guangbin; Zhang, Jing; Zhao, Changqing; Zhao, Xingxiu; Zhang, Kaizheng (2018): Genome-scale metabolic reconstruction and analysis for *Clostridium kluyveri*. In: *Genome* 61 (8), S. 605–613. DOI: 10.1139/gen-2017-0177.

## 10. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Acetyl-P	Acetyl-Phosphat
ACK	Acetatkinase
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADHE	Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenasen
ADHE2	Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AOR	Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase
ATP	Adenosintriphosphat
AWB	Anaerobwerkbank
BTM	Biotrockenmasse
BUK	Butyratkinase
ButOH	Butanol
Cat3	Butyryl/Caproyl-CoA:Acetyl-CoA-Transferase
<i>C. carboxidivorans</i>	<i>Clostridium carboxidivorans</i>
<i>C. kluyveri</i>	<i>Clostridium kluyveri</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C2-Produkt	Produkt mit 2 Kohlenstoffatomen (Acetat, Ethanol)
C4-Produkt	Produkt mit 4 Kohlenstoffatomen (Butyrat, Butanol)
C6-Produkt	Produkt mit 6 Kohlenstoffatomen (Hexanoat, Hexanol)
CoFeS-P	Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
e <sup>-</sup>	Elektron
EtOH	Ethanol
FC	Flow Cytometry, Durchflusszytometer
Fd <sub>red</sub>	reduziertes Ferredoxin
Fd <sub>ox</sub>	oxidiertes Ferredoxin
FISH	Floureszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Formyl-THF	Formyl-Tetrahydrofolat
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
GC	Gaschromatographie
[H]	Reduktionsäquivalent

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
HCl	Hydrogenchlorid
HEPA-Filter	Hocheffiziente Partikelfilter (engl.: <i>High Efficiency Particulate Air</i> )
HexOH	Hexanol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MES-Puffer	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFC	Massendurchflussregler
MFM	Massendurchflussmesser
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
N <sub>2</sub>	Stickstoff
OD	Optische Dichte
P <sub>i</sub>	Monophosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung (lat. <i>pondus hydrogenii</i> )
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
PPG	Polypropylenglykol
POR	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
PTA	Phosphotransacetylase
PTF	Phosphotransferase
RI	Brechungsindex
Rnf	Ferredoxin:NAD <sup>+</sup> Oxidoreduktase
rpm	Rührerdrehzahl (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
S	Schwefel
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
THF	Tetrahydrofolat
THL	Acetoacetyl-CoA Thiolase
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vvm	Volume gas per volume liquid per minute, Gasvolumenstrom bezogen auf das Arbeitsvolumen pro Minute
μ-GC	Mikro-Gaschromatographie

---

Symbol	Beschreibung	Einheit
A	Phasengrenzfläche gas-flüssig	m <sup>2</sup>
a	volumenbezogene Phasengrenzfläche	m <sup>-1</sup>
b	Schichtdicke der fluiden Phase	m
c <sub>i</sub>	Konzentration der Komponente i	g L <sup>-1</sup>
c <sub>g</sub>	Gelöstkonzentration i. d. Kernströmung d. Flüssigkeit	mol L <sup>-1</sup>
c <sub>g</sub> <sup>*</sup>	Sättigungskonzentration in der Flüssigphase	mol L <sup>-1</sup>
c <sub>i</sub>	Konzentration der Komponente i	g L <sup>-1</sup>
c <sub>i,max</sub>	Maximale Konzentration der Komponente i	g L <sup>-1</sup>
COTR	CO-Transferrate, (engl. carbon monoxide transfer rate)	mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
c <sub>x,0</sub>	initiale Biotrockenmassekonzentration	g L <sup>-1</sup>
c <sub>x</sub>	Biotrockenmassekonzentration	g L <sup>-1</sup>
d	Rührerdurchmesser	m
D	Verdünnungsrate (Durchflussrate),	h <sup>-1</sup>
E <sub>λ</sub>	Extinktion des Fluids bei der Wellenlänge λ	-
E(t)	Verweilzeitverteilung	-
F(t)	Verweilzeitsummenfunktion	-
F <sub>Gas</sub>	Gasvolumenstrom	vvm
F <sub>ein</sub> , F <sub>aus</sub>	Zulaufvolumenstrom und Ablaufvolumenstrom	L h <sup>-1</sup>
f <sub>x</sub>	Stammspezifischer Korrelationsfaktor	g L <sup>-1</sup>
G <sub>f,i</sub>	Gaskonversionsfaktor des Gases i	-
ΔG <sup>0</sup>	Freie Standardenthalpie	kJ mol <sup>-1</sup>
He <sub>i</sub>	Henry'scher Verteilungskoeffizient der Komponente i	mol L <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup>
HTR	H <sub>2</sub> -Transferrate, (engl. hydrogen transfer rate)	mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
I <sub>0</sub>	Intensität des eingestrahnten Lichts	W m <sup>-2</sup>
I	Intensität des transmittierten Lichts	W m <sup>-2</sup>
K	Anzahl gleichgroßer Kessel	-
K <sub>i</sub>	Inhibierungskonstante	g L <sup>-1</sup>
k <sub>L</sub>	flüssigseitiger Stoffübergangskoeffizient	m h <sup>-1</sup>
K <sub>S</sub>	Sättigungskonstante	g L <sup>-1</sup>
MGK	Mischgaskonversionsfaktor	-
MTR	Mengentransferrate, (engl. mass transfer rate)	mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
N	Rührerdrehzahl	s <sup>-1</sup>
Ne	Newtonsche Leistungskennzahl	-
n <sub>i</sub>	Stoffmenge der Komponente i	mol
P	Eingetragene mechanische Leistung	W
p	Gesamtdruck	bar

<b>Symbol</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Einheit</b>
$p_i$	Partialdruck der Gaskomponente i	bar
$q_i$	biomassespezifische Rate der Komponente i	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$r_i$	volumetrische Rate der Komponente i	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
R	universelle Gaskonstante: 8,314	$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
T	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$
t	Prozesszeit	h
V	Volumen	L
$V_R$	Reaktionsvolumen	L
$\dot{V}_i$	Volumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
X	Molanteil des Gases i	$\text{mol mol}^{-1}$
$Y_{i,j}$	Ausbeutekoeffizient von i pro j,	$\text{g g}^{-1}$
$y_i$	Gasanteil der Komponente i am Gesamtvolumenstrom	-
$\varepsilon_\lambda$	Dekadischer Extinktionskoeffizient	$\text{L mol}^{-1} \text{m}^{-1}$
$\kappa$	Nummer der insgesamt K Kessel	-
$\lambda$	Wellenlänge des eingestrahnten Lichts	Nm
$\mu$	Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{\max}$	Maximale Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$\rho$	Dichte	$\text{kg m}^{-3}$
$\tau$	Mittlere hydraulische Verweilzeit	h

## 11. Anhang

### 11.1. Vitamine, Spurenelemente und Medien

**Tabelle A. 1** Zusammensetzung der Vitaminlösung (100x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
Pyridoxin-HCl	12,0	mg L <sup>-1</sup>
Thiamin-HCl	6,00	mg L <sup>-1</sup>
Riboflavin	5,00	mg L <sup>-1</sup>
D-Ca-Pantothenat	5,00	mg L <sup>-1</sup>
Liponsäure	5,00	mg L <sup>-1</sup>
p-Aminobenzoesäure	5,00	mg L <sup>-1</sup>
Nicotininsäure	5,00	mg L <sup>-1</sup>
Vitamin B12	5,00	mg L <sup>-1</sup>
D-Biotin	2,00	mg L <sup>-1</sup>
Folsäure	2,00	mg L <sup>-1</sup>
MESNA (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium)	23,0	mg L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 2** Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100x) für das Hurst Medium

Komponente	Konzentration	Einheit
Nitrilotriessigsäure	2,00	g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,12	g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,10	g L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,37	g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,36	g L <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	25,0	mg L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	37,0	mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	23,0	mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	20,0	mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	22,0	mg L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 3** Zusammensetzung der Mineralienlösung (33,3x).

Komponente	Konzentration	Einheit
NH <sub>4</sub> Cl	100	g L <sup>-1</sup>
NaCl	80	g L <sup>-1</sup>
KCl	10	g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 4** Zusammensetzung der L-Cystein-HCl Stammlösung (100x).

Komponente	Konzentration	Einheit
L-Cystein-HCl	50	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 5** Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Komponente	Konzentration	Einheit
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44	g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20	g L <sup>-1</sup>
KCl	0,20	g L <sup>-1</sup>
NaCl	8,00	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 6** Zusammensetzung der Glucose-Stammlösung (50x).

Komponente	Konzentration	Einheit
Glucose · H <sub>2</sub> O	250	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 7** Zusammensetzung der Magnesiumlösung (16,65x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20,47	g L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 8** Zusammensetzung der Calciumlösung (16,65x) für das Hurst-Medium.

Komponente	Konzentration	Einheit
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,65	g L <sup>-1</sup>



**Tabelle A. 9** Zusammensetzung der Lysozymlösung zur Permeabilisierung der Zellmembran im Rahmen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Komponente	Konzentration	Einheit
Lysozym	10	g L <sup>-1</sup>
Tris-Hydrochlorid	50	mL L <sup>-1</sup>
1 x PBS	950	mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 10** Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für die *in solution* Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Komponente	Konzentration	Einheit
Natriumchlorid	180	mL L <sup>-1</sup>
Tris-Hydrochlorid	20	mL L <sup>-1</sup>
VE-Wasser	500	mL L <sup>-1</sup>
Formamid	300	mL L <sup>-1</sup>
SDS	1	mL L <sup>-1</sup>
Sondenlösung 1 (50 ng/μL)	10	mL L <sup>-1</sup>
Sondenlösung 2 (50 ng/μL)	10	mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 11** Aminosäuresequenz, sowie Molekulares Gewicht (MW) und T<sub>m</sub> der verwendeten Fluoreszenz-Sonden (Eurofins Genomics) für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung gekoppelt mit Durchflusszytometrie (Schneider et al., 2021). Die Sonden wurden am 5'-Ende mit einem Fluorophor (FITC oder Cy5) versehen.

Name	Sequenz (5' → 3')	MW, g mol <sup>-1</sup>	T <sub>m</sub> , °C
ClosKluy_1516	GCGGACTCCCCTTCAAAG	6086	58,2
ClosCarb_1516	AGCCACTCCCCATCACAC	5901	58,2

**Tabelle A. 12** Zusammensetzung des Waschpuffers für die *in solution* Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Komponente	Konzentration	Einheit
Natriumchlorid	20,4	mL L <sup>-1</sup>
Tris-Hydrochlorid	20	mL L <sup>-1</sup>
VE-Wasser	948,6	mL L <sup>-1</sup>
EDTA	10	mL L <sup>-1</sup>
SDS	1	mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle A. 13** Elutionszeiten der mittels HPLC untersuchten Produkte. Flussrate 0,6 mL min<sup>-1</sup>; Säulenofentemperatur 60 °C; Laufzeit 45 min; Injektionsvolumen 10 µL.

Produkte	Summenformel	Elutionszeiten, min
Formiat	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13,8
Acetat	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	15
Butyrat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	21,2
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	22,2
Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	38,1
Hexanoat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	41,5

**Tabelle A. 14** Elutionszeiten der mittels GC untersuchten Produkte 1-Hexanol, 1-Octanol und Octanoat.

Produkte	Summenformel	Elutionszeiten, min
1-Pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	4,0
1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	5,6
1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	9,1
Octanoat	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	17,5

## 11.2. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle A. 15** Verwendete Chemikalien, deren Summenformel, Bezugsquelle und CAS-Nummern.

Chemikalien	Summenformel	Händler	CAS-Nr.
1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	Merck	8.04393.2500
1-Pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	Sigma-Aldrich	398268
2-Mercaptoethan-sulfonat-Natrium (MESNA)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Merck KGaA	810595
5'-Cyanine5 (5'-Cy5)	-	Eurofins Genomics	-
5'-Fluorescein-5 isothiocyanate (5'-FITC)	-	Eurofins Genomics	-
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Carl Roth GmbH	5470.2
Ammoniumeisen-(II)sulfat-Hexahydrat	NH <sub>4</sub> FeSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA	103792
1-Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	Carl Roth GmbH	7724.1
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA	102382
Calcium-D(+)-Pantothenat	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	Carl Roth GmbH	3812.1
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH	7095.1
D(+)-Biotin	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	Carl Roth GmbH	3822.2
D(+)-Glucose-Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH	6887.5
Di-Natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA	106586
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Carl Roth GmbH	9065.2
Ethylacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Honeywell	607-022-00-5
Ethylendiamintetra-acetat (EDTA)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	PanReacAppli-Chem	141026.1211
Folsäure	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	Carl Roth GmbH	T912.1
Formamid	CH <sub>3</sub> NO	Carl Roth GmbH	6749.1

<b>Chemikalien</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Hexan	$C_6H_{14}$	Sigma-Aldrich	471402
Hexansäure	$C_6H_{11}O_2$	Carl Roth GmbH	8799.1
1-Hexanol	$C_6H_{13}OH$	Carl Roth GmbH	3847.1
Kaliumacetat	$C_2H_3KO_2$	Carl Roth GmbH	T874.3
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH	6781.2
Kaliumdihydrogenphosphat	$KH_2PO_4$	Carl Roth GmbH	3904.1
Kaliumdihydrogenphosphat	$KH_2PO_4$	Carl Roth GmbH	3904.1
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	Merck KGaA	102733
L-Cystein-Hydrochlorid	$C_3H_7NO_2 \cdot HCl$	Carl Roth GmbH	3468.1
Liponsäure	$C_8H_{14}O_2$	Carl Roth GmbH	6229.1
Lysozym	-	Sigma-Aldrich	62971-50G-F
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth GmbH	T888.3
Mangan(II)sulfat-Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	Merck KGaA	105941
Natriumbutyrat	$C_4H_7O_2Na$	Carl Roth GmbH	1441.2
Natriumchlorid	NaCl	Labochem International	LC-5932.3
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Carl Roth GmbH	151-21-3
Natriumformiat	$CHNaO_2$	Sigma-Aldrich	715391
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Carl Roth GmbH	6885.3
Natriummolybdat-Dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck KGaA	106521
Natriumselenat	$Na_2SeO_4$	Sigma-Aldrich	S8295-10G
Natriumwolframat-Dihydrat	$Na_2WO_4 \cdot 2 H_2O$	Sigma-Aldrich	1324421
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck KGaA	106717

<b>Chemikalien</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Nicotinsäure	$C_6H_5NO_2$	Merck KGaA	818714
Nitrilotriessigsäure	$C_8H_9NO_6$	Merck KGaA	108416
1-Octanol	$C_8H_{18}O$	Carl Roth GmbH	111-87-5
Octansäure	$C_8H_{16}O_2$	Sigma	C2875
p-Aminobenzoesäure	$C_7H_7NO_2$	Merck KGaA	822312
Polypropylenglycol (PPG)	$(C_3H_6O)_n$	Sigma-Aldrich	202339
Pyridoxin-Hydrochlorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Carl Roth GmbH	T914.2
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	R4500
Schwefelsäure	$H_2SO_4$	Merck	1.00731.2511
Thiamin-Hydrochlorid	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	Sigma-Aldrich	T4625
Tris-Hydrochlorid	$NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$	PanReacAppli-Chem	A1087
Vitamin B12	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Carl Roth GmbH	T915.1
Zinksulfat-Heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck KGaA	108883
Natriumsulfid Nonahydrat	$Na_2S \cdot 9 H_2O$	Thermo Scientific	1313-84-4

**Tabelle A. 16** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Materialien

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifugen-Röhrchen	Cellstar Tubes 15/ 50 mL	Greiner Bio-one GmbH
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Pipettenspitzen	200 µL, 1000 µL, 10 mL	Gilson Inc./ Brand GmbH + Co.KG
Eppendorfgefäße	Safe-lock 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf AG
Rollrandflasche	Vial N11, 11,6 x 32,0 mm, 1,5 mL (inkl. Alukappen)	Macherey-Nagel GmbH + Co.KG
Gewindeflasche	Vial N9, 11,6 x 32,0 mm, 1,5 mL (inkl. Schraubkappen)	Macherey-Nagel GmbH + Co.KG
Sterilfilter	stedim Minisort 0,2 µm	Sartorius AG
Sterilfilter-VE-H <sub>2</sub> O	Steritop-Filter 0,22 µm	Merck-Millipore KGaA
Küvetten	Q-VETTES, halbmikro, PS	ratiolab GmbH
Hungate Kulturröhrchen	16x125 mm (inkl. Butylstop-fen und Schraubdeckel)	Dunn Labortechnik GmbH
Kapillarkolben	CP1000	Gilson Inc.
Mikro-Einsatz	N9/N10/N11 (6,0 x 31,0 mm, 0,2 mL, konisch)	Macherey-Nagel GmbH + Co.KG
Einweg-Spritzen	1, 5, 10 mL	B.Braun SE
Einweg-Kanülen	0,6 x 30 mm, 0,9 x 70 mm, 0,8 x 121 mm	B. Braun SE

**Tabelle A. 17** Liste der verwendeten Gase

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Einheit</b>	
Kohlenstoffmonoxid	99,995	CO	Air Liquide
Kohlenstoffdioxid	99,970	CO <sub>2</sub>	Air Liquide
Stickstoff	99,999	N <sub>2</sub>	Air Liquide
Helium	99,999	He	Air Liquide
Wasserstoff	99,999	H <sub>2</sub>	Air Liquide

**Tabelle A. 18** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Anaerobwerkbank	MB-Labstar ECO	M. Braun Inertgassysteme GmbH
Analysenwaage	Explorer E121245 (0,1 mg - 210 g)	Ohaus Corporation
Analysenwaage	Explorer E1N213 (5 g - 32 kg)	Ohaus Corporation
Autoklav	Systec VX-150	Systec
AWB-Feuchtesensor	MB-MO-SE1-PLC 0-500 ppm)	M. Braun Inertgassysteme GmbH
AWB-HEPA Filter	H13 mit 1 kg Aktivkohle, inline, Artikel 9004451	M. Braun Inertgassysteme GmbH
AWB-O <sub>2</sub> -EC-Sensor	Elektrochemischer Sensor (0-1000 ppm)	M. Braun Inertgassysteme GmbH
FACS	BD FACS Melody Cell Sorter	BD Biosciences
Falcon Tube-Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen
Gaschromatograph	GC-2010 Plus	Shimadzu Corp.
Gasdetektor	ToxiRAE 3 CO 2000	RAE Systems Germany GmbH
Gasmischstation	WMR 4000	Westphal Mess-Regeltechnik
Gasreinigungssystem	Kupferkatalysator + Molsieb	M. Braun Inertgassysteme GmbH
GC-Auto-Injektor	AOC-20i	Shimadzu Corp.
GC-Autosampler	AOC-20s	Shimadzu Corp.
GC-Kapillarsäule	FameWax (30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm)	Restek GmbH
Analysenwaage	Explorer E121245 (0,1 mg - 210 g)	Ohaus Corporation
Analysenwaage	Explorer E1N213 (5 g - 32 kg)	Ohaus Corporation
Autoklav	Systec VX-150	Systec
AWB-Feuchtesensor	MB-MO-SE1-PLC (0-500 ppm)	M. Braun Inertgassysteme GmbH
AWB-HEPA Filter	H13 mit 1 kg Aktivkohle, inline, Artikel 9004451	M. Braun Inertgassysteme GmbH
AWB-O <sub>2</sub> -EC-Sensor	Elektrochemischer Sensor (0-1000 ppm)	M. Braun Inertgassysteme GmbH

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
FACS	BD FACS Melody Cell Sorter	BD Biosciences
Falcon Tube-Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen
Heizmantel	WiseThermheatingmantle WHM 1201211512015	Witeg Labortechnik GmbH
HPLC-Autosampller	HPLC-Autosampller Plus	Finnigan Surveyor ThermoFischer Scientific
HPLC-Detektor	HPLC-RI-Detektor	Finnigan Surveyor ThermoFischer Scientific
HPLC-Manager	Smartline 5000	Finnigan Surveyor ThermoFischer Scientific
HPLC-Pumpe	HPLC-LC Pumpe Plus	Finnigan Surveyor ThermoFischer Scientific
HPLC-Trennsäule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad
HPLC-Vorsäule	Micro-Guad Cation Cartridge	Bio-Rad
Kleinlaborfermenter	KLF 3000; 3,7 L	Bioengineering AG
Kleinlaborfermenter	Labfors 1	Infors HT
Magnetrührer	D-6010	neoLab Migge GmbH
Massendurchflussmesser	EL-FLOW	Bronkhorst HIGH-TECH
$\mu$ -GC	490 Micro GC Dual	Agilent Technologies
Mikro-GC-Trennsäule	1m Cox HI-Säule	AgilentTechnologies
Mobiles pH-Meter	PCE-PHD2	PCE Group
Peristaltikpumpe (Base/Säure)	Peripex W1	WatsonMarlow
Peristaltikpumpe (Medium)	MSC-WM5	Chemap AG
pH-Elektrode	405-DPAS-SC- K85/120121	Mettler-Toledo
Photometer	Spectronic Genesys UV-Vis	ThermoFischer Scientific
Direktverdrängerpipette	microman M 1000	Gilson Inc.
Pipetten	20 - 200 $\mu$ L, 100 - 1000 $\mu$ L und 1 - 10 mL	Brand GmbH + Co.KG
Säulenofen	Jet Stream (5-85 °C)	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH
Schnellkochtopf	IKP1	Ambiano



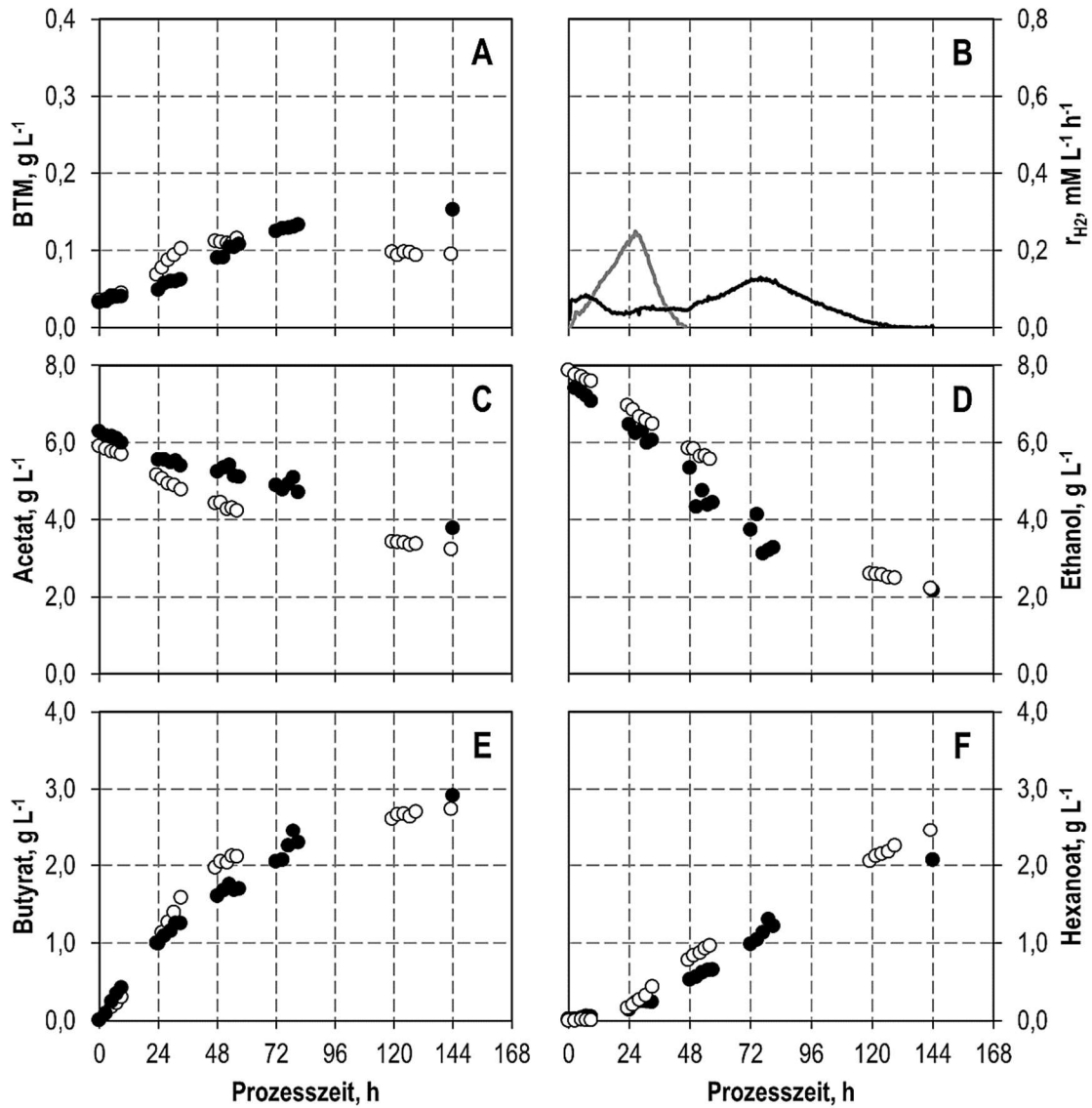
<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Schüttelinkubator	WiseCube WIS-20R	Witeg Labortechnik GmbH
Anaerobflaschen	250 mL, 500 mL, 1000 mL und 2000 mL (mit Lochkappen und Butylgummisepten für GL 45)	Duran Group GmbH
Schwingmühle	MM200	RETSCH GmbH
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich GmbH
Trockenblock-Inkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich GmbH
Umlaufkühler	F250	JULABO GmbH
Vakuumpumpe	Drehschieberpumpe	M. Braun Inertgassysteme GmbH
Vortexer	VM-300	NeoLab
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.
GC-Flammenionisationsdetektor	FID-2010 Plus	Shimadzu Corp.

**Tabelle 11-1** Liste der verwendeten Softwares

<b>Software</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
FACS	BD FACSCorus	BD Biosciences
GC	LabSolutions	Shimadzu Corp.
HPLC	Agilent EZChrom Elite	Agilent Technologies
MFM	Flow Plot V 3.28	Bronkhorst
μ-GC	Open Lab CDS EZ Chrom	Agilent Technologies
Reaktorsteuerung KLF	BIOSCADA lab	Bioengineering

## 11.3. Weiterführende Ergebnisse

### 11.3.1. Kontinuierliche Schwefelbereitstellung mit *C. kluyveri*



**Abbildung 11-1** Satzprozesse von *C. kluyveri* mit 8 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 6 g L<sup>-1</sup> Acetat im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor ohne Schwefelzufuhr (weiße Punkte, graue Linie) und mit einer kontinuierlichen Schwefelzufuhr mit 0,05 mM L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (schwarze Punkte, schwarze Linie). (T = 37°C; pH 6,0; P V<sup>-1</sup> = 10.5 W L<sup>-1</sup>, F<sub>gas</sub> = 0.042 vvm (10:70:20 CO:N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>)).