

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Engineering and Design

## **Autotrophe Umsetzung von biogenem Synthesegas mit *Clostridium carboxidivorans* und *Clostridium autoethano-* *genum***

Anton Hans Rückel

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff

Prüfer\*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz

2. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 08.11.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 27.01.2023 angenommen



# Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TUM, School of Engineering and Design) der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Zu dieser Arbeit haben verschiedene Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich im Folgenden bedanken möchte.

Der erste Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Weuster-Botz für die Möglichkeit dieses spannende und anspruchsvolle Thema an seinem Lehrstuhl bearbeiten zu dürfen. Hierbei bedanke ich mich insbesondere für das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die mir gewährten Freiräume bei der Bearbeitung aber auch für die vielen fachlichen Anregungen und kritischen Diskussionen.

Bei dem Co-Referenten Prof. Dr. Wolfgang Liebl und dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff möchte ich mich für die Übernahme der jeweiligen Ämter bedanken.

Den Projektpartnern des Verbundprojektes „ReGasFerm“ danke ich für die Zusammenarbeit im Projekt und den fachlichen Austausch und die vielen konstruktiven Diskussionen. Im Einzelnen bedanke ich mich bei M.Sc. Luis Oliveira (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TUM) sowie Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff, Dr.-Ing. Sebastian Fendt, M.Sc. Philipp Johne und M.Sc. Philipp Leuter (Lehrstuhl für Energiesysteme, TUM).

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung des Verbundvorhabens „ReGasFerm“ (Förderkennzeichen 031B0677A).

Außerdem bedanke ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik sowie der angrenzenden Gruppen für die konstruktive Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt dabei Karl Behler, Daniel Bischoff, Christian Burger, Kathrin Doll, Ljubomir Grozdev, Johannes Hermann, Manh Dat Hoang, Emil Korzin, Franziska Kratzl, Hannes Löwe, Christoph Mähler, Alexander Mayer, Anne Oppelt, Christina Perschel, Ingmar Polte, Sarah Poschenrieder, Dominik Schäfer, Kristin Schoppel, Irina Schwarz, Timm Severin, Julia Tröndle, Jacqueline Wagner, Sabine Wagner und Lara Wolf.

Den festangestellten ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Ellen Truxius, Marlene Schocher, Patrick Meins und Markus Amann danke ich für die Unterstützung bei organisatorischen Aufgaben. Bei Georg Kojro, Nelson Vogel und Norbert Werth bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei verschiedenen elektrischen und mechanischen Werkstattarbeiten.

Bei meinen ehemaligen Studentinnen und Studenten Sabrina Antholzner, Miriam Bäumler, Rafaela Bublitz, Alexander Fuchs, Jens Hannemann, Andreas Hoffmann, Carolin Maierhofer,

Laura Menk, Martin Moschref, Lukas Niedermeier, Lisa Nordgauer, Anne Oppelt, Irina Schwarz, Lennart Überheim und Felix Wende bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei verschiedenen Arbeiten im Labor.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für ihre zu jeder Zeit vollste Unterstützung. Meiner Partnerin Corinna danke ich ganz besonders für ihre Geduld und Unterstützung während der gesamten Zeit.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>8</b>
3.1. Acetogene Mikroorganismen .....	8
3.1.1. Reduktiver Acetyl-CoA-Stoffwechsel.....	8
3.1.2. Energiekonservierung in acetogenen Clostridien .....	11
3.1.3. <i>Clostridium carboxidivorans</i> .....	13
3.1.4. <i>Clostridium autoethanogenum</i> .....	17
3.2. Synthesegas.....	20
3.2.1. Herkunft, Nutzung und Zusammensetzung von Synthesegas.....	20
3.2.2. Spurenverunreinigungen in Synthesegasen.....	24
3.2.3. Gas-Flüssig-Stofftransport .....	29
3.3. Bioprozesstechnische Grundlagen .....	33
3.3.1. Formalkinetische Ansätze zur Beschreibung von Wachstum und Produktbildung.....	34
3.3.2. Bilanzierung von Satzprozessen in Rührkesselreaktoren.....	36
3.3.3. Bilanzierung kontinuierlicher Prozesse in Rührkesselreaktoren .....	38
<b>4. Materialien und Methoden .....</b>	<b>41</b>
4.1. Anaerobes Arbeiten.....	41
4.2. Herstellung anaerober Medien.....	41
4.3. Kryo-Stammhaltung.....	43
4.4. Kultivierungen in geschüttelten Anaerobflaschen.....	43
4.4.1. Heterotrophe Vorkulturen.....	44
4.4.2. Autotrophe Kulturen in geschüttelten Anaerobflaschen.....	44
4.5. Gasfermentationsprozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab .....	45
4.5.1. Satzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor.....	45
4.5.2. Kontinuierliche Chemostatprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor.....	49
4.5.3. Kontinuierliche Prozesse im Rührkesselreaktor als Membranbioreaktor zur Zellrückhaltung .....	51
4.6. Bereitstellung definierter Konzentrationen von Spurenverunreinigungen .....	54
4.7. Chemisch-Katalytische Sauerstoffreduktion im kontinuierlichen Rohrreaktor .....	55

4.8.	Analytische Methoden .....	57
4.8.1.	Bestimmung von Biomassekonzentrationen.....	57
4.8.2.	Produktquantifizierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	57
4.8.3.	Quantifizierung von Gasaufnahmeraten mittels Mikrogaschromatographie ( $\mu$ GC).....	59
4.8.4.	Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsraten .....	62
<b>5.</b>	<b>Inhibierungsstudien und Realgasfermentationen mit <i>Clostridium carboxidivorans</i></b> .....	<b>64</b>
5.1.	Inhibierungsstudien mit <i>Clostridium carboxidivorans</i> im Satzverfahren <sup>1</sup> .....	64
5.1.1.	Referenzsatzprozess mit <i>C. carboxidivorans</i> .....	64
5.1.2.	Ammoniak als Spurenverunreinigung .....	67
5.1.3.	Schwefelwasserstoff als Spurenverunreinigung .....	72
5.1.4.	Nitrat als Spurenverunreinigung.....	78
5.1.5.	Nitrit als Spurenverunreinigung.....	84
5.1.6.	Kombinationen von Spurenverunreinigungen.....	87
5.2.	Satzprozesse mit <i>Clostridium carboxidivorans</i> mit biogenem Synthesegas <sup>2</sup> ...	95
<b>6.</b>	<b>Inhibierungsstudien und Realgasumsetzungen mit <i>Clostridium autoethanogenum</i></b> .....	<b>106</b>
6.1.	Inhibierungsstudien mit <i>Clostridium autoethanogenum</i> im Satzverfahren <sup>3</sup> ....	106
6.1.1.	Referenzsatzprozesse mit <i>C. autoethanogenum</i> .....	106
6.1.2.	Ammoniak als Spurenverunreinigung .....	116
6.1.3.	Schwefelwasserstoff als Spurenverunreinigung .....	121
6.1.4.	Nitrat als Spurenverunreinigung.....	125
6.1.5.	Nitrit als Spurenverunreinigung.....	130
6.1.6.	Kombinationen von Spurenverunreinigungen.....	132
6.2.	Vergleich der autotrophen Alkoholproduktion von <i>C. carboxidivorans</i> und <i>C. autoethanogenum</i> .....	138
6.3.	Satzprozess mit <i>Clostridium autoethanogenum</i> mit biogenem Synthesegas <sup>4</sup> .....	145
6.4.	Kontinuierliche Prozesse mit <i>Clostridium autoethanogenum</i> .....	151
6.4.1.	Kontinuierliche Prozesse ohne Zellrückhaltung (Chemostat) .....	151
6.4.2.	Erhöhung der Durchflussrate .....	154
6.4.3.	Kontinuierliche Prozesse im Membranbioreaktor .....	160
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>169</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>176</b>

---

<b>9. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....</b>	<b>189</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>195</b>
10.1. Inhibierungsstudien mit <i>C. carboxidivorans</i> mit Zugabe von 2,0 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S mit Prozesszeit bis 244 h.....	195
10.2. Verwendete Medien und Vorratslösungen .....	199
10.3. Verwendete Chemikalien und Materialien.....	201
10.4. Verwendete Geräte und Software.....	205



## 1. Einleitung

Die Endlichkeit fossiler Rohstoffe sowie der kritische Beitrag des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes zum Klimawandel führen zu einer steigenden Nachfrage nach Produktionsverfahren für Kraftstoffe und Plattformchemikalien aus erneuerbaren Quellen. Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Prozesse kann die Biotechnologie leisten. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung erklärt in seiner aktuellen Analyse zu Bioökonomie in Deutschland, dass der biotechnologischen Produktion von Kraftstoffen wie Ethanol aus verschiedenen Abfallstoffen wie industriellen Abgasen oder biogenen Reststoffen eine bedeutende Rolle zukommen wird (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2022).

Solche Reststoffe wie Stroh, Holzspäne, Laub und Grünschnitt fallen jährlich in Deutschland im Tonnenmaßstab an und werden meist nur thermisch verwertet. Einen Ansatz zur Nutzung dieser biogenen Reststoffe stellt die Vergasung der Biomasse zu so genannten Synthesegasen, die hauptsächlich aus den Komponenten CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> bestehen, dar (Kremling et al. 2017). Auch industrielle Abgase wie beispielsweise Stahlwerksabgase können solche Synthesegase liefern.

Diese Synthesegase können im Anschluss als Substrat für die Synthesegasfermentation dienen. Dieser biotechnologische Prozess nutzt anaerobe Mikroorganismen, die in der Lage sind Mischungen von CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als alleinige Kohlenstoff, Elektronen- und Energiequelle zu nutzen und daraus industriell relevante Produkte wie Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol und 2,3-Butandiol zu synthetisieren (Bengelsdorf et al. 2018).

Verschiedene Mikroorganismen haben ein hohes Potential gezeigt, in solchen Synthesegasfermentationsprozessen Einsatz zu finden. Zwei der vielversprechendsten Mikroorganismen sind die Clostridien *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Beide Mikroorganismen verfügen über eine hohe Toleranz gegenüber hohen CO-Gehalten mit einem breiten Optimum sowie die Fähigkeit hohe Alkoholkonzentrationen bei geringer Akkumulation des Nebenproduktes Acetat zu produzieren (Abubackar et al. 2015a; Doll et al. 2018). Während *C. carboxidivorans* sich insbesondere durch die Produktion der längerkettigen Alkohole 1-Butanol und 1-Hexanol auszeichnet, kann *C. autoethanogenum* den zweiwertigen Alkohol 2,3-Butandiol produzieren.

Im Gegensatz zu anderen biotechnologischen Produktionsprozessen benötigt die Synthesegasfermentation keine Zucker als Substrat und steht somit nicht in Konflikt mit der Nahrungsmittelproduktion (Ajanovic 2011). Die Kopplung mit der Vergasung der biogenen Reststoffe stellt zudem eine Möglichkeit dar, auch schwer zugängliche Bestandteile der Biomasse wie beispielsweise Lignin vollständig umzusetzen.

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Die Synthesegasfermentation stellt eine vielversprechende Technologie zur Umsetzung CO-reicher Gase in Energieträger und Plattformchemikalien dar. In den letzten Jahren hat das Interesse in der Forschung daran stark zugenommen. Für die Synthesegasfermentation werden obligat anaerobe, chemolithoautotrophe Mikroorganismen eingesetzt, die den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg nutzen (Ljungdahl 1986; Wood 1986; Drake 1995). Dabei können diese so genannten acetogenen Mikroorganismen Kohlenstoffmonoxid (CO) oder Mischungen von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Diese werden zum zentralen Metabolit Acetyl-CoA umgesetzt. Die Hauptprodukte des Prozesses stellen dabei Essigsäure und Ethanol dar (Köpke et al. 2011a). Synthesegase sind Gase, die aus den Hauptkomponenten CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> bestehen. Diese können beispielsweise als Abgase von Stahlwerken oder bei der Vergasung biogener Reststoffe anfallen. Durch die Nutzung dieser Gase zur Produktion von Ethanol kann die Synthesegasfermentation zur Produktion von Biokraftstoffen ohne Konkurrenz zur Nahrungsmittelindustrie beitragen (Ajano vic 2011).

Verschiedene acetogene Mikroorganismen haben ein besonders hohes Potential für diese Prozesse gezeigt. *C. carboxidivorans* zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus neben Essigsäure und Ethanol durch Kettenverlängerung aus mehreren Molekülen Acetyl-CoA längerkettige Säuren (Buttersäure, Hexansäure) und Alkohole (1-Butanol, 1-Hexanol) zu produzieren (Fernández-Naveira et al. 2017). Dabei findet die Bildung von Säuren und Alkoholen in verschiedenen Prozessphasen statt, welche neben anderen Einflussfaktoren wie der Temperatur (Shen et al. 2017; Ramió-Pujol et al. 2015b) hauptsächlich durch den vorliegenden pH hervorgerufen werden (Ganigué et al. 2016; Doll et al. 2018). Bei höherem pH finden hauptsächlich Biomassewachstum und Säurebildung statt, weshalb diese Phase als Acidogenese bezeichnet wird. Dagegen findet bei niedrigerem pH hauptsächlich Alkoholproduktion in der so genannten Solventogenese statt (Ganigué et al. 2016; Ramió-Pujol et al. 2015a). Dabei können bereits gebildete Säuren von *C. carboxidivorans* in Alkohole umgesetzt werden. Daher ist in Satzprozessen ein unregelmäßiger pH förderlich für eine Kombination von schnellem Wachstum und hohem Alkohol-zu-Säure-Verhältnissen (Doll 2018).

*C. carboxidivorans* besitzt eine hohe Toleranz für hohe CO-Anteile in Synthesegasen mit einem breiten Optimum zwischen 40 % CO und 80 % CO (Doll 2018; Hurst und Lewis 2010; Abubackar et al. 2012). Die Umsetzung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> wird ebenfalls berichtet jedoch mit niedrigerer spezifischer Wachstumsrate im Vergleich zu CO (Liou et

al. 2005). Die gleichzeitige Verwertung von CO und CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> findet jedoch aufgrund der besseren mikrobiellen Energiegewinnung aus CO im Vergleich zu H<sub>2</sub> nicht statt (Hu et al. 2011). In kontinuierlichen Prozessen konnte bereits erfolgreich hohe Alkoholproduktion bei niedriger Essigsäureakkumulation in einer kontinuierlichen Rührkesselkaskade gezeigt werden (Abubackar et al. 2018; Doll et al. 2018). Dabei wurde in einem ersten Rührkesselreaktor bei pH 6,0 Biomasse und Säuren produziert und im zweiten Rührkesselreaktor bei pH 5,0 die Säuren in Alkohole umgesetzt (Doll et al. 2018). Das Genom von *C. carboxidivorans* ist vollständig sequenziert und die wichtigen Gene für die Alkoholbildung wurden identifiziert (Li et al. 2015; Bruant et al. 2010). Für genetische Veränderungen zur gesteigerten Alkoholproduktion konnte *C. carboxidivorans* bereits zugänglich gemacht werden (Cheng et al. 2019b; Cheng et al. 2019a).

*C. carboxidivorans* ist als acetogener Mikroorganismus durch die Produktion längerketziger Alkohole von großer technischer Bedeutung. Besonders das Produkt 1-Butanol ist aufgrund der höheren Energiedichte im Vergleich zu Ethanol für Kraftstoffe relevant (Dürre 2007; Harvey und Meylemans 2011). Die Fähigkeit von *C. carboxidivorans* gebildete Säuren wiederaufzunehmen und in Alkohole umzusetzen ermöglicht es, hohe Alkohol-zu-Säure-Verhältnisse zu erreichen (Doll et al. 2018). Diese sind für einen technischen Alkoholproduktionsprozess von großer Bedeutung (Liew et al. 2013).

Der acetogene Mikroorganismus *C. autoethanogenum* kann neben Essigsäure und Ethanol auch den mehrwertigen Alkohol 2,3-Butandiol produzieren (Köpke et al. 2011b). Eine ausgeprägte Aufteilung zwischen der Säure- und Alkoholbildung in zwei separate Phasen wird für *C. autoethanogenum* nicht berichtet. Bereits beim Wachstumsoptimum pH 6,0 (Abrini et al. 1994) ist *C. autoethanogenum* in der Lage, hohe Ethanolkonzentrationen zu produzieren (Guo et al. 2010; Abubackar et al. 2015a). Trotzdem kann durch Erniedrigen des pH im Prozess das Produktspektrum von *C. autoethanogenum* zur Alkoholproduktion verschoben werden (Abubackar et al. 2016; Abubackar et al. 2015a).

*C. autoethanogenum* besitzt ebenfalls eine hohe Toleranz für hohe CO-Anteile in Synthesegasen bis zu reinem CO als gasförmiges Substrat (Abrini et al. 1994; Liew et al. 2017; Guo et al. 2010). Eine gleichzeitige Verwertung von CO und CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> wurde jedoch nur bei niedrigen CO-Anteilen von 2 % CO berichtet (Heffernan et al. 2020). Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* wird für *C. autoethanogenum* jedoch eine effiziente Verwertung von CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> berichtet (Mock et al. 2015). *C. autoethanogenum* wurde ebenso wie das nahverwandte acetogene Bakterium *C. ljungdahlii* (Groher und Weuster-Botz 2016) bereits genetisch zugänglich gemacht und dadurch unter anderem eine gesteigerte Ethanolproduktion sowie die Bildung nichtnatürlicher Produkte (Aceton und 2-Propanol) ermöglicht (Liew et al. 2017; Liew et al. 2022).

Der acetogene Mikroorganismus *C. autoethanogenum* stellt einen bedeutenden Mikroorganismus für weitere wissenschaftliche Untersuchungen dar, da er in der Lage ist, hohe Alkoholkonzentrationen bei geringer Acetatakkumulation zu erreichen (Abubackar et al. 2015a). Hohe Alkoholkonzentrationen und Alkohol-zu-Säure-Verhältnisse sind dabei aufgrund der geringen Wertschöpfung des Prozesses von Bedeutung für einen effizienten Alkoholproduktionsprozess (Ezeji et al. 2004; Liew et al. 2013).

In den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen zur Synthesegasfermentation wurden als Synthesegas Mischungen von Reingasen verwendet. In technischen Synthesegasfermentationsprozessen sollten aufgrund der geringen Wertschöpfung des Prozesses jedoch Synthesegase aus Abgasen oder aus der Vergasung von Abfallstoffen eingesetzt werden (Liew et al. 2013). Synthesegase fallen im großen Maßstab als Abgase von Stahlwerken an. Sie können aber auch aus der Vergasung von biogenen Reststoffen wie Holzspänen, Laub und Grünschnitt gewonnen werden. Die Flugstromvergasung biogener Reststoffe bietet eine Möglichkeit, aus Abfallstoffen Synthesegase mit hohen CO-Anteilen zu gewinnen (Kremling et al. 2017). Neben den Hauptkomponenten CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> sind in diesen biogenen Synthesegasen auch Spurenverunreinigungen enthalten. Die Spurenverunreinigungen entstehen dabei als Abbauprodukte des in der Biomasse gebundenen Stickstoffs und Schwefels in Form von NH<sub>3</sub>, HCN, NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, COS und CS<sub>2</sub> (Spliethoff 2010; Kaltschmitt et al. 2016). Außerdem können auch Reste des Vergasungsmittels O<sub>2</sub> sowie unvollständig vergaste Kohlenstoffspezies wie Teere und kurzkettige Kohlenwasserstoffe in biogenem Synthesegas vorhanden sein (Datar et al. 2004; Kremling et al. 2017).

Die Einflüsse dieser Spurenverunreinigungen können von großer Bedeutung für Synthesegasfermentationsprozesse sein (Benevenuti et al. 2021). Sauerstoff ist für anaerobe acetogene Mikroorganismen problematisch, da es als Oxidationsmittel das Redoxpotential erhöht (Karnholz et al. 2002). Das Redoxpotential stellt wiederum einen bedeutenden Einflussfaktor für anaerobes Wachstum dar (Liu et al. 2013). Das Methylen-THF/Methyl-THF Redox-Paar ist das oxidationsempfindlichste Enzym des reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweges. Es weist mit zwischen -120 mV und -200 mV das höchste kritische Redoxpotential auf (Vanoni und Matthews 1984; Maden 2000; Müller et al. 2001; Schuchmann und Müller 2014; Thauer et al. 1977).

NH<sub>3</sub> kann von vielen Mikroorganismen als Stickstoffquelle genutzt werden. Bei hohen Konzentrationen kann es allerdings auch Hydrogenasen inhibieren (Xu und Lewis 2012). HCN ist stark zytotoxisch und verringert das Wachstum von *C. ljungdahlii* (Oswald et al. 2018). Stickoxide NO<sub>x</sub> treten in vielen verschiedenen Oxidationsstufen auf. Bei hohen Temperaturen wie sie in Vergasungsprozessen vorliegen, liegen immer Gleichgewichte

der Stickoxidspezies vor (Joshi et al. 1985). NO kann bereits ab 40 ppm Hydrogenasen reversibel hemmen (Ahmed et al. 2006). NO<sub>2</sub> kann Formiatdehydrogenasen und Nitratreduktasen inhibieren (Allais et al. 1983; Meakin et al. 2006). Die physikalischen Löslichkeiten der gasförmigen Stickoxide in wässrigem Medium sind sehr gering (Battino et al. 2011). In wässrigem Medium können sie jedoch zu den gut löslichen Komponenten Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) reagieren (Joshi et al. 1985). Nitrat stellt für verschiedene Mikroorganismen eine Stickstoffquelle dar. In *C. ljungdahlii* kann Nitrat auch als alternativer terminaler Elektronenakzeptor zu CO<sub>2</sub> verwendet werden, wobei die Umsetzung von Nitrat zu Ammonium eine thermodynamisch deutlich günstigere Reaktion zur Energiekonservierung darstellt (Emerson et al. 2019). Nitrit ist für die meisten Mikroorganismen toxisch. Das acetogene Bakterium *M. thermoacetica* kann Nitrit jedoch als terminalen Elektronenakzeptor nutzen (Seifritz et al. 2003). H<sub>2</sub>S kann L-Ascorbatoxidase und Thiosulfatsulfurtransferasen inhibieren (Itoh et al. 1995; Picton et al. 2002). COS ist ein kompetitiver Inhibitor der CO-Dehydrogenase in *R. rubrum* (Hyman et al. 1989). SO<sub>2</sub> kann Ascorbinsäureoxidase inhibieren (Stark et al. 1965). Teere in Synthesegasen haben eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *C. carboxidivorans* gezeigt und mussten für Gasfermentationsprozess aus dem Gasstrom filtriert werden (Datar et al. 2004; Ahmed et al. 2006). Die Nutzung von Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe wurde in der Literatur bisher selten dokumentiert. Meistens wurde dabei *C. ljungdahlii* als acetogener Mikroorganismus eingesetzt (Liakakou et al. 2021; Infantes et al. 2020). Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* zeigte dieser jedoch geringere Ethanolproduktion und stattdessen höhere Acetatakkumulation (Liakakou et al. 2021; Abubackar et al. 2015a; Doll et al. 2018). Da ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis für einen technischen Prozesse notwendig ist, stellen daher *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* technisch bedeutendere Mikroorganismen dar (Liew et al. 2013).

Die technische Etablierung von Synthesegasfermentationsprozessen im industriellen Maßstab wurde bereits von verschiedenen Firmen wie LanzaTech, INEOS und Coskata angestrebt (Bengelsdorf et al. 2013). LanzaTech betreibt bereits eine kommerzielle Ethanolproduktionsanlage an einem chinesischen Stahlwerk und plant die Produktion verschiedener weiterer Produkte (wie 2,3-Butandiol, Aceton und 2-Propanol) aus Gasfermentationsprozessen in weiteren Anlagen weltweit (Nesbitt 2020). Das Auftreten von Spurenverunreinigungen kann jedoch eine wichtige Herausforderung darstellen. In Synthesegasfermentationsprozessen in einer Pilotanlage von INEOS führten Spurenverunreinigungen im Synthesegas zum Scheitern des Produktionsprozesses, was hauptsächlich auf HCN zurückgeführt wurde (Liew et al. 2016).

Bisher ist für die meisten acetogenen Mikroorganismen wenig über die genauen Effekte der einzelnen Spurenverunreinigungen bekannt. Insbesondere fehlen meist detaillierte Untersuchungen zur Bestimmung von quantitativen Grenzwerten zur Toleranz gegenüber einzelnen Komponenten. Die beschriebenen Daten sind dabei meist mit verschiedenen Mikroorganismen bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen erhoben und daher schwierig zu vergleichen (Benevenuti et al. 2021). Zudem sind Untersuchungen häufig in geschüttelten Anaerobflaschen durchgeführt worden, die nicht die Bedingungen in einem technischen Bioreaktor wiedergeben (Oswald et al. 2018). Die Kenntnis der Effekte von Spurenverunreinigungen ist jedoch von großer Bedeutung für die mikrobielle Umsetzung von Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe. Das Scheitern der INEOS-Anlage unterstreicht die große technische Bedeutung der Kenntnisse inhibierender Spurenverunreinigungen. Daher sind umfangreiche Untersuchungen zum Einfluss der Spurenverunreinigungen notwendig. Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war daher die Untersuchung der Einflüsse definierter Konzentrationen der Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$ ) in vollständig kontrollierten Rührkesselreaktoren auf Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Somit können basierend auf den ermittelten tolerierbaren Konzentrationen der Verunreinigungen quantitative Gasreinigungskriterien für einen technischen Synthesegasreinigungsprozess abgeleitet werden. Die Validierung der gewonnenen Erkenntnisse kann abschließend durch die Umsetzung realer Synthesegase aus der Vergasung biogener Reststoffe mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* erfolgen.

In Satzprozessen mit acetogenen Mikroorganismen werden nur sehr niedrige Zelldichten erreicht (Doll 2018). Bei Massenprozessen wie der Alkoholproduktion wären aufgrund der geringen Wertschöpfung große Reaktionsvolumina nötig („Ökonomie des Maßstabs“, engl. *“economy of scale“*) (Takors et al. 2018; Benalcázar et al. 2017). Aufgrund der notwendigen Rüstzeiten bei Satzprozessen sind diese für die Produktion von Basischemikalien nicht wirtschaftlich. Kontinuierliche Prozesse zur effizienten Alkoholproduktion wurden für verschiedene Mikroorganismen wie *C. carboxidivorans* bereits berichtet (Doll et al. 2018). Mit *C. autoethanogenum* sind bisher in kontinuierlichen Prozessen häufig keine wirtschaftlichen Alkoholproduktivitäten dafür aber hohe Acetatakkumulation berichtet worden (Valgepea et al. 2017b). Da *C. autoethanogenum* nur geringe spezifische Wachstumsraten aufweist (Abrini et al. 1994), sind die Durchflussraten im kontinuierlichen Prozess ohne Zellrückhaltung, dem so genannten Chemostat, begrenzt (Weuster-Botz und Takors 2018). Eine Möglichkeit der Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Reaktionsmedium können Membranbioreaktoren mit getauchten Mikrofiltra-

tionsmembranen darstellen (Chmiel und Weuster-Botz 2018). Für die acetogenen Mikroorganismen *A. woodii* (Kantzow et al. 2015) und *C. aceticum* (Mayer et al. 2018) wurden kontinuierliche Prozesse im Membranbioreaktor mit vollständiger Zellrückhaltung über eine getauchte Mikrofiltrationsmembran zur autotrophen Essigsäureproduktion bereits berichtet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung von Gasfermentationen in kontinuierlichen Membranbioreaktoren mit *C. autoethanogenum*. Dabei wurde die Erhöhung der Alkoholproduktivitäten angestrebt.

Die Forschungsarbeiten wurden in folgende Arbeitspakete aufgeteilt:

- Etablierung autotropher Referenzsatzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor für *C. autoethanogenum* und *C. carboxidivorans* mit Reingasen.
- Inhibierungsstudien mit definierten Konzentrationen typischer Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$ ) mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* in kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren zur Identifikation quantitativer Synthesegasreinigungskriterien.
- Vergleichende Untersuchungen zur Synthesegasfermentation von biogenen Synthesegasen aus der Flugstromvergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*.
- Kontinuierliche Synthesegasfermentationen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlichen Rührkesselreaktor bei Prozessführung ohne Zellrückhaltung (Chemos-tat) und im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit totaler und teilweiser Zellrückhaltung über eine getauchte Membran.

### 3. Theoretischer Hintergrund

#### 3.1. Acetogene Mikroorganismen

Als acetogene Mikroorganismen werden grundsätzlich Mikroorganismen bezeichnet, die in ihrem Stoffwechsel hauptsächlich den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg mit dem zentralen Metabolit Acetyl-CoA nutzen (Schuchmann und Müller 2014).

##### 3.1.1. Reduktiver Acetyl-CoA-Stoffwechsel

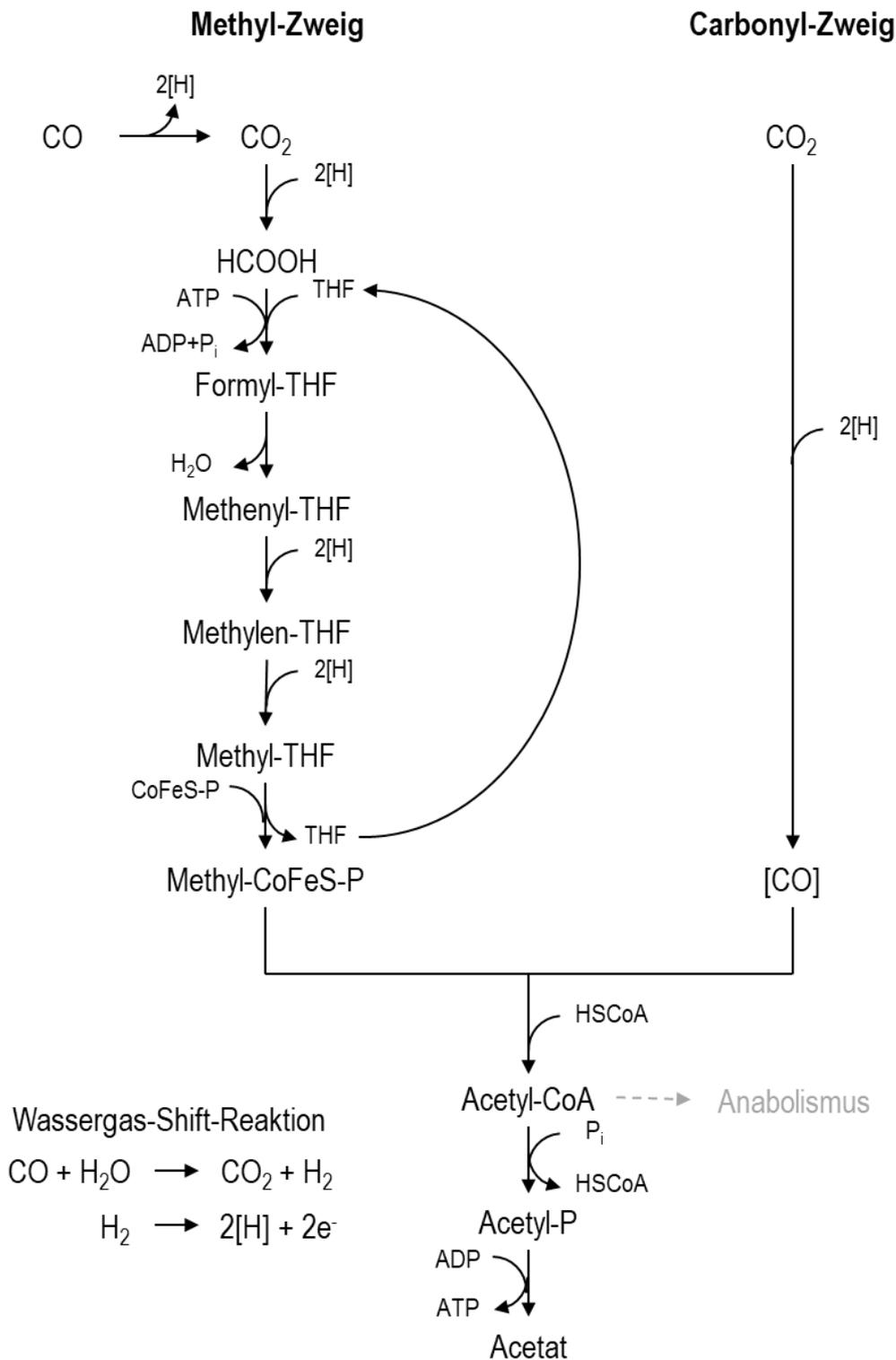
Der zentrale Stoffwechselweg für den autotrophen Metabolismus acetogener Mikroorganismen ist der so genannte reduktive Acetyl-CoA-Weg (nach seinen Entdeckern auch Wood-Ljungdahl-Weg genannt) (Drake 1995). Den zentralen Metabolit des Stoffwechsels stellt dabei das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) dar (Ragsdale und Pierce 2008; Ljungdahl 1986; Ljungdahl und Wood 1969; Wood 1986). Dieser Stoffwechselweg besteht aus zwei linearen Pfaden, dem Methyl-Zweig und dem Carbonyl-Zweig. Der Stoffwechselweg ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Alle im Stoffwechsel benötigten Reduktionsäquivalente können entweder aus der Hydrogenasereaktion direkt aus Wasserstoff generiert werden oder in der biologisch katalysierten Wasser-Gas-Shift-Reaktion aus CO unter Bildung von CO<sub>2</sub> generiert werden (Schuchmann und Müller 2014; Hu et al. 2011). Die Reaktion mit der Gibbs'schen freien Enthalpie (King et al. 1980) ist in (Gl. 3-1) dargestellt. Die gezeigte Gibbs'sche freie Enthalpie stellt thermodynamisch berechnete Werte aus tabellierten Standardbildungsenthalpien dar.



Im Methyl-Zweig wird zunächst durch die Formiat-Dehydrogenase CO<sub>2</sub> zu Formiat reduziert. Dieses wird unter ATP-Verbrauch durch die Formyl-THF-Synthetase an Tetrahydrofolat (THF) gebunden und bildet dort Formyl-THF. Das gebildete Formyl-THF wird durch die Formyl-THF-Cyclohydrolase zu Methenyl-THF unter Wasserabspaltung umgesetzt. In der folgenden Reaktionskaskade wird dieses durch die bifunktionelle Methenyl-THF/Methylen-THF-Dehydrogenase über Methylen-THF zu Methyl-THF weiter reduziert. Die so gebildete Methylgruppe wird durch die Methyltransferase an das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeSP) übertragen. Das THF wird seinerseits regeneriert und

kann erneut für die Bindung an ein Formiat verwendet werden. (Ljungdahl und Wood 1969; Drake 1995; Ragsdale und Pierce 2008)

Im Carbonyl-Zweig wird zunächst  $\text{CO}_2$  zu CO reduziert oder direkt CO in biologischer Form gebunden. Dieses aktivierte CO wird anschließend von der Acetyl-CoA-Synthase mit dem im Methyl-Zweig bereitgestellten Methyl-CoFeSP und dem Coenzym A (CoA) zum zentralen Molekül des Stoffwechselweges, Acetyl-CoA, kondensiert. Das Acetyl-CoA dient danach zum Aufbau der Biomasse im Anabolismus, sowie zur Bildung von Produkten. Zur Produktbildung wird Acetyl-CoA durch die Phosphotransacetylase zu Acetylphosphat, welches anschließend durch die Acetatkinase unter ATP-Gewinnung zu Acetat umgesetzt wird. Da für 1 mol gebildetes Acetat aus Acetyl-CoA 1 mol ATP gewonnen wird und für die Bindung von 1 mol Formiat an THF 1 mol ATP benötigt wird, liefert der reduktive Acetyl-CoA-Weg keinen Netto-ATP-Gewinn. (Drake 1995; Ragsdale und Pierce 2008; Ljungdahl 1986; Schuchmann und Müller 2014)



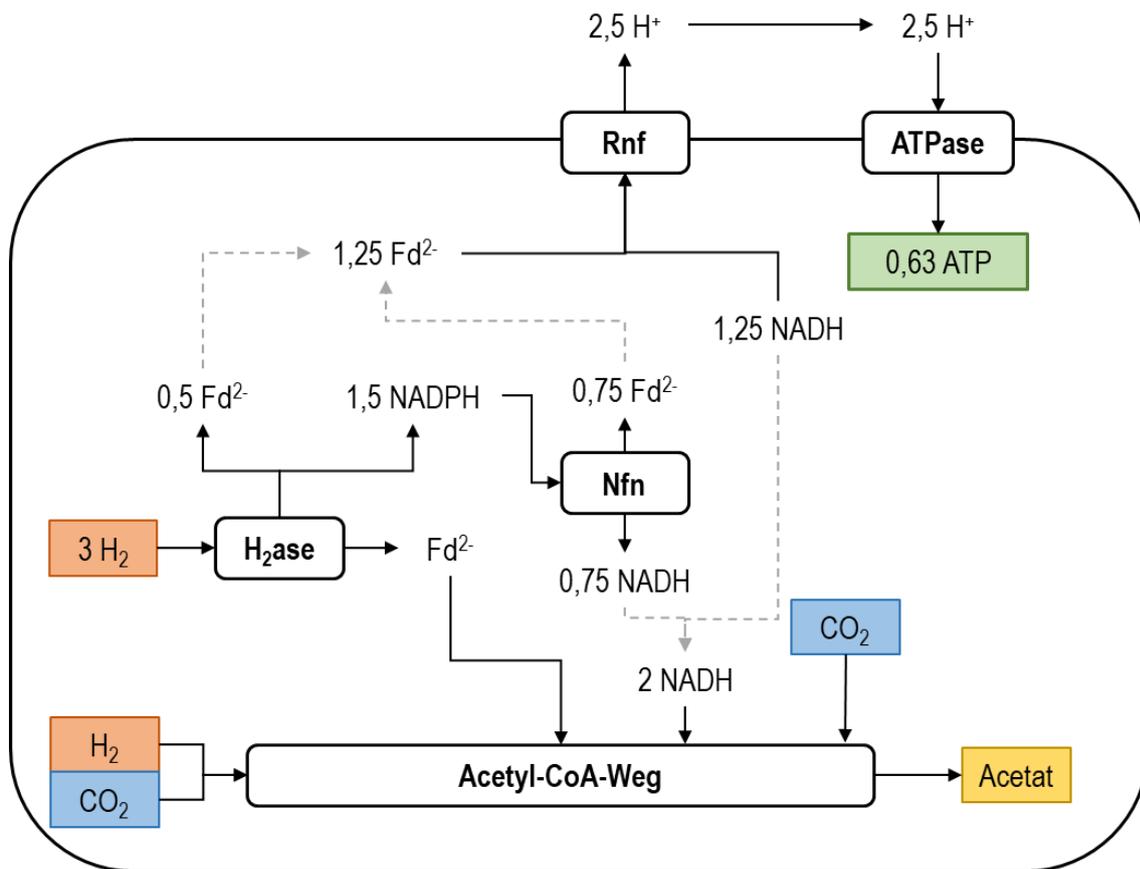
**Abbildung 3-1** Reduktiver Acetyl-CoA-Stoffwechselweg zur autotrophen Fixierung von Kohlenstoffmonoxid und Kohlenstoffdioxid zu Acetyl-CoA und weiter zu Acetat. [H] stellen Reduktionsäquivalente dar, die aus der biologischen Wasser-Gas-Shift-Reaktion oder der Hydrogenasereaktion stammen. Abgeändert nach Drake et al. (2008)

### 3.1.2. Energiekonservierung in acetogenen Clostridien

Die Energiekonservierung spielt eine große Rolle für den Metabolismus acetogener Mikroorganismen (Bertsch und Müller 2015). Der reduktive Acetyl-CoA-Weg (siehe Kapitel 3.1.1) liefert keinen Nettogewinn von ATP, da zunächst 1 mol ATP benötigt wird um 1 mol Formiat an THF zu binden und anschließend genau 1 mol ATP bei der Abspaltung des Acetats von Acetyl-Phosphat wiedergewonnen wird (Schuchmann und Müller 2014). Daher nutzen acetogene Mikroorganismen zur Energiekonservierung im autotrophen Metabolismus eine membranständige ATPase, welche über einen transmembranen Ionengradienten ATP generiert. Die benötigten Elektronen für die Reaktionen werden in einem Enzymkomplex erzeugt. Dabei werden die Mikroorganismen unterschieden nach dem verwendeten Ion für den Transmembrangradienten und nach dem Rnf- oder Ech-Komplex. Somit ergibt sich die Unterteilung in H<sup>+</sup>-abhängige, Rnf-abhängige (*Clostridium ljungdahlii*), H<sup>+</sup>-abhängige, Ech-abhängige (*Moorella thermoacetica*), Na<sup>+</sup>-abhängige, Rnf-abhängige (*Acetobacterium woodii*) und Na<sup>+</sup>-abhängige, Ech-abhängige (bisher noch kein Vertreter bekannt) (Müller et al. 2001; Hess et al. 2013; Schuchmann und Müller 2014). Der acetogene Mikroorganismus *C. aceticum* nutzt zwar einen H<sup>+</sup>-Gradienten, besitzt jedoch eine Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit (Mayer und Weuster-Botz 2017).

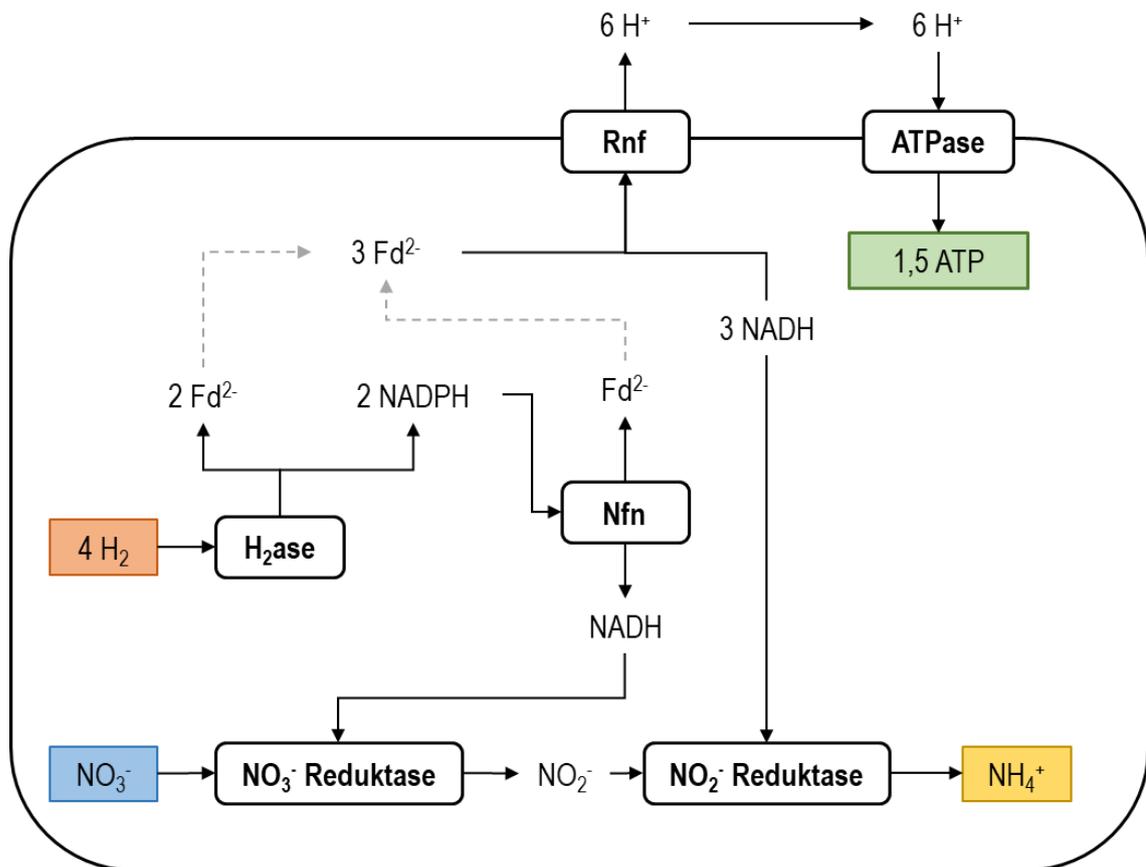
Für *C. autoethanogenum* kann aufgrund der nahen genetischen Verwandtschaft (Groher und Weuster-Botz 2016; Humphreys et al. 2015) vom gleichen Mechanismus wie bei *C. ljungdahlii* ausgegangen werden. Für *C. carboxidivorans* ist der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings verfügt *C. carboxidivorans* über einen Rnf-Komplex, weshalb die Nutzung eines H<sup>+</sup>-Gradienten gekoppelt mit dem Rnf-Komplex naheliegt (Bruant et al. 2010; Hemme et al. 2010; Li et al. 2015).

In der Reaktion mit einem H<sup>+</sup>-Gradienten und dem Rnf-Komplex können bis zu 0,63 mol ATP pro 1 mol produziertes Acetat gewonnen werden (Emerson et al. 2019; Schuchmann und Müller 2014). Die Reaktionsgleichung sowie der schematische Ablauf der Energiekonservierungsreaktionen sind in (Gl. 3-2) und Abbildung 3-1 dargestellt. Die gezeigte Gibbs'sche freie Enthalpie stellt thermodynamisch berechnete Werte aus tabellierten Standardbildungsenthalpien dar (Haynes et al. 2016).



**Abbildung 3-2** Energiekonservierung in acetogenen Clostridien am Beispiel von *C. ljungdahlii* für die Bildung von Acetat aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>. Abgeändert nach Schuchmann und Müller (2014) und Emerson et al. (2019)

Alternativ zur Kopplung der Energiegewinnung an den Acetyl-CoA-Weg kann in einigen acetogenen Clostridien auch durch die Nutzung von Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor Energie konserviert werden (Emerson et al. 2019; Seifritz et al. 1993; Fröstl et al. 1996). Hierbei wird durch die mehrstufige enzymatische Reaktion der Nitratreduktase Nitrat zunächst zu Nitrit reduziert und anschließenden durch die Nitritreduktase das Nitrit zu Ammoniak reduziert. Hierbei werden insgesamt 1,5 mol ATP pro 1 mol Nitrat gewonnen (Emerson et al. 2019). Die Reaktionsgleichung der Nettoreaktion sowie die schematische Darstellung der Reaktionen sind in (Gl. 3-3) und Abbildung 3-3 dargestellt. Die gezeigte Gibbs'sche freie Enthalpie stellt thermodynamisch berechnete Werte aus tabellierten Standardbildungsenthalpien dar (Haynes et al. 2016).



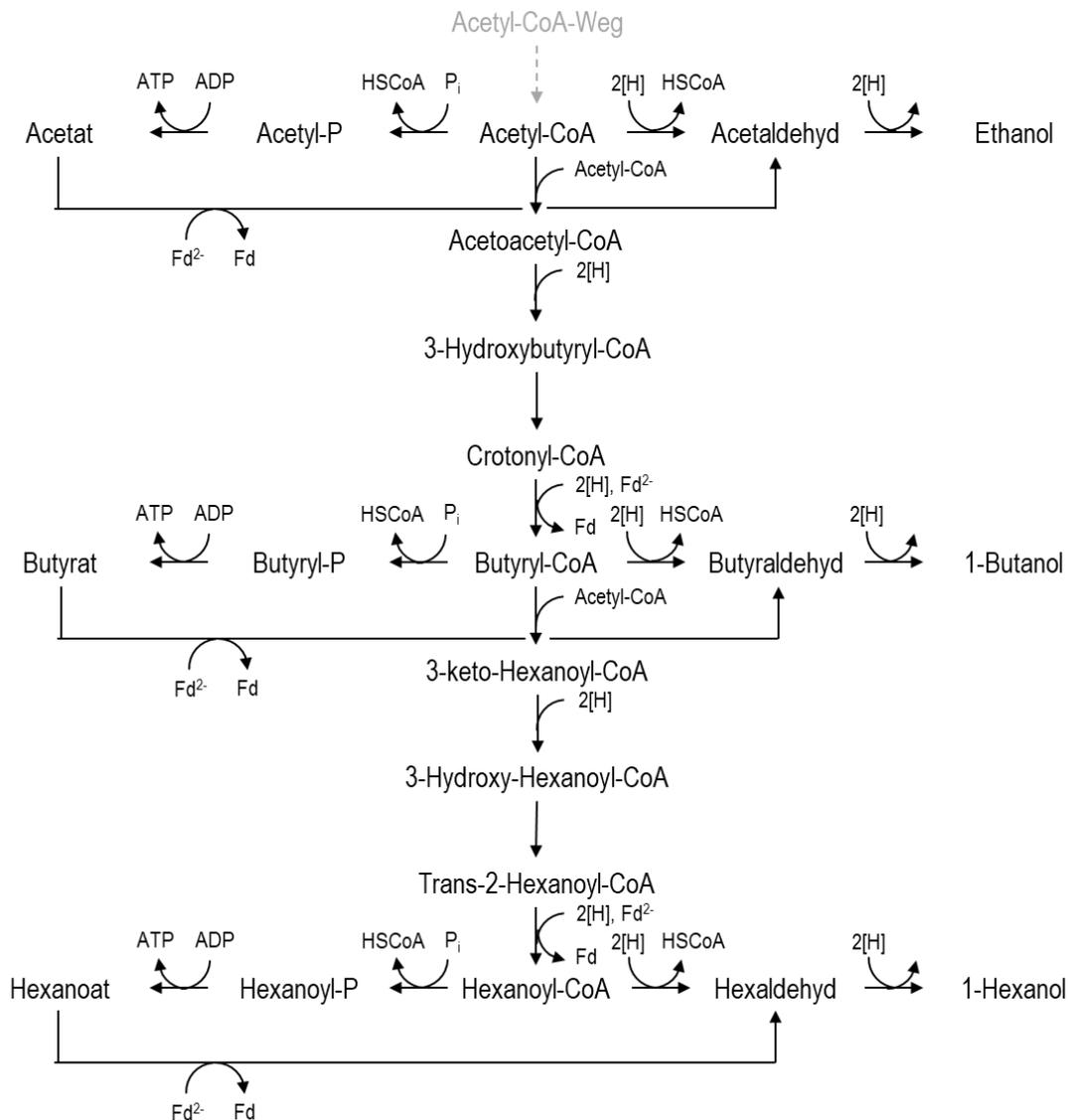
**Abbildung 3-3** Energiegewinnung in *C. ljungdahlii* durch Reduktion von Nitrat zu Ammonium. Abgeändert nach Emerson et al. (2019)

### 3.1.3. *Clostridium carboxidivorans*

*Clostridium carboxidivorans* (*C. carboxidivorans*) ist ein obligat anaerobes, stäbchenförmiges, sporenbildendes Bakterium. Es wurde ursprünglich aus einer landwirtschaftlichen Sickergrube isoliert (Liou et al. 2005). Das Optimum für das Wachstum von *C. carboxidivorans* liegt zwischen pH 5,0 und pH 7,0 bei 37 °C bis 40 °C (Liou et al. 2005). Der Bereich, in dem Wachstum möglich ist, ist jedoch mit pH 4,4 bis pH 7,6 breiter als bei anderen acetogenen Mikroorganismen (Liou et al. 2005; Abrini et al. 1994). *C. carboxidivorans* verfügt über einen heterotrophen Metabolismus für Substrate wie Zucker (z. B. Glucose, Fructose, etc.), Mannitol, 2-Propanol oder 1-Butanol. Darüber hinaus ist *C. carboxidivorans* in der Lage, autotroph Kohlenstoff in Form von CO zu fixieren und

diesen als alleinige Kohlenstoff-, Elektronen- und Energiequelle zu nutzen (Liou et al. 2005).

Die Produkte im autotrophen Metabolismus ausgehend vom in Kapitel 3.1.1 gezeigten reduktiven Acetyl-CoA-Weg sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Diese sind neben Essigsäure und Ethanol auch die längerkettigen Säuren und Alkohole Buttersäure, 1-Butanol, Hexansäure und 1-Hexanol (Fernández-Naveira et al. 2017; Phillips et al. 2015; Ukpong et al. 2012; Ramachandriya et al. 2013).



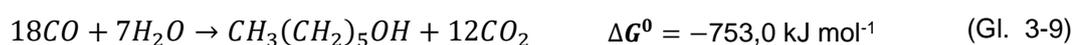
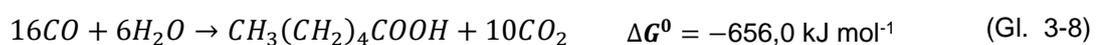
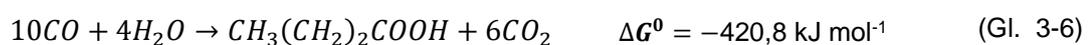
**Abbildung 3-4** Produktbildung in *C. carboxidivorans* für die Synthese der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol ausgehend vom reduktiven Acetyl-CoA-Weg. Abgeändert nach Fernández-Naveira et al. (2017)

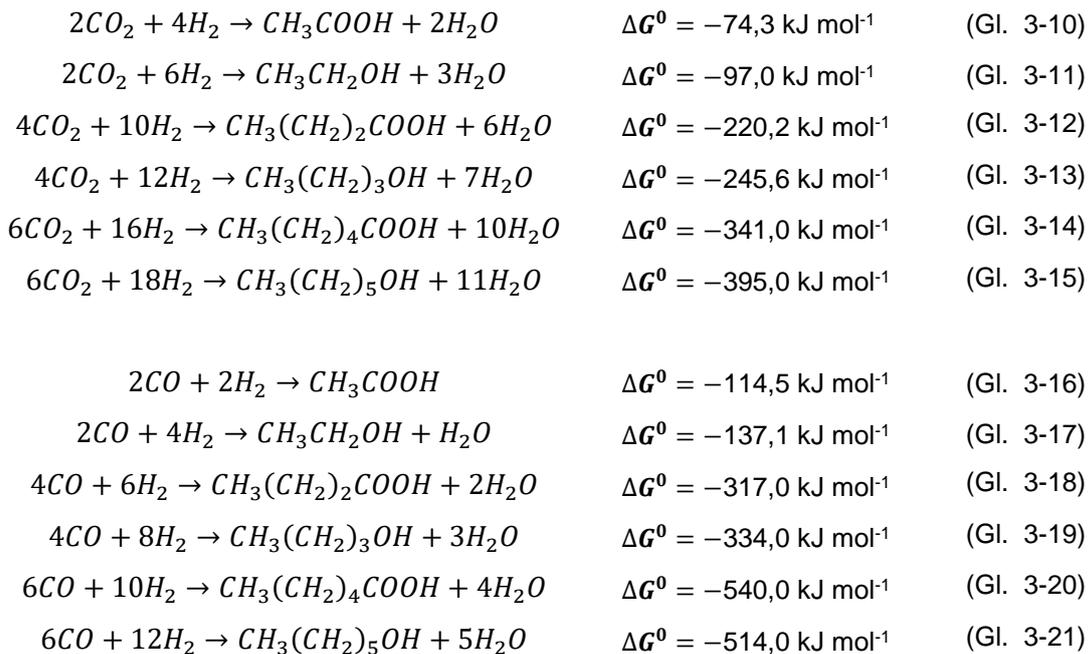
Ausgehend vom zentralen Metabolit, Acetyl-CoA, des acetogenen Stoffwechsels kann durch eine Phosphotransferase ein Phosphat an den Acetyl-Rest gebunden werden.

Anschließend kann dieses Phosphat von einer Acetatkinase unter ATP-Gewinn abgespalten werden und so Acetat produziert werden. Alternativ kann das Acetyl-CoA durch zweistufige Reduktion von einer Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase zum Intermediat Acetaldehyd und weiter zu Ethanol umgesetzt werden (*de novo* Synthese). Auch die Wiederaufnahme von bereits gebildetem Acetat kann durch die Ferredoxin-abhängige Reaktion mit einer Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetaldehyd und die weitere Reduktion mit der Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol zur Bildung von Ethanol genutzt werden. (Fernández-Naveira et al. 2017)

Zur Produktion längerkettiger Säuren und Alkohole wird ein weiteres Acetyl-CoA von einer Thiolase an ein Acetyl-CoA gebunden, wobei Acetoacetyl-CoA entsteht. Dieses wird anschließend mehrstufig von den Enzyme, 3-Hydroxy-Butyryl-CoA-Dehydrogenase, Crotonase und Butyryl-CoA-Dehydrogenase über die Intermediate 3-Hydroxy-Butyryl-CoA und Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA reduziert (Bennett und Rudolph 1995). Dieses kann analog zu Acetyl-CoA weiter zu Butyrat oder 1-Butanol (*de novo* Synthese) umgesetzt werden, wobei auch hier die Wiederaufnahme von Butyrat und Ferredoxin-abhängige Umsetzung zu 1-Butanol möglich ist. Mit einem weiteren Acetyl-CoA kann Butyryl-CoA über die reverse  $\beta$ -Oxidation zu Hexanoyl-CoA umgesetzt werden (Bengelsdorf et al. 2018). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Reaktionen zum Hexanoyl-CoA nach dem analogen Mechanismus abläuft wie die Bildung von Butyryl-CoA (Bengelsdorf et al. 2018; Fernández-Naveira et al. 2017). Auch aus Hexanoyl-CoA sind die Bildung von Hexanoat, die *de novo* Synthese von 1-Hexanol sowie die Wiederaufnahme von Hexanoat und Ferredoxin-abhängige Umsetzung zu 1-Hexanol möglich.

Die Stöchiometrie der Reaktionen bei der Produktbildung mit *C. carboxidivorans* mit den zugehörigen freien molaren Reaktionsenthalpien (Fernández-Naveira et al. 2017) sind im Folgenden dargestellt (Gl. 3-4) bis (Gl. 3-21). Die gezeigten Gibbs'schen freien Enthalpien stellen thermodynamisch berechnete Werte aus tabellierten Standardbildungsenthalpien dar (Haynes et al. 2016).





Die Bildung von Produkten durch *C. carboxidivorans* hängt sehr stark vom vorliegenden pH ab. Während bei hohem pH (pH 6,0) das beste Wachstum und vorwiegend Acetatproduktion (Acidogenese) vorherrschen, führt ein niedrigerer pH (pH 5) zu bevorzugter Alkoholproduktion und der Umsetzung bereits gebildeter Säuren (Solventogenese) (Ramió-Pujol et al. 2015a; Ganigué et al. 2016). In autotrophen Satzprozessen zeigte *C. carboxidivorans* die besten Ergebnisse mit unregelmäßigem pH, wobei zunächst bei pH 6,0 optimales Wachstum und vorwiegend Acetatproduktion stattfanden, wodurch der pH absank, bis bei pH 4,5 die Umsetzung von Säuren zu Alkoholen begann und die Neubildung von Alkoholen überwog (Doll et al. 2018; Doll 2018; Ukpong et al. 2012). Niedrigere Temperaturen als die optimale Temperatur für Wachstum von 37 °C (Liou et al. 2005) können für *C. carboxidivorans* eine zu starke Acetatproduktion verhindern und Alkoholbildung fördern, verlangsamen jedoch auch das mikrobielle Wachstum (Ramió-Pujol et al. 2015b; Doll 2018).

*C. carboxidivorans* wird in der Literatur als Mikroorganismus mit hohem Potential für industrielle Anwendungen bezeichnet, da er hohe Alkoholproduktion bei geringer Acetatakkumulation ermöglicht. Die produzierten Alkohole stellen wirtschaftlich relevante Produkte dar, da diese als Kraftstoffe (Ethanol und 1-Butanol) oder Lösemittel in der chemischen Industrie (1-Hexanol) Anwendung finden können (Dürre 2007; Bengelsdorf et al. 2018). Neben dem bereits in Kraftstoffen eingesetzten Ethanol bietet 1-Butanol dabei großes Potential, da es neben guten Klopfeigenschaften auch eine höhere Energiedichte als Ethanol besitzt (Dürre 2007; Li et al. 2019; Peralta-Yahya et al. 2012).

*C. carboxidivorans* zeichnet sich dabei insbesondere durch die Fähigkeit aus, die gebildeten Säuren wiederaufzunehmen und in die korrespondierenden Alkohole umzusetzen. Dabei sind eine hohe Alkoholkonzentration und ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis wichtig für einen effizienten Produktabtrennungsprozess über klassische thermische Trennverfahren wie Rektifikation (Ezeji et al. 2004; Daniell et al. 2012). Außerdem ist aufgrund der geringen Wertschöpfung des Gesamtprozesses eine hohe Alkoholproduktivität wichtig (Dürre 2007; Bengelsdorf et al. 2018). Das Genom von *C. carboxidivorans* wurde vollständig sequenziert (Li et al. 2015; Bruant et al. 2010).

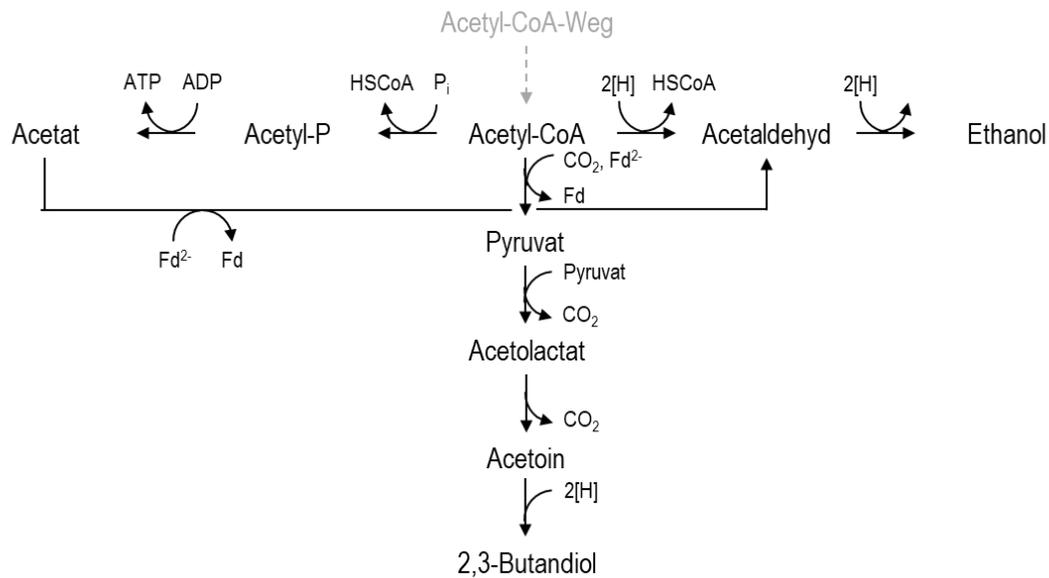
Für *C. carboxidivorans* wurden vielversprechende Prozessführungsstrategien zur Bildung von Alkoholen etabliert. Dabei wurden in Satzprozessen Alkoholkonzentrationen von bis zu 5,55 g L<sup>-1</sup> Ethanol, 2,66 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol und 1,0 g L<sup>-1</sup> 1-Hexanol berichtet (Fernández-Naveira et al. 2016; Phillips et al. 2015). In einer kontinuierlichen Rührkesselskaskade wurde mit einer Durchflussrate von 0,08 h<sup>-1</sup> im zweiten Reaktor im Fließgleichgewicht Konzentrationen von bis zu 6,07 g L<sup>-1</sup> Ethanol, 0,73 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol und 0,07 g L<sup>-1</sup> 1-Hexanol bei sehr geringer Acetatakkumulation erreicht (Doll et al. 2018; Abubackar et al. 2018).

Neben *C. carboxidivorans* sind keine anderen Mikroorganismen bekannt, die natürlicherweise autotroph 1-Hexanol produzieren können. Vom Mikroorganismus *C. kluyverii* wird jedoch heterotroph Hexanoat aus Ethanol und Acetat produziert (Seedorf et al. 2008).

#### **3.1.4. *Clostridium autoethanogenum***

*Clostridium autoethanogenum* (*C. autoethanogenum*) ist ein obligat anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Es wurde erstmalig aus Kaninchenexkrementen isoliert (Abrini et al. 1994). Das Optimum für Wachstum liegt bei pH 5,8 bis pH 6,0 bei 37 °C. Der Bereich, in dem Wachstum möglich ist, liegt zwischen pH 4,5 und pH 6,5 (Abrini et al. 1994). Es ist in der Lage, im heterotrophen Metabolismus Substrate wie Zucker (z.B. Xylose, Fructose, etc.), Pyruvat und L-Glutamat zu verwerten (Abrini et al. 1994). Darüber hinaus verfügt *C. autoethanogenum* über einen autotrophen Metabolismus, in welchem entweder CO oder CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als alleinige Kohlenstoff-, Elektronen und Energiequelle genutzt werden können. (Abrini et al. 1994)

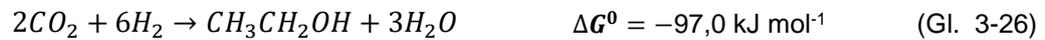
Die Produktbildung ausgehend vom in Kapitel 3.1.1 gezeigten Acetyl-CoA-Weg ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Neben Essigsäure und Ethanol produziert *C. autoethanogenum* den zweiwertigen Alkohol 2,3-Butandiol (Köpke et al. 2011b; Köpke et al. 2014).



**Abbildung 3-5** Produktbildung in *C. autoethanogenum* für die Synthese der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol. Abgeändert nach Köpke et al. (2011b)

Analog zu *C. carboxidivorans* (Kapitel 3.1.3) bildet *C. autoethanogenum* aus Acetyl-CoA die Produkte Acetat und Ethanol. Durch eine Phosphotransferase wird Acetyl-Phosphat gebildet, welches von einer Acetatkinase unter ATP-Gewinn zu Acetat umgesetzt wird. Durch die zweistufige Reduktion mit einer Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase wird aus Acetyl-CoA zunächst das Intermediat Acetaldehyd und folglich Ethanol gebildet. Alternativ ist die Wiederaufnahme von Acetat und Reduktion mit der Ferredoxin-abhängigen Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase zur Ethanol Produktion möglich. Zusätzlich kann *C. autoethanogenum* ebenso wie die acetogenen Mikroorganismen (*C. ljungdahlii* und *C. ragsdalei*) aus Acetyl-CoA durch mehrstufige Umsetzung 2,3-Butandiol produzieren (Köpke et al. 2011b; Köpke et al. 2014). Durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase wird unter Bindung eines  $\text{CO}_2$  der Metabolit Pyruvat gebildet. Eine Acetolactatsynthase synthetisiert aus 2 mol Pyruvat unter Abspaltung von 1 mol  $\text{CO}_2$  1 mol Acetolactat, welches von der Acetolactatdecarboxylase unter erneuter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu Acetoin umgesetzt wird. Schließlich wird Acetoin von einer 2,3-Butandioldehydrogenase zum Produkt 2,3-Butandiol reduziert. (Köpke et al. 2011b; Köpke et al. 2014)

Die Stöchiometrie der Produktbildungsreaktionen mit den freien Reaktionsenthalpien (Haynes et al. 2016; Fernández-Naveira et al. 2017) ist im Folgenden gezeigt (Gl. 3-22) bis (Gl. 3-30). Die gezeigten Gibbs'schen freien Enthalpien stellen thermodynamisch berechnete Werte aus tabellierten Standardbildungsenthalpien dar (Haynes et al. 2016).



*C. autoethanogenum* zeichnet sich insbesondere durch sein Potential aus, hohe Alkoholkonzentrationen bei gleichzeitig geringer Acetatakkumulation zu erreichen (Abubackar et al. 2015a; Abubackar et al. 2016). Dabei stellt Ethanol ein wirtschaftlich relevantes Produkt als Biokraftstoff dar (Liew et al. 2013), während 2,3-Butandiol eine Plattformchemikalie beispielsweise für die Produktion von 1,3-Butadien, einem wichtigen Comonomer für die Produktion von Duroplasten, darstellt (Liu et al. 2016; Tinôco et al. 2021). Im Vergleich zu *C. carboxidivorans* (Doll 2018) ist für *C. autoethanogenum* auch die effiziente Nutzung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> bekannt (Valgepea et al. 2018).

Zusätzlich zeigt *C. autoethanogenum* eine hohe genetische Ähnlichkeit zum gut erforschten Mikroorganismus *C. ljungdahlii* (Groher und Weuster-Botz 2016) und sein Genom wurde vollständig sequenziert (Humphreys et al. 2015). Im Gegensatz zu anderen acetogenen Mikroorganismen wie *C. carboxidivorans* wurde *C. autoethanogenum* bereits erfolgreich genetisch für verschiedene Veränderungen wie erhöhte Ethanolproduktion und die Bildung nicht-natürlicher Produkte (iso-Propanol, Aceton) zugänglich gemacht (Liew et al. 2017; Liew et al. 2022).

Für *C. autoethanogenum* wurden vielversprechende Alkoholproduktionsprozesse mit Ethanolkonzentrationen von bis zu 7,14 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 1,62 g L<sup>-1</sup> 2,3-Butandiol bei sehr geringer Acetatakkumulation in Satzprozessen im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit zyklischen pH-Verschiebungen zwischen pH 5,75 und pH 4,75 sowie teilweiser Medienerneuerung berichtet (Abubackar et al. 2016). Im Fließgleichgewicht in kontinuierlichen Prozessen im Chemostat wurden jedoch mit *C. autoethanogenum* Ethanol-zu-Acetat-Verhältnisse von maximal 1 mol Ethanol 1 mol<sup>-1</sup> Acetat gefunden (Valgepea et al. 2017b). Darüber hinaus konnte für *C. autoethanogenum* gezeigt werden, dass die ATP-Limitierung des Acetyl-CoA-Stoffwechsels (Kapitel 3.1.2) durch die zusätzliche

Supplementierung von Arginin überwunden werden kann, was einen wichtigen Schritt für die zukünftige Produktion nicht-natürlicher Produkte darstellt (Valgepea et al. 2017a).

## **3.2. Synthesegas**

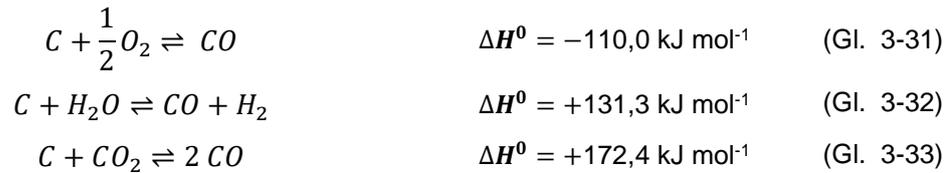
Im Folgenden werden verschiedenen Aspekte von Synthesegasen wie deren Produktion, Zusammensetzung, Spurenkomponenten und Nutzung erläutert.

### **3.2.1. Herkunft, Nutzung und Zusammensetzung von Synthesegas**

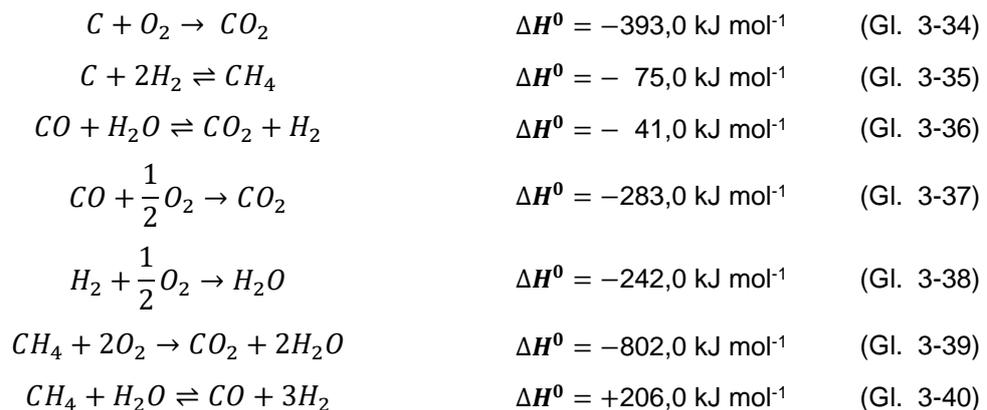
Synthesegase können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden und haben je nach ihrem Ursprung verschiedene Zusammensetzungen. Dabei fallen Synthesegase typischerweise als Abgas von Stahlwerken oder bei der Vergasung kohlenstoffhaltigen Materials an. Eine moderne Alternative ist die Vergasung biogener Reststoffe wie Laub, Grünschnitt, Holzschnitzel oder anderen Bioabfalls (Liakakou et al. 2021; Benevenuti et al. 2021; Briesemeister et al. 2017; Kremling et al. 2017). Da das Vergasungsgut in diesem Fall ein Abfallstoff ist, kann auf diese Weise ein nachhaltiges Synthesegas erzeugt werden.

Wichtige Parameter eines Vergasungsprozesses sind die Temperatur bei der Vergasung, die Aufheizrate des Brennstoffes und die Verweilzeit im Vergaser, wobei zum Erreichen des gewünschten hohen Anteils gasförmiger Komponenten hohe Temperaturen und Aufheizarten sowie lange Verweilzeiten benötigt werden (Kaltschmitt et al. 2016; Kremling 2018).

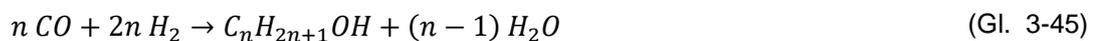
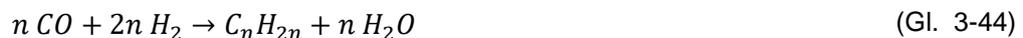
Die Hauptkomponenten des erhaltenen Synthesegases bei der Biomassevergasung stellen Kohlenstoffmonoxid (CO), Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) dar. Stickstoff (N<sub>2</sub>) kann ebenfalls in Synthesegasen enthalten sein, wenn entweder mit Luft als Vergasungsmittel gearbeitet wird oder der Brennstoff mit Stickstoff pneumatisch gefördert wird (Briesemeister et al. 2017; Kremling 2018). Durch unvollständige Umsetzung des Brennstoffes kann es ebenfalls zu kurzkettingen Kohlenwasserstoffen wie Methan (CH<sub>4</sub>) im Synthesegas kommen. Als Vergasungsmittel können Luft, Sauerstoff, Dampf oder CO<sub>2</sub> dienen. Die Reaktionsgleichungen für die Reaktion von Kohlenstoff mit den verschiedenen Vergasungsmitteln sind in den Gleichungen (Gl. 3-31) bis (Gl. 3-33) angegeben (Kaltschmitt et al. 2016).



Als weitere Reaktionen treten dabei Nebenreaktionen wie unter anderem Verbrennungsreaktionen oder die Wasser-Gas-Shift-Reaktion auf (Gl. 3-34) bis (Gl. 3-40) (Kaltschmitt et al. 2016):



Eine klassische Form der Nutzung von Synthesegasen stellt die Fischer-Tropsch-Synthese dar, in welcher aus CO und H<sub>2</sub> an einem Metallkatalysator verschiedene Kohlenwasserstoffe produziert werden können (Klerk 2011; Kaltschmitt et al. 2016).



Dieser Prozess benötigt sowohl hohe Temperaturen als auch hohe Drücke (Kaltschmitt et al. 2016; Klerk 2011). Außerdem werden hohe Anforderungen an die Verhältnisse der Synthesegaskomponenten zueinander gestellt, sowie niedrige Konzentrationen möglicher Spurenverunreinigungen im Synthesegas benötigt, welche als Katalysatorgift für die verwendeten Metallkatalysatoren wirken können (Kaneko et al. 2000).

In der Literatur sind eine Vielzahl von Vergasungsprozessen zur Herstellung eines Synthesegases für die Nutzung in Synthesegasfermentationsprozesse beschrieben (Benevenuti et al. 2021). Dabei werden je nach Art des Vergasungsprozesses, des Rohstoffs und des Vergasungsmittels sehr unterschiedliche Zusammensetzungen erhalten, die in Tabelle 3-1 basierend auf der Übersicht von Benevenuti et al. (2021) zusammengestellt sind.

Als Vergasungsprozesse zur Vergasung von Biomasse kommen häufig Wirbelschichtvergaser und Festbettfallreaktoren zum Einsatz (Alauddin et al. 2010; Ahrenfeldt et al. 2013). Die CO-Anteile im resultierenden Synthesegas reichen bis zu 35,7 % CO bei der Vergasung von Holz mit Sauerstoff und Dampf in einem Wirbelschichtvergaser (Siedlecki und Jong 2011). Mit Luft als Vergasungsmittel können diese Anteile mit bis zu 6,9 % CO jedoch deutlich niedriger werden (Li et al. 2004). In einem Autoklaven Reaktor wurden bei der Vergasung von Zuckerrohrbagasse lediglich 5,0 % CO erreicht, wobei hier mit 45 % H<sub>2</sub> der höchste H<sub>2</sub>-Anteil beschrieben wurde (Cao et al. 2018). In Wirbelschichtreaktoren wurden H<sub>2</sub>-Anteile zwischen 41,7 % H<sub>2</sub> bei der Vergasung von Chinaschilf (*Miscanthus*) mit Dampf als Vergasungsmittel (Michel et al. 2011) und 4,4 % H<sub>2</sub> bei der Vergasung von Reishülsen mit Luft erreicht (Zhang et al. 2013). Auch der erreichte CO<sub>2</sub>-Anteil bei der Wirbelschichtvergasung liegt in einem großen Bereich zwischen 45,3 % CO<sub>2</sub> bei der Vergasung von Stroh mit Sauerstoff und Dampf (Siedlecki und Jong 2011) und 10,5 % CO<sub>2</sub> bei der Vergasung von Holzhackschnitzeln mit Sauerstoff (Carvalho et al. 2015). Während Stickstoff bei der Vergasung mit Luft bis zu 68 % des Synthesegases ausmacht (Li et al. 2004), kann der Anteil bei Vergasung mit Sauerstoff oder Dampf unter 0,1 % liegen (Carvalho et al. 2015). Auch der Methananteil kann zwischen 11,4 % CH<sub>4</sub> (Liakakou et al. 2021; Migliaccio et al. 2021) und 0,2 % CH<sub>4</sub> (Pedroso et al. 2005) liegen.

Ein anderer Ansatz für die Vergasung von Biomasse ist die Flugstromvergasung, die bisher selten in der Biomassevergasung eingesetzt wird und eher im Bereich der Kohlevergasung Anwendung findet. Allerdings bietet die Flugstromvergasung viele Vorteile wie eine geringe Anlagenkomplexität und eine bessere Produktgasqualität, wobei bei einem Flugstromvergaser im Vergleich zu anderen Prozessarten bei der geringsten Verweilzeit der höchste Kohlenstoffumsatz erreicht wird (Kremling 2018; Spliethoff 2010). Allerdings wird hierzu eine geringe Partikelgröße benötigt, welche eine Vorbehandlung der Biomasse erfordert. Dennoch können in der Flugstromvergasung mit Sauerstoff und Dampf hohe CO-Anteile von 45,0 % CO und trotzdem relativ niedrige CO<sub>2</sub>-Anteile von 25,6 % CO<sub>2</sub> erreicht werden (Kremling et al. 2017), die für die Anwendung in Synthesegasfermentationen vielversprechend sind.

**Tabelle 3-1** Vergleich der Zusammensetzungen verschiedener biogener Synthesegase aus der Vergasung biogener Reststoffe. Ergänzt nach Benevenuti et al. (2021)

Rohstoff	Vergasungsmethode	Vergasungsmittel	Gaszusammensetzung					Verunreinigungen	Literatur
			CO, %	CO <sub>2</sub> , %	H <sub>2</sub> , %	N <sub>2</sub> , %	CH <sub>4</sub> , %		
Torrefiziertes Holz (TorrCoal)	Flugstromvergasung	O <sub>2</sub> und Dampf	45,0	25,6	27,9	0,1	1,4	< 4500 ppm NH <sub>3</sub> , HCN < 50 ppm < 200 ppm H <sub>2</sub> S, < 200 ppm NO <sub>x</sub>	(Kremling 2018)
Lignin	Wirbelschichtvergasung	Dampf	19,8	24,4	35,5	-	11,4	21,2 g Nm <sup>-3</sup> Teer, 0,67 % C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , 3,3 % C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , 0,11 % C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	(Liakakou et al. 2021)
Buchenholz	Wirbelschichtvergasung	Dampf	28,0	23,8	33,4	-	8,8	13,0 g Nm <sup>-3</sup> Teer, 0,05 % C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , 1,6 % C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , 0,03 % C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
Hackschnitzel	Wirbelschichtvergasung	Luft	18,0	11,5	13,2	41,1	4,1	-	(Carvalho et al. 2015)
		O <sub>2</sub>	35,7	10,5	27,9	0,9	0,76	-	
		Dampf	14,0	14,1	31,1	0,0	7,3	-	
		Dampf (trocken)	18,5	18,6	41,0	0,06	9,7	-	
Chinaschilf ( <i>Miscanthus</i> )	Wirbelschichtvergasung	Dampf	25,6	23,4	41,7	-	9,3	-	(Michel et al. 2011)
Chinaschilf ( <i>Miscanthus</i> )	Wirbelschichtvergasung	O <sub>2</sub> und Dampf	31,4	31,2	22,8	4,6	9,5	BTX 42 g m <sup>-3</sup> , Phenole 4,6 g m <sup>-3</sup>	(Siedlecki und Jong 2011)
Stroh		12,7	45,3	32,0	4,2	5,8	BTX 23 g m <sup>-3</sup> , Phenole 1,2 g m <sup>-3</sup>		
Holz		33,7	31,0	21,8	4,6	8,9	BTX 38 g m <sup>-3</sup> , Phenole 2,2 g m <sup>-3</sup>		
Gummibaumholz	Festbettfallreaktor	Luft	19,6	9,9	17,2	51,9	1,4	-	(Jayah et al. 2003)
Olive	Festbettfallreaktor	Luft	17,4	12,4	13,2	54,9	0,8	-	(Pedroso et al. 2005)
Pfirsich		17,7	13,5	15,0	51,7	1,2	-		
Kiefer		16,0	11,4	12,0	59,4	0,2	-		
Klärschlamm	Wirbelschichtvergasung	Luft und N <sub>2</sub>	26,16	20,90	33,30	-	11,46	7,99 % C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , 0,19 % C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , Teer und Feststoffe	(Migliaccio et al. 2021)
			30,99	28,97	26,92	-	10,15	2,77 % C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , 0,19 % C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , Teer und Feststoffe	
Zuckerrohrbagasse	Autoklavenreaktor	Überkritisches Wasser	5,0	40,0	45,0	5,0	10,0	-	(Cao et al. 2018)
Holzbiomassepellets	Wirbelschichtvergasung	O <sub>2</sub> und Dampf	20,0	30,0	40,0	5,0	5,0	5 g NM <sup>-3</sup> Teer	(Kobayashi et al. 2011)
			20,0	30,0	35,0	2,0	8,0	>10 g NM <sup>-3</sup> Teer	
Reishülsen	Blasen-Wirbelschichtvergasung	Luft	21,3	11,3	4,4	57,1	4,3	-	(Zhang et al. 2013)
			16,9	15,9	4,8	57,1	3,7	-	
Zypressensägemehl	Wirbelschichtvergasung	Luft	6,9	18,1	5,6	68,0	1,4	-	(Li et al. 2004)
Gemischte Kiefern- und Fichtenrinde			21,4	14,7	5,4	53,9	4,6	15,3 g Nm <sup>-3</sup> Teer	

### 3.2.2. Spurenverunreinigungen in Synthesegasen

Neben den Hauptkomponenten von Synthesegasen sind je nach Quelle des Gases auch Spurenverunreinigungen enthalten. Diese stellen die Abbauprodukte der organisch gebundenen Elemente Stickstoff und Schwefel, aber auch Reste des Vergasungsmittels  $O_2$  oder Reste des unvollständig vergasteten Kohlenstoffs in Form von Teeren und kurzkettigen Kohlenwasserstoffen dar (Spliethoff 2010; Kaltschmitt et al. 2016).

#### Stickstoffspezies

Die Konzentrationen der Spurenverunreinigungen hängen dabei stark vom Brennstoff ab. Während in der Holzvergasung relativ wenig Stickstoffspezies entstehen, wurde bei der Kohlevergasung bis zu 4774 ppm  $NH_3$  berichtet (Jeremiáš et al. 2014). Die Bildung von HCN wird insbesondere durch hohe Aufheizraten und hohe Temperaturen begünstigt (Leppälähti und Koljonen 1995), wie sie in der Flugstromvergasung vorliegen (Kremling 2018). Stickoxide stellen die im Vergasungsprozess am wenigsten gebildete Spurenverunreinigung der Stickstoffspezies dar (Chen et al. 2009).

#### Stickoxide

Stickoxide  $NO_x$  können eine bedeutende Spurenverunreinigung von Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe darstellen. Für  $NO_x$  wurden für die Vergasung von Biomasse bis zu 1227 ppm  $NO_x$  berichtet (Tong et al. 2007). Stickoxide können in verschiedenen Oxidationsstufen vorkommen. Die Oxidationsstufen und jeweiligen Beispiele der Spezies sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

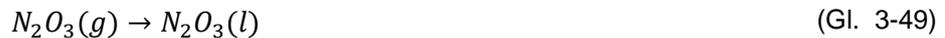
**Tabelle 3-2** Stickoxidspezies mit zugehöriger Oxidationsstufe

Stickoxidspezies $NO_x$	Oxidationsstufe
$N_2O$	+I
NO	+II
$N_2O_3$ ; $HNO_2$	+III
$NO_2$ ; $N_2O_4$	+IV
$N_2O_5$ ; $HNO_3$	+V

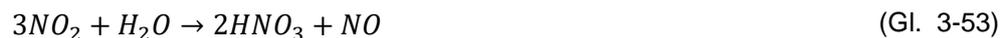
Bei erhöhten Temperaturen liegen verschiedene Stickoxidspezies immer im Gleichgewicht vor. Deshalb kann in den meisten Fällen das Auftreten von mehreren Stickoxidspezies gleichzeitig nicht ausgeschlossen werden (Gl. 3-47) und (Gl. 3-48). (Joshi et al. 1985)



Reines Stickstoffmonoxid (NO) reagiert nicht mit Wasser. Aber es kann die Reaktion anderer Stickoxide wie insbesondere Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) mit Wasser fördern, indem es zur Bildung von N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> beiträgt. Dabei müssen sich die Gaskomponenten zunächst in der wässrigen Phase lösen (Gl. 3-48) bis (Gl. 3-49). (Joshi et al. 1985)



Gelöste Stickoxidspezies reagieren mit Wasser und bilden dabei in erster Linie Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) und salpetrige Säure (HNO<sub>2</sub>) (Gl. 3-50) bis (Gl. 3-56). (Joshi et al. 1985; Chan et al. 1976; Lee und Schwartz 1981)



Während die Salpetersäure eine sehr starke Säure (pK<sub>S</sub> = -1,37) ist, wird die salpetrige Säure als eine mittelstarke Säure (pK<sub>S</sub> = 3,29) bezeichnet und dissoziiert in wässrigem Medium nur teilweise in Nitrit- und Oxonium-Ionen. Gleichzeitig ist reines HNO<sub>2</sub> instabil und liegt im Gleichgewicht mit HNO<sub>3</sub> und NO vor (Gl. 3-57). (Joshi et al. 1985; Park und Lee 1988)



Schwefelspezies

Die Schwefelspezies in Vergasungsprozessen werden überwiegend zu  $\text{H}_2\text{S}$  umgesetzt (ca. 90 %), wobei andere Schwefelverbindungen wie  $\text{COS}$ ,  $\text{CS}_2$  und  $\text{SO}_2$  nur in sehr geringem Maß vorhanden sind (Spliethoff 2010). Für die Vergasung von Holz wurden zwischen 20 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  bis 200 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  sehr niedrige Anteile gemessen (Öhrman et al. 2014; Kremling 2018). Im Gegensatz dazu wurden bei der Vergasung von Kohle bis zu 1,07 %  $\text{H}_2\text{S}$  berichtet (Gong et al. 2014).

**Tabelle 3-3** Typische Größenordnungen für Spurenverunreinigungen  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{COS}$  und  $\text{CH}_4$  in Synthesegasen aus Vergasungsprozessen. Ergänzt nach Benevenuti et al. (2021) und Kremling (2018)

	$X_{\min, .}$		$X_{\max, .}$	
$\text{NH}_3$	171 ppm	(Roll 1994)	4 774 ppm	(Jeremiáš et al. 2014)
$\text{HCN}$	56 ppm	(Roll 1994)	180 ppm	(Kremling 2018)
$\text{NO}_x$	< 50 ppm	(Chen et al. 2009)	1227 ppm	(Tong et al. 2007)
$\text{H}_2\text{S}$	20 ppm	(Öhrman et al. 2014)	10 700 ppm*	(Gong et al. 2014)
$\text{COS}$	131 ppm	(Öhrman et al. 2013)	700 ppm	(Gong et al. 2014)
$\text{CH}_4$	2 000 ppm*	(Pedroso et al. 2005)	106 000 ppm*	(Liakakou et al. 2021)

\* umgerechnet aus Vol-%

Einflüsse auf Mikroorganismen

Die Spurenverunreinigungen können, wenn sie sich im wässrigen Reaktionsmedium lösen, auf Mikroorganismen in einem Synthesegasfermentationsprozess Einfluss nehmen. Die meisten dieser Komponenten wurden nicht in Bezug auf ihren Einfluss auf acetogene Mikroorganismen für die Gasfermentation untersucht. Allerdings sind mit anderen Mikroorganismen oder Enzymen bereits Erkenntnisse gewonnen worden. Eine übersichtliche Zusammenfassung bekannter Effekte, die Verunreinigungen auf verschiedene Mikroorganismen und Enzyme haben, wurde von Benevenuti et al. (2021) und Xu et al. (2011) zusammengestellt. Diese sind mit weiteren Ergebnissen aus der Literatur in Tabelle 3-4 gegenübergestellt.

Sauerstoff stellt für den anaeroben Stoffwechsel eine kritische Komponente dar, da es als Oxidationsmittel das Redoxpotential erhöht. Mehrere Enzyme des reduktiven Acetyl-CoA-Weges (Kapitel 3.1.1) sind oxidationsempfindlich, wobei die Methylen-THF/Methyl-THF Redox-Paar mit -120 mV bis -200 mV je nach Quelle (Vanoni und Matthews 1984; Maden 2000; Müller et al. 2001; Schuchmann und Müller 2014; Thauer et al. 1977) das höchste kritische Redoxpotential aufweist. Daher können schon geringe Konzentra-

tionen von O<sub>2</sub> kritisch für diese Mikroorganismen werden, wenn das Redoxpotential ansteigt (Liu et al. 2013). Für *C. ljungdahlii* konnte jedoch in Satzprozessen im Rührkesselreaktor im Pilotmaßstab mit O<sub>2</sub>-Anteilen von zwischen 400 ppm und 26 000 ppm O<sub>2</sub> keine inhibierenden Effekte beobachtet werden (Kundiyana et al. 2010). In Satzprozessen in geschüttelten Anaerobflaschen konnten für *C. magnum* Konzentrationen von bis zu 1,0 % O<sub>2</sub> im Kopfraum der Anaerobflaschen toleriert werden, wobei sogar Sauerstoff durch die Mikroorganismen aufgenommen wurde (Karnholz et al. 2002).

Für Ammoniak wurde mit *C. ragsdalei* mit 0,37 % NH<sub>3</sub> im Synthesegas verringertes Wachstum und verringerte Hydrogenaseaktivität ermittelt (Xu und Lewis 2012). HCN wirkt stark toxisch auf die meisten Mikroorganismen und bewirkte in geschüttelten Anaerobflaschen mit *C. ljungdahlii* ab Konzentrationen von 0,027 g L<sup>-1</sup> KCN ein stark verringertes Wachstum (Oswald et al. 2018). Für die Stickoxidkomponenten wurde mit NO mit *C. carboxidivorans* keine inhibierende Wirkung mit weniger als 40 ppm NO festgestellt, während 40 ppm NO bis 160 ppm NO im Synthesegas stark inhibierend auf Wachstum und Alkoholproduktion wirkten (Ahmed et al. 2006). Dabei wurde eine reversible Hemmung der Hydrogenasen sowie Hemmung der Alkoholdehydrogenase beobachtet (Ahmed et al. 2006; Gergel und Cederbaum 1996). Höheroxidierte Stickoxidspezies wie NO<sub>2</sub> können in den Mikroorganismen *P. pastoris* und *B. japonicum* die Formiatdehydrogenase und die Nitratreduktase hemmen (Allais et al. 1983; Meakin et al. 2006). Wenn sich Stickoxide in wässrigen Medien lösen, können daraus Nitrat und Nitrit entstehen (Gl. 3-50) bis (Gl. 3-56). Nitrat kann dabei einen alternativen Elektronenakzeptor darstellen (Kapitel 3.1.2) und auf diese Weise das Wachstum von *C. ljungdahlii* fördern (Emerson et al. 2019). Nitrit ist für viele Mikroorganismen toxisch (Bollag und Henninger 1978). Der Mikroorganismus *M. thermoacetica* kann allerdings neben Nitrat auch Nitrit als Elektronenakzeptor nutzen (Seifritz et al. 1993; Fröstl et al. 1996; Seifritz et al. 2003; Arendsen et al. 1999).

Schwefelhaltige Komponenten von Synthesegasen wie insbesondere H<sub>2</sub>S können in *Acremonium sp.* die L-Ascorbatoxidase und Rhodanasen wie die Thiosulfatsulfurtransferase hemmen (Itoh et al. 1995; Picton et al. 2002). In *R. rubrum* ist COS bei Konzentrationen von 4,8 mg L<sup>-1</sup> ein kompetitiver Inhibitor der CO-Dehydrogenase (Hyman et al. 1989). SO<sub>2</sub> kann Ascorbinsäureoxidasen hemmen (Stark et al. 1965; Jaenicke 1965).

Die Verwendung von rohen Synthesegasen mit Rückständen von Teeren mit *C. carboxidivorans* führte dazu, dass die Mikroorganismen metabolisch inaktiv wurden bis sie wieder mit sauberem Synthesegas versorgt wurden (Datar et al. 2004). Der Einbau eines Filters mit 0,025 µm Porengröße in den Synthesegasstrom, um Teere herauszufiltern, verhinderte diesen Effekt mit rohem Synthesegas (Ahmed et al. 2006).

**Tabelle 3-4** Spurenverunreinigungen und deren Effekte auf Mikroorganismen. Ergänzt nach Xu et al. (2011) und Benevenuti et al. (2021)

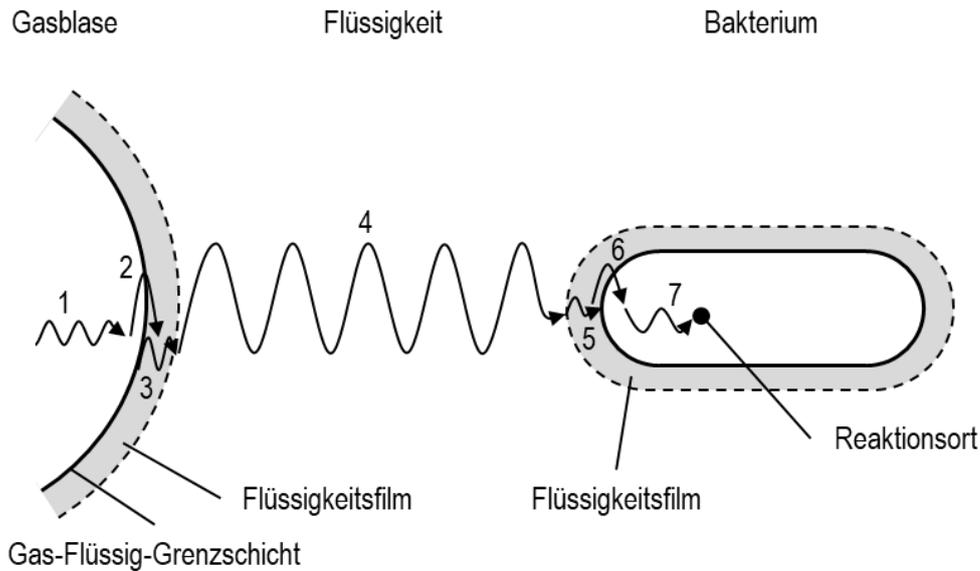
Verunreinigung	Mikroorganismus / Enzym	Konzentration	Effekt	Literatur
O <sub>2</sub>	<i>C. ragsdalei</i>	400 ppm – 26.000 ppm O <sub>2</sub>	Kein negativer Effekt auf Wachstum und Produktbildung	(Kundiya et al. 2010)
	<i>A. woodii</i> / <i>C. magnum</i> / <i>M. thermoacetica</i>	0,2 % O <sub>2</sub> 1,0 % O <sub>2</sub> 0,5 % O <sub>2</sub>	Aufnahme von O <sub>2</sub> und nur leicht verringertes Wachstum	(Karnholz et al. 2002)
	<i>C. ragsdalei</i>	0,37 % NH <sub>3</sub>	Verringerte Hydrogenaseaktivität, und Wachstum	(Xu und Lewis 2012)
NH <sub>3</sub>	<i>C. ragsdalei</i>	0,37 % NH <sub>3</sub>	Verringerte Hydrogenaseaktivität, und Wachstum	(Xu und Lewis 2012)
HCN	<i>C. ljungdahlii</i>	0,027 g L <sup>-1</sup> KCN	Verringertes Wachstum mit Synthesegas und Verschiebung des Produktspektrums	(Oswald et al. 2018)
NO <sub>x</sub>	<i>C. carboxidivorans</i>	160 ppm NO	Reversible Hemmung von Hydrogenasen > 40 ppm NO	(Ahmed et al. 2006)
	Alkoholdehydrogenase	0,03 g L <sup>-1</sup> NO	Hemmung der Alkoholdehydrogenase	(Gergel und Cederbaum 1996)
	<i>P. pastoris</i> ; <i>B. japonicum</i>	1 mol m <sup>-3</sup> NO <sub>2</sub>	Hemmung der Formiatdehydrogenase und Nitratreduktase	(Allais et al. 1983; Meakin et al. 2006)
	<i>C. thermoaceticum</i> / <i>M. thermoacetica</i>	0,35 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> 0,42 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	Nutzung von NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> als Elektronenakzeptor Nutzung von NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> als Elektronenakzeptor, Verringerte Acetatbildung	(Seifritz et al. 2003) (Seifritz et al. 1993; Fröstl et al. 1996)
	<i>C. ljungdahlii</i>	1,27 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	Erhöhtes Wachstum und CO <sub>2</sub> -Aufnahme	(Emerson et al. 2019)
H <sub>2</sub> S	<i>Acremonium</i> sp. Rhodanase		Hemmung von L-Ascorbatoxidase und Thiosulfatsulfurtransferase	(Itoh et al. 1995; Picton et al. 2002)
COS	<i>R. rubrum</i>	4,8 mg L <sup>-1</sup> COS	Kompetitiver Inhibitor der CO-Dehydrogenase	(Hyman et al. 1989)
SO <sub>2</sub>	Ascorbinsäureoxidase		Hemmung der Ascorbinsäureoxidase	(Stark et al. 1965; Jaenicke 1965)
Teer	<i>C. carboxidivorans</i>		Zellen wurden inaktiv bis sauberes Synthesegas zugeführt wurde	(Datar et al. 2004)

### 3.2.3. Gas-Flüssig-Stofftransport

Der Gas-Flüssig-Stofftransport ist von großer Bedeutung für biotechnologische Prozesse, da der Eintrag von Gasen in die Flüssigphase (wässriges Medium) wie in den meisten Prozessen mit Sauerstoff bei hohen Zelldichten den limitierenden Schritt darstellen kann (Chmiel und Walitza 2018). In der Synthesegasfermentation ist der Gaseintrag von besonderer Bedeutung, da das Synthesegas die alleinige Kohlenstoff-, Elektro- und Energiequelle darstellt (Daniell et al. 2012; Bengelsdorf et al. 2018).

Die Löslichkeiten der Hauptkomponenten des Synthesegases unterscheiden sich dabei teilweise stark voneinander. Die Komponenten  $H_2$  und  $CO$  weisen in reinem Wasser bei 1013 mbar und 298,15 K mit  $17,24 \mu\text{mol } CO \text{ mol}^{-1}$  (entspricht  $30,18 \text{ mg L}^{-1}$ ) und  $14,13 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$  (entspricht  $1,78 \text{ mg L}^{-1}$ ) sehr niedrige Löslichkeiten auf (Battino et al. 2011). Die physikalische Löslichkeit von  $CO_2$  ist hingegen mit  $0,61 \text{ mmol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$  (entspricht  $1,68 \text{ g L}^{-1}$ ) in reinem Wasser bei 1013 mbar und 298,15 K deutlich höher (Battino et al. 2011). Zudem ist die tatsächliche Löslichkeit von  $CO_2$  durch die chemische Reaktion zu Hydrogencarbonat  $HCO_3^-$  und Carbonat  $CO_3^{2-}$  in Abhängigkeit des pH noch höher als die reine physikalische Löslichkeit.

Um von den Mikroorganismen aufgenommen zu werden, müssen die Synthesegaskomponenten eine Reihe von Transportwiderständen überwinden (Chmiel und Walitza 2018). Diese sind in Abbildung 3-6 dargestellt. Zunächst muss die Gaskomponente aus dem Kern der Gasphase zur Gas-Flüssig-Grenze transportiert werden. Im Anschluss muss der Phasenübergang über die Gas-Flüssig-Grenzschicht erfolgen. Daraufhin erfolgt der diffusive Transport durch den die Gasblase umgebenden Flüssigkeitsfilm in die Flüssigkeit. Durch die Flüssigkeit müssen die Gaskomponenten konvektiv zu dem das Bakterium umgebenden Flüssigkeitsfilm transportiert werden. Nach dem erneuten diffusiven Transport durch den Flüssigkeitsfilm müssen die Gaskomponenten den Transportwiderstand über die Zellmembran überwinden. Zuletzt müssen die Gaskomponenten im Inneren des Mikroorganismus an den Ort der enzymatischen Reaktion transportiert werden. In dieser Abfolge von Stofftransportvorgängen stellt sehr häufig der Stofftransport-Gas-Flüssig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, was insbesondere für die Synthesegasfermentation eine Herausforderung darstellt (Munasinghe und Khanal 2010).



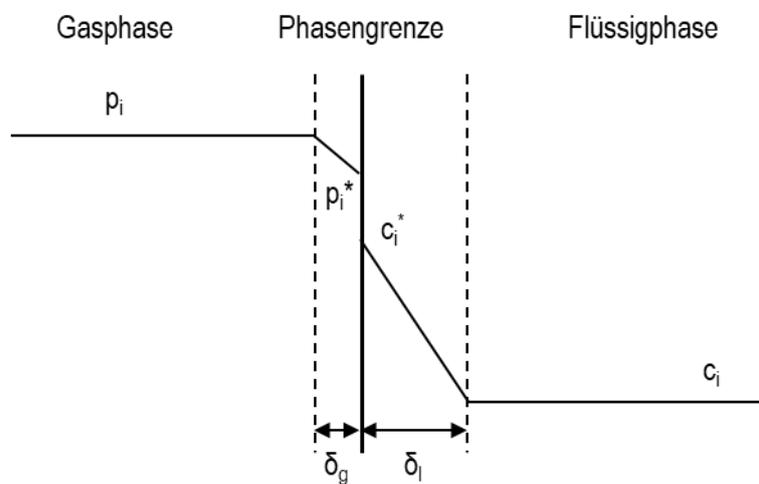
**Abbildung 3-6** Stofftransportwiderstände bei biologischen Prozessen von der Gasblase zum Reaktionsort im Mikroorganismus. Nummern geben die jeweiligen Stofftransportvorgänge an: 1 Stofftransport in der Gasblase zur Phasengrenzfläche; 2 durch die Grenzfläche Gas-Flüssig; 3 in der Grenzschicht Gas-Flüssig; 4 durch Flüssigphase zum Mikroorganismus; 5 in der Grenzschicht Flüssig-Mikroorganismus; 6 durch die Grenzfläche Flüssig-Mikroorganismus; 7 zum Reaktionsort im Mikroorganismus. Abgeändert nach Chmiel und Walitza (2018)

Für die modellhafte Beschreibung des Gas-Flüssig-Stofftransportes wurde eine Reihe von Modellen entwickelt wie unter anderem das Zweifilmmodell, das Oberflächenenerneuerungsmodell oder das Penetrationsmodell (Kraume 2004). Das einfachste und daher häufig verwendete Modell zur Darstellung des Stofftransports stellt das Zweifilmmodell dar. Dieses Modell betrachtet einen stationären Zustand, bei dem sowohl die Gasphase als auch die Flüssigphase homogene Phasen darstellen (Kraume 2004). Zwischen den Phasen findet nur in einer dünnen Schicht mit der Schichtdicke  $\delta_i$  Stofftransport statt, wobei laminare Strömung in der Grenzschicht angenommen wird. Nach dem Zweifilmmodell gilt für die Dicke der Phasengrenzfläche der Zusammenhang (Gl. 3-58) (Kraume 2004):

$$\delta_i \sim \frac{D_{ij}}{k_i} \quad (\text{Gl. 3-58})$$

$\delta_i$	Dicke der Grenzschicht	m
$D_{ij}$	Diffusionskoeffizient der Komponente i in Komponente j	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$k_i$	Stoffübergangskoeffizient	$\text{m s}^{-1}$

Die Verläufe der Partialdrücke und Konzentrationen nach dem Zweifilmmodell sind in Abbildung 3-7 dargestellt.



**Abbildung 3-7** Konzentrationen und Partialdrücke an der Gas-Flüssig-Phasengrenzfläche nach dem Zweifilmmodell. (Kraume 2004)

Der Zusammenhang zwischen den Gleichgewichtskonzentrationen an der Phasengrenzfläche kann mit dem Henry-Gesetz beschrieben werden (Gl. 3-59). Dieses stellt einen linearen Zusammenhang zwischen dem Partialdruck  $p_i$  der Komponente i in der Gasphase und der Konzentration  $c_i$  der Komponente i in der Flüssigphase her. Das Henry-Gesetz gilt für niedrige Gesamtdrücke und für den Zustand unendlicher Verdünnung der Komponente i (Henry 1803). Henry-Konstanten sind für eine große Zahl von Gasen ermittelt und tabelliert worden (Sander 2015).

$$c_i^* = He_i(T) \cdot p_i^* \quad (\text{Gl. 3-59})$$

$c_i^*$	Gleichgewichtskonzentration der Komponente i	$\text{g L}^{-1}$
$He_i(T)$	Temperaturabhängige Henry-Konstante der Komponente i	$\text{g L}^{-1} \text{bar}^{-1}$
$p_i^*$	Gleichgewichtspartialdruck der Komponente i	bar

Die Diffusionskoeffizienten sind in der Regel in der Gasphase sehr viel größer als in der Flüssigphase, sodass die gaseitige Grenzschicht sehr dünn wird (Gl. 3-58) und sich der Gesamtstofftransportwiderstand nach dem Zweifilmmodell vereinfacht und der Gesamtstofftransportkoeffizient  $k$  identisch zum flüssigkeitsseitigen Stoffübergangskoeffizienten  $k_l$  wird (Chmiel und Walitza 2018). Die Stofftransportrate der Komponente i kann dann mit dem volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten  $k_a$  und dem treibenden Konzentrationsgefälle  $\Delta c_g$  zwischen der Konzentration in der Kernströmung und der Gleichgewichtskonzentration berechnet werden (Gl. 3-60).

$$\frac{dc_i}{dt} = k_l a \cdot (c_g^* - c_g) \quad (\text{Gl. 3-60})$$

$c_g^*$	Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigphase	$\text{g L}^{-1}$
$c_g$	Gelöstkonzentration in der Kernströmung der Flüssigphase	$\text{g L}^{-1}$
$k_l$	Flüssigseitiger Stoffübergangskoeffizient	$\text{m s}^{-1}$
$a$	Spezifische Oberfläche der Gasblasen	$\text{m}^{-1}$

Ein hoher Gas-Flüssig-Stofftransport kann somit durch eine Erhöhung des  $k_a$  oder des treibenden Konzentrationsgefälles erreicht werden. Der  $k_a$  kann beispielsweise durch die Erzeugung kleinerer Gasblasen (mit höherer spezifischer Oberfläche  $a$ ) erzielt werden. Um in Bioreaktoren einen hohen Gas-Flüssig-Stofftransport zu erreichen, kann in Rührreaktoren durch den hohen volumetrischen Leistungseintrag der  $k_a$  erhöht werden (Hass und Pörtner 2011; Chmiel und Weuster-Botz 2018).

Für biotechnologische Prozesse mit geringer Wertschöpfung kommen aufgrund der hohen Kosten für den Leistungseintrag statt Rührkesselreaktoren häufig Blasensäulenreaktoren zur Anwendung (Daniell et al. 2012; Riegler et al. 2019b; Chmiel und Weuster-Botz 2018; Weuster-Botz 2022). Durch die Höhe der Flüssigkeitssäule erhöht sich der Druck am unteren Ende der Blasensäule. Dieser berechnet sich nach der barometrischen Höhenformel (Gl. 3-61):

$$p(h) = \rho \cdot g \cdot h + p_0 \quad (\text{Gl. 3-61})$$

$p$	Gesamtdruck	bar
$\rho$	Dichte	kg m <sup>-3</sup>
$g$	Erdbeschleunigung	m s <sup>-2</sup>
$h$	Höhe der Flüssigkeitssäule	m
$p_0$	Umgebungsdruck	bar

Durch den höheren Gesamtdruck folgen höhere Partialdrücke der Gaskomponenten und somit gemäß dem Henry Gesetz (Gl. 3-59) eine höhere Löslichkeit der Gaskomponenten, die das treibende Konzentrationsgefälle für den Gas-Flüssig-Stofftransport erhöhen (Gl. 3-60). Für den Partialdruck der Komponente  $i$  in Abhängigkeit des Gasphasenanteils  $y_i$  gilt das Gesetz von Dalton (Gl. 3-62):

$$p_i = y_i \cdot p \quad (\text{Gl. 3-62})$$

$$p = \sum p_i \quad (\text{Gl. 3-63})$$

$$1 = \sum y_i \quad (\text{Gl. 3-64})$$

$p_i$	Partialdruck der Komponente $i$	bar
$y_i$	Gasphasenanteil der Komponente $i$	mol mol <sup>-1</sup>
$p$	Gesamtdruck	bar

### 3.3. Bioprozesstechnische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die notwendigen Grundlagen für die Beschreibung von Bioreaktoren beschrieben. Dabei werden im Einzelnen die formalkinetischen Ansätze zur Beschreibung von Wachstum und Produktbildung, sowie die Bilanzierung von Satzprozessen und kontinuierlichen Prozessen im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor beschrieben. Wenn nicht anders angegeben werden die Grundlagen anhand von Chmiel et al. (2018) beschrieben.

### 3.3.1. Formalkinetische Ansätze zur Beschreibung von Wachstum und Produktbildung

Die formalkinetische Beschreibung von Wachstum und Produktbildung von Mikroorganismen erfolgt unter der Annahme eines unstrukturierten, unsegregierten Modells (Weuster-Botz und Takors 2018). Dabei wird die spezifische Wachstumsrate der Mikroorganismen unter nicht-limitierenden Bedingungen definiert als (Gl. 3-65):

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (\text{Gl. 3-65})$$

$\mu$	Spezifische Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$c_X$	Biomassekonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$t$	Zeit	$\text{h}$

In der Praxis wird das bakterielle Wachstum meist von einer limitierenden Nährstoffquelle (zum Beispiel einer Kohlenstoffquelle) limitiert. Somit wird die Wachstumsrate abhängig von der Konzentration des limitierenden Substrats. Die Wachstumsrate lässt sich nach Monod (1942) als Funktion der Substratkonzentration  $c_S$  mit den formalkinetischen Parametern der maximalen spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max}$  und der Halbsättigungskonzentration  $K_S$  darstellen:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad (\text{Gl. 3-66})$$

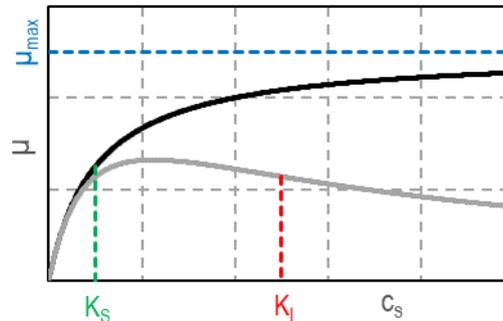
$\mu_{max}$	Maximale spezifische Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$K_S$	Halbsättigungskonzentration	$\text{g L}^{-1}$

Für Mikroorganismen mit einer vorhandenen Substratüberschussinhibierung lässt sich die spezifische Wachstumsrate als Funktion der Substratkonzentration nach Andrews (1968) unter Einführung der Inhibierungskonstante  $K_I$  wie folgt beschreiben (Gl. 3-67):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad (\text{Gl. 3-67})$$

$K_I$	Inhibierungskonstante	$\text{g L}^{-1}$
-------	-----------------------	-------------------

Die Verläufe der spezifischen Wachstumsrate als Funktion der Substratkonzentration nach den Modellen von Monod (1942) und Andrews (1968) sind in Abbildung 3-8 gezeigt.



**Abbildung 3-8** Formalkinetische Modelle der Wachstumskinetik nach Monod (1942) (schwarz) und Andrews (1968) (hellgrau) mit den formalkinetischen Parametern  $\mu_{\max}$  (blau),  $K_S$  (grün) und  $K_I$  (rot).

Die volumetrische Substrataufnahmerate  $Q_S$  ist die Änderungsrate der Substratkonzentration nach der Zeit (Gl. 3-68). Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  ist definiert als die volumetrische Substrataufnahmerate geteilt durch die Biomassekonzentration  $c_x$  (Gl. 3-69):

$$Q_S = \frac{dc_S}{dt} \quad (\text{Gl. 3-68})$$

$$q_S = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad (\text{Gl. 3-69})$$

$Q_S$	Volumetrische Substrataufnahmerate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_S$	Spezifische Substrataufnahmerate	$\text{h}^{-1}$

In analoger Weise sind die volumetrische Produktbildungsrate  $Q_P$  und die spezifische Produktbildungsrate  $q_P$  wie folgt definiert (Gl. 3-70) und (Gl. 3-71):

$$Q_P = \frac{dc_P}{dt} \quad (\text{Gl. 3-70})$$

$$q_P = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (\text{Gl. 3-71})$$

$Q_P$	Volumetrische Produktbildungsrate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_P$	Spezifische Produktbildungsrate	$\text{h}^{-1}$

Die Ertragskoeffizienten  $Y_{i/j}$  sind das Verhältnis der jeweiligen Raten für die Komponente i und die Komponente j:

$$Y_{i/j} = \frac{dc_i}{dc_j} = \frac{Q_i}{Q_j} = \frac{q_i}{q_j} \quad (\text{Gl. 3-72})$$

$Y_{i/j}$	Ausbeutekoeffizient der Komponente i bezogen auf j	$\text{g g}^{-1}$
-----------	--	-------------------

### 3.3.2. Bilanzierung von Satzprozessen in Rührkesselreaktoren

Rührkesselreaktoren stellen eine der häufigsten Bauformen von Bioreaktoren dar und zeichnen sich durch einen hohen volumetrischen Leistungseintrag und somit hohe Durchmischung mit kurzen Mischzeiten und gutem Gas-Flüssig-Stofftransport aus (Chmiel und Weuster-Botz 2018). Der ideale Rührkesselreaktor wird aufgrund der sehr hohen Durchmischung des Reaktionsmediums als isotrop, isotherm und isobar angenommen. Aus der allgemeinen Stoffbilanz für den idealen Rührkesselreaktor (Gl. 3-73) ergibt sich für Satzprozesse durch Vereinfachung des Konvektionsterms die Änderungsrate der Konzentrationen nur aus dem Reaktionsterm (Gl. 3-74) (Weuster-Botz und Takors 2018):

$$\frac{dc_i}{dt} \cdot V_R = \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} - \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (\text{Gl. 3-73})$$

$$\text{mit } \dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} = 0$$

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (\text{Gl. 3-74})$$

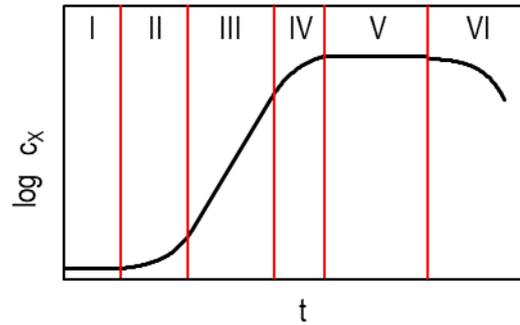
$c_i$	Konzentration der Komponente i	$\text{g L}^{-1}$
$V_R$	Reaktionsvolumen	L
$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf	$\text{g L}^{-1}$
$\dot{V}_{aus}$	Zulaufvolumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf	$\text{g L}^{-1}$
$\dot{V}_{ein}$	Ablaufvolumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$r_i$	Reaktionsrate der Komponente i	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Für die Biomassekonzentration ergibt sich durch Integration über die Zeit folgender Zusammenhang in der exponentiellen Wachstumsphase, wenn ausreichend Substrat vorliegt, sodass die Wachstumsrate maximal wird (Gl. 3-75):

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (\text{Gl. 3-75})$$

$c_{X,0}$	Anfangsbiomassekonzentration	$\text{g L}^{-1}$
-----------	------------------------------	-------------------

In einem Satzprozess ergeben sich aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Substrates sechs charakteristische Wachstumsphasen, welche in Abbildung 3-9 dargestellt sind (Monod 1942). In der ersten Phase des Wachstums, der Verzögerungsphase, kommt es zu einer Adaption der Mikroorganismen an das Kultivierungsmedium. Dabei ist die Wachstumsrate gleich Null und die Biomassekonzentration bleibt konstant. Darauf folgt die erste Übergangsphase, in welcher die Wachstumsrate ansteigt. Darauf folgt die exponentielle Phase, in der unlimitiertes Wachstum stattfindet und somit die Wachstumsrate ihr Maximum erreicht und dort konstant bleibt. Sobald die Substratkonzentration im Medium so weit sinkt, dass sie limitierend wird, beginnt die zweite Übergangsphase, in der die Wachstumsrate sinkt. Sobald die Wachstumsrate auf Null sinkt, beginnt die stationäre Phase, in der die Biomassekonzentration konstant bleibt. Zuletzt kann es dazu kommen, dass die Wachstumsrate weiter absinkt und negativ wird. In der Folge kommt es zu einem Absinken der Biomassekonzentration in der Absterbephase.



**Abbildung 3-9** Logarithmische Darstellung der Biomassekonzentration als Funktion der Zeit für die Wachstumsphasen beim Wachstum von Mikroorganismen im Satzprozess mit der Verzögerungsphase (I), 1. Übergangsphase (II), Exponentielle Phase (III), 2. Übergangsphase (IV), stationäre Phase (V), Absterbephase (VI).

### 3.3.3. Bilanzierung kontinuierlicher Prozesse in Rührkesselreaktoren

In kontinuierlichen Prozessen findet eine konstante Zufuhr von frischem Reaktionsmedium und eine Abfuhr von verbrauchtem Reaktionsmedium aus dem Reaktor statt (Weuster-Botz und Takors 2018). Aus den Annahmen eines idealen Rührkesselreaktors (Kapitel 3.3.2) ergibt sich somit, dass die Zusammensetzung des Reaktionsmediums im Reaktor zu jedem Zeitpunkt gleich der Zusammensetzung im Ablaufstrom ist. Wenn ein kontinuierlicher Prozess ausreichend lange betrieben wird, stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, sodass alle Konzentrationen im Reaktor zeitlich konstant bleiben. Aus der Verweilzeitverhalten des idealen kontinuierlichen Rührkesselreaktors ergibt sich, dass nach einer Zeit von etwa 5 hydraulischen Verweilzeiten mehr als 99,9 % des Reaktorinhalts ausgetauscht wurden (Levenspiel 2007; Müller-Erlwein 2015). Wenn in einem kontinuierlichen Rührkesselreaktor alle Konzentrationen für mindestens 5 hydraulische Verweilzeiten  $\tau$  konstant bleiben, kann von einem erreichten Fließgleichgewichtszustand ausgegangen werden.

Für den idealen kontinuierlichen Rührkesselreaktor sind der eintretende Volumenstrom und der den Reaktor verlassende Volumenstrom identisch ( $\dot{V}_{aus} = \dot{V}_{ein} = \dot{V}_{flüssig}$ ). Bei kontinuierlicher Prozessführung in einem Rührkesselreaktor ist anders als im Satzprozess der Konvektionsterm nicht gleich Null. Im kontinuierlichen idealen Rührkesselreaktor sind alle Konzentrationen stationär und homogen. Somit ergibt sich aus der allgemeinen Stoffbilanz (Gl. 3-73) die Zusammenhänge (Gl. 3-76) bis (Gl. 3-79):

$$\frac{dc_i}{dt} \cdot V_R = \dot{V}_{flüssig} \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) + r_i \cdot V_R = 0 \quad (\text{Gl. 3-76})$$

$$\text{mit } D = \frac{\dot{V}_{flüssig}}{V_R} = \frac{1}{\tau} \quad (\text{Gl. 3-77})$$

$$\frac{dc_i}{dt} = D \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) + r_i = 0 \quad (\text{Gl. 3-78})$$

$$r_i = D \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) \quad (\text{Gl. 3-79})$$

$D$	Durchflussrate	$\text{h}^{-1}$
$\tau$	Hydraulische Verweilzeit	$\text{h}$
$\dot{V}_{flüssig}$	Flüssigkeitsvolumenstrom	$\text{L h}^{-1}$

Unter der Annahme eines sterilen Zulaufmediums mit  $c_{X,ein} = 0$  vereinfacht sich (Gl. 3-79) zu  $\mu = D$  im Zustand des Fließgleichgewichts, sodass die spezifische Wachstumsrate gleich der Durchflussrate ist.

Somit lässt sich in einem kontinuierlichen Prozess im Rührkesselreaktor ohne Zellrückhaltung (Betrieb als so genannter Chemostat) die Wachstumsrate über die Durchflussrate einstellen. Die maximale Durchflussrate ist dabei durch das maximale Wachstum der Mikroorganismen begrenzt, da für  $D > \mu_{\max}$  die Mikroorganismen aus dem Bioreaktor ausgewaschen werden (Chmiel und Weuster-Botz 2018).

Die Raum-Zeit-Ausbeute im Fließgleichgewicht ergibt sich im kontinuierlichen Rührkesselreaktor als Produkt aus Durchflussrate und Produktkonzentration im Reaktor im Fließgleichgewicht (Gl. 3-80):

$$RZA = D \cdot c_{i,aus} \quad (\text{Gl. 3-80})$$

$RZA$	Raum-Zeit-Ausbeute	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
-------	--------------------	---------------------------------

Die Raum-Zeit-Ausbeute im kontinuierlichen Rührkesselreaktor ist eine Funktion der Durchflussrate. Die Durchflussrate, bei der das Maximum der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht wird, wird als optimale Durchflussrate  $D_{\text{opt}}$  definiert. Wenn die formalkinetischen Parameter bekannt sind, berechnet sich diese wie folgt (Gl. 3-81) (Weuster-Botz und Takors 2018):

$$D_{opt} = \mu_{max} \cdot \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + c_{S,0}}} \right) \quad (\text{Gl. 3-81})$$

$D_{opt}$       Optimale Durchflussrate       $\text{h}^{-1}$

Da bei vielen Mikroorganismen die formalkinetischen Parameter nicht einfach zugänglich sind, kann die optimale Durchflussrate vereinfacht abgeschätzt werden (Gl. 3-82):

$$D_{opt} \approx \frac{2}{3} \cdot \mu_{max} \quad (\text{Gl. 3-82})$$

Die kontinuierliche Prozessführung im Rührkesselreaktor kann auf verschiedene Weisen weiterentwickelt werden. Dabei sind unter anderem kontinuierliche Rührkesselkaskaden (Doll et al. 2018; Abubackar et al. 2018) oder Prozesse als kontinuierlicher Membranbioreaktor mit Zellrückhaltung durch eine getauchte Membran (Kantzow et al. 2015; Mayer et al. 2018) etabliert. Die Prozessführung in einer Rührkesselkaskade liefert dabei den Vorteil der räumlichen Entkopplung verschiedener Reaktionsparameter wie beispielsweise Reaktionsvolumen (und somit Verweilzeit), pH oder Temperatur (Doll 2018; Doll et al. 2018). Somit wird ermöglicht, ideale Wachstumsbedingungen von notwendigen Bedingungen für Neben- oder Zusatzreaktionen räumlich voneinander zu trennen (Storhas 1994). Die Nutzung einer getauchten Membran zur Zellrückhaltung im kontinuierlichen Membranbioreaktor hingegen ermöglicht die Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Reaktionsmedium im Bioreaktor (Syldatk et al. 2018). Somit können Durchflussraten eingestellt werden, die die maximale spezifische Wachstumsrate überschreiten ( $D > \mu_{max}$ ). Die Limitierung der Durchflussrate mit einem optimalen Durchflussrate (Gl. 3-82) entfällt somit.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1. Anaerobes Arbeiten

Um die anaerobe Handhabung von Medien und Zusätzen zu ermöglichen, wurde eine Handschuhbox (Toepffer Lab Systems, Göppingen, Deutschland) mit einer sauerstofffreien Atmosphäre als Anaerobarbeitsbank eingesetzt. Als reduzierendes Schutzgas diente Formiergas (Arcal F5, AirLiquide Germany, Düsseldorf, Deutschland) mit einer Zusammensetzung von 95 % N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub>. Die Handschuhbox ist mit einer großen und einer kleinen Schleuse ausgestattet, um den Transfer von Geräten und Medien in den Innenraum zu ermöglichen, ohne das Eindringen von Sauerstoff zuzulassen. Hierzu wird die Schleuse mit einer Vakuumpumpe mindestens dreimal von Atmosphärendruck auf 0,3 bar evakuiert und anschließend wieder mit Formiergas auf Atmosphärendruck aufgefüllt. Daraufhin können die Geräte und Medien ins Innere der Anaerobarbeitsbank transferiert werden. Im Inneren der Anaerobarbeitsbank befindet sich ein Detektor für die Messung des Wasserstoffgehalts in % und des Sauerstoffgehalts in ppm. Um potentiell ins Innere eingedrungenen Sauerstoff zu entfernen, sind zudem zwei Katalysatorboxen mit jeweils einem Element mit Palladiumkatalysator und einem Element mit Silicagel ausgestattet (StakPak mit Catalyst und Dessicant, Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA). An dem Palladiumkatalysator kann möglicherweise eingedrungener Sauerstoff mit dem vorhandenen Wasserstoff zu Wasser abreagieren und anschließend die entstehende Feuchtigkeit am Silicagel gebunden werden. Die Katalysatorboxen wälzen dabei den Innenraum der Anaerobarbeitsbank durch jeweils zwei elektrische Ventilatoren über den Katalysator um. Der Katalysator und das Silicagel werden regelmäßig, spätestens sobald die relative Luftfeuchtigkeit im Innenraum der Anaerobarbeitsbank über 40 % steigt, ausgeschleust und in einem Trockenofen bei 170 °C für mindestens 12 h regeneriert. Anschließend werden die abgekühlten Module wieder eingeschleust und eingebaut.

### 4.2. Herstellung anaerober Medien

Das in dieser Arbeit verwendete Grundmedium war in seiner Zusammensetzung identisch zum bereits beschriebenen Medium nach Doll et al. (2018). Die Zusammensetzung des Mediums aus den Vorratslösungen ist in Tabelle 4-1 gezeigt. Die detaillierte Zusammensetzung der Vorratslösungen von Mineralstoffen, Calcium, Magnesium,

Spurenelementen und Vitaminen kann dem Anhang entnommen werden (siehe Anhang Kapitel 10.1; Tabelle 10-1 bis Tabelle 10-5).

**Tabelle 4-1** Zusammensetzung des Mediums nach Doll et al. (2018) mit den Vorratslösungen (siehe Anhang Kapitel 10.1) pro 1 Liter Medium

Komponente	Menge pro Liter Medium
Mineralstofflösung	30 mL L <sup>-1</sup>
Ca-Lösung	60 mL L <sup>-1</sup>
Mg-Lösung	60 mL L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	10 mL L <sup>-1</sup>
Vitaminlösung	10 mL L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	1,0 g L <sup>-1</sup>
Cys-HCl <sup>a)</sup>	0,4 g L <sup>-1</sup>
MES <sup>b)</sup>	15 g L <sup>-1</sup>

<sup>a)</sup> Für alle Prozesse im Rührkesselreaktor und für Vorkulturen mit *C. autoethanogenum*

<sup>b)</sup> Nur für Medium in Anaerobflaschen für Vorkulturen und für autotrophe Satzprozesse in geschüttelten Anaerobflaschen

Für die Herstellung von Medien für anaerobe Vorkulturen und Kulturen in geschüttelten Anaerobflaschen wurden die Medienbestandteile Mineralstoff-, Calcium-, Magnesium-, Spurenelement- und Vitaminlösung mit Hefeextrakt und 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) gemischt und mit VE-Wasser auf 2 L aufgefüllt. Der pH des Mediums wurde mit NaOH-Plätzchen auf pH 6,1 eingestellt. Anschließend wurde das Medium zur Anaerobisierung in einen 2 L-Rundkolben transferiert und im Heizpilz zum Sieden erhitzt. Das Medium wurde für 20 min siedend gehalten, um gelösten Sauerstoff auszutreiben, und anschließend aus dem Rundkolben in eine 2 L-Flasche gefüllt, welche sofort im Eiswasserbad gekühlt und dabei für 20 min mit Stickstoff begast wurde. Daraufhin wurde die Begasung beendet und die Flasche sofort dicht mit einem Schraubdeckel mit PTFE-Dichtung verschlossen. Das Medium wurde daraufhin in die Anaerobarbeitsbank eingeschleust und zu jeweils 100 mL in beschichtete 250 mL- (für Vorkulturen) oder 500 mL-Anaerobflaschen (für autotrophe Satzprozesse) aliquotiert. Alle Anaerobflaschen wurden mit Butylgummiseptum und Lochkappe verschlossen und anschließend im Dampfautoklaven für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Bis zu Benutzung wurden die Medienflaschen bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

### 4.3. Kryo-Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden mit dem beschriebenen Medium aus Kapitel 4.2 eine Vorkultur hergestellt. Die Mikroorganismen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als gefriergetrocknete Stämme erworben und gemäß der Vorgaben der DSMZ reaktiviert. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismenstämme *C. carboxidivorans* P7 (DSM 15243) und *C. autoethanogenum* JA 1-1 (DSM 10061) wurden hierzu zunächst in sterilen anaeroben Probenröhrchen (16 x 125 mm Hungate-tubes, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland) mit 5 mL Medium (Kapitel 4.2) mit jeweils 0,4 g L<sup>-1</sup> Cystein-Hydrochlorid und 5 g L<sup>-1</sup> Glucose (*C. carboxidivorans*) oder 5 g L<sup>-1</sup> Xylose (*C. autoethanogenum*) bei 37 °C inkubiert bis nach mehreren Tagen Wachstum erkennbar war.

Daraufhin wurden zu 100 mL Medium in beschichteten Anaerobflaschen über sterile Einwegspritzen und -kanülen 5 g L<sup>-1</sup> Glucose (*C. carboxidivorans*) oder 10 g L<sup>-1</sup> Xylose und 0,4 g L<sup>-1</sup> Cystein-HCl für (*C. autoethanogenum*) sowie 2,5 mL des Inhalts der Kulturröhrchen zugegeben und die Flaschen für mindestens 24 h (*C. carboxidivorans*) bzw. 84 h (*C. autoethanogenum*) bei 37 °C und 100 min<sup>-1</sup> im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kulturen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 (gemessen in Halbmikroküvetten im Spektrophotometer (Genesys 10S UV/VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm) mit einer 80 % Glycerinlösung auf eine finale Konzentration von 10 % Glycerin eingestellt. Die mit Glycerin versetzten Kulturen wurden zu jeweils 5 mL in dampfsterilisierte Hungate-Röhrchen (16 x 125 mm Hungate-tubes, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland) aliquotiert und mit einem ebenfalls dampfsterilisierten, passenden sterilen Butylgummiseptum und einer Lochkappe verschlossen. Anschließend wurden die Röhrchen ausgeschleust und in einer Gefriertruhe bei -80 °C stehend eingefroren und anschließend gelagert. Die so konservierten Mikroorganismen wurden für alle Prozesse in dieser Arbeit frisch aufgetaut und in Vorkulturen in Anaerobflaschen kultiviert.

### 4.4. Kultivierungen in geschüttelten Anaerobflaschen

In diesem Kapitel wird das Vorgehen bei der Kultivierung von acetogenen Mikroorganismen in geschüttelten Anaerobflaschen für heterotrophe Vorkulturen und für autotrophe Satzprozesse in geschüttelten Anaerobflaschen beschrieben.

#### 4.4.1. Heterotrophe Vorkulturen

Medium für Vorkulturen wurde wie in Kapitel 4.2 beschrieben hergestellt. Für Vorkulturen von *C. carboxidivorans* wurden jeder Flasche  $5 \text{ g L}^{-1}$  Glucose über sterile Einwegspritzen und -kanülen zugegeben. Danach wurden 2,5 mL einer kryokonservierten Kultur (siehe Kapitel 4.3) zugegeben und die Anaerobflaschen wurden für 22 h bei  $37 \text{ °C}$  und  $100 \text{ min}^{-1}$  im Schüttelinkubator (WIS-20, Witeg, Wertheim, Deutschland) inkubiert. Für Vorkulturen von *C. autoethanogenum* wurden Anaerobflaschen mit dem Kulturmedium in einem zweistufigen Verfahren zunächst mit  $5 \text{ g L}^{-1}$  Xylose über sterile Einwegspritzen und -kanülen versetzt und anschließend 5 mL einer kryokonservierten Kultur (siehe Kapitel 4.3) zugegeben. Die Anaerobflaschen wurden daraufhin für mindestens 60 h bei  $37 \text{ °C}$  und  $100 \text{ min}^{-1}$  im Schüttelinkubator (WIS-20, Witeg, Wertheim, Deutschland) inkubiert. Von der ersten Vorkultur von *C. autoethanogenum* wurden jeweils 10 mL in neue Anaerobflaschen mit frischem Medium mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Xylose und  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  Cystein-Hydrochlorid transferiert. Diese wurden für 22 h bei  $37 \text{ °C}$  und  $100 \text{ min}^{-1}$  inkubiert (WIS-20, Witeg, Wertheim, Deutschland).

Für beide Mikroorganismen wurden die Vorkulturen auf diese Weise am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit einer  $\text{OD}_{600}$  zwischen 0,7 und 1,0 so viele Flaschen geerntet wie für die Inokulation des Reaktors benötigt werden. Hierfür wurden die Anaerobflaschen in die Anaerobarbeitsbank eingeschleust und auf vorbereitete anaerobe 50 mL Zentrifugenröhrchen verteilt. Diese wurden ausgeschleust und in einer Laborzentrifuge (Rotixa 50RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei  $4500 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert. Die abzentrifugierten Röhrchen wurden erneut in die Anaerobarbeitsbank eingeschleust und dort der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit vorbereiteten 10 mL anaerobem Phosphatpuffer (PBS, siehe Anhang Tabelle 10-6) resuspendiert und mit einer sterilen Einwegspritze und -kanüle aufgenommen. Es wurden zur Inokulation des Rührkesselreaktors jeweils so viel vom Inokulum zugegeben, dass eine Anfangsbiotrockenmassekonzentration von  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  BTM erreicht wurde. Für Kulturen in Anaerobflaschen wurde jeweils jede Flasche mit einer Anfangsbiotrockenmassekonzentration von  $0,025 \text{ g L}^{-1}$  BTM inokuliert.

#### 4.4.2. Autotrophe Kulturen in geschüttelten Anaerobflaschen

Für autotrophe Kulturen in geschüttelten Anaerobflaschen wurde Medium gemäß des Vorgehens aus Kapitel 4.2 hergestellt und jeweils zu 100 mL in beschichtete 500 mL-Anaerobflaschen aliquotiert und anschließend dampfsterilisiert. Die Flaschen wurden

dann mit der gewünschten Gasmischung von CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> über eine Gasmischstation aus 4 thermischen Massendurchflussreglern (P-702CV-6K0R-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Switzerland) begast. Hierzu wurden an die zu begasende Flasche jeweils durch das Butylgummiseptum mit Sterilfiltern und sterilen Einwegkanülen eine Leitung zur Begasung, eine Leitung für Abgas und eine Leitung mit einem Druckmanometer angeschlossen. Die Flaschen wurden zunächst für 5 min mit der Gasmischung mit 25 L h<sup>-1</sup> gespült und anschließend durch Herausziehen der Abgaskanüle Druck in der Flasche bis 2 bar aufgebaut. Anschließend wurde die Kanüle der Abgasleitung wieder eingestochen, sodass der Druck wieder bis 1,1 bar absank. Dieser Vorgang wurde insgesamt zwei weitere Male durchgeführt, sodass insgesamt dreimal Druck in der Flasche aufgebaut wurde. Beim letzten Druckaufbau wurde statt den Druck wieder abzulassen die Gaszufuhr abgeschaltet, sodass die Flaschen mit dem Gesamtdruck von 2 bar für autotrophe Kulturen genutzt werden konnten.

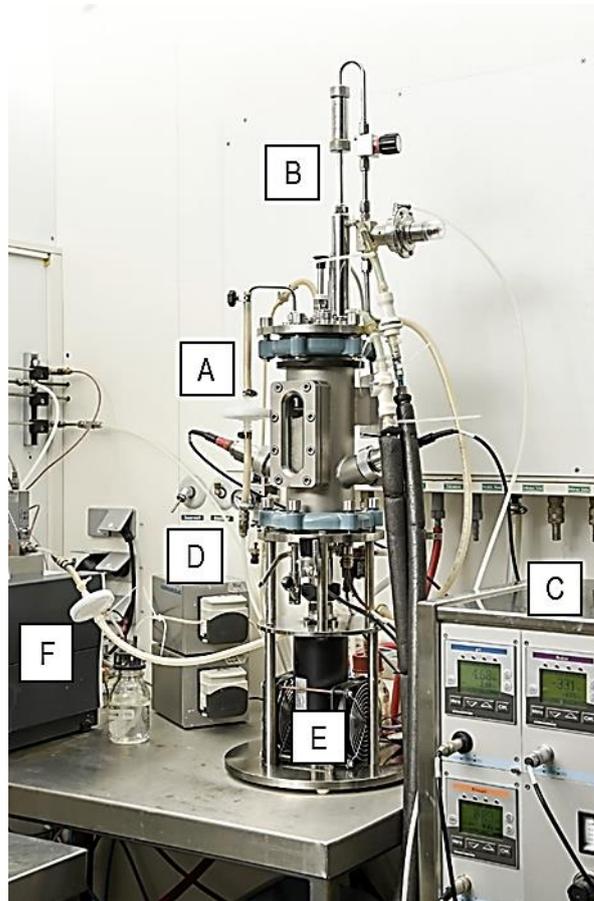
## **4.5. Gasfermentationsprozesse im Rührkesselreaktor im Litermaßstab**

### **4.5.1. Satzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor**

Der Bioreaktor für alle Satzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor war ein Labormaßstabsreaktor KLF2000 der Firma BioEngineering (KLF2000, BioEngineering, Wald, Schweiz) mit einem Nennvolumen von 2 L und einem maximalen Arbeitsvolumen von 1,5 L. Gearbeitet wurde in dieser Arbeit stets mit einem Arbeitsvolumen von 1 L. Der Reaktor verfügt über einen Sockel, auf dem die ebene Bodenplatte sitzt. In dieser ist der Rührmotor unterhalb des Reaktors angebracht. Die Bodenplatte verfügt über einen Probenahmehahn und drei Durchführungen für eine Temperatursonde, einen elektrischen Heizstab und einen Kühlwasserstab. Durch den Reaktorboden ist die Rührwelle mit einer Gleitringdichtung geführt, auf der zwei 6-Blatt-Scheibenrührer (Rushton Turbinen) sitzen.

Auf der Bodenplatte befindet sich mit einer Flanschverbindung der Edelstahlmantel mit einem Schauglas und vier Kragenstützen mit Durchführungen für Sonden, in welchen eine pH-Sonde und eine Redoxpotentialsonde eingebaut wurden. Die pH-Sonde wurde vor jedem Prozess bei 37 °C bei pH 4,0 und pH 7,0 kalibriert und seitlich eingebaut. Die Redoxpotentialsonde wurde bei Raumtemperatur bei 220 mV und 468 mV kalibriert und

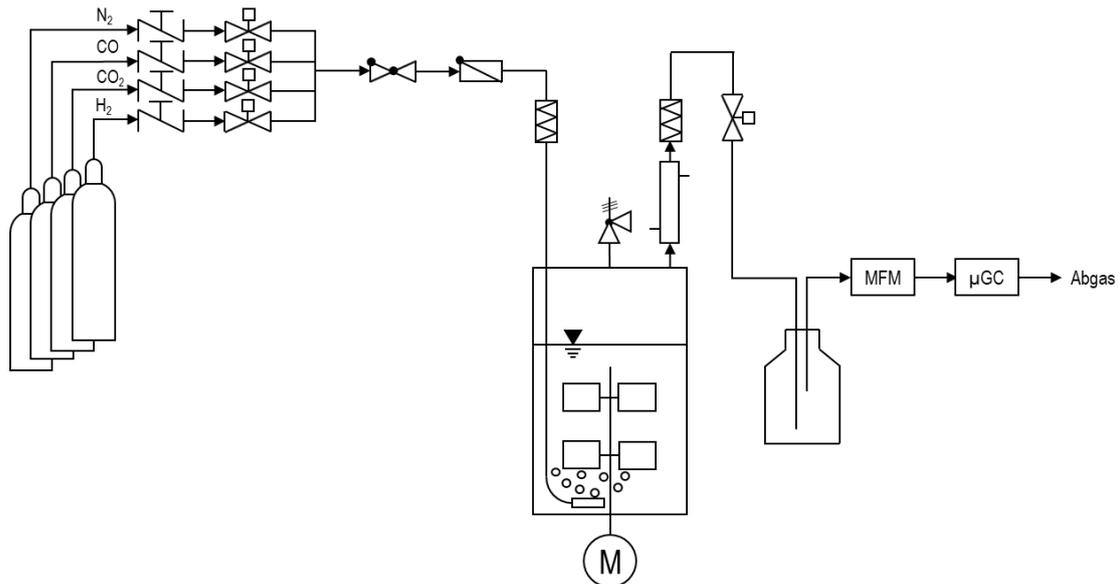
danach in den Reaktor eingebaut. Die verbliebenen zwei Durchführungen wurden mit Blindstutzen verschlossen. Im Inneren des Reaktors wurde ein Modul mit vier Strömungsbrechern mit dem Leitrohr für die Begasung eingebaut. Am Ende des Gasleitrohrs war unterhalb des unteren 6-Blatt-Scheibenrührers eine Sintermetallfritte zur Begasung angebracht.



**Abbildung 4-1** Darstellung des verwendeten Rührkesselreaktors für Synthesegasfermentationsprozesse bestehend aus Begasungsstrecke mit Sterilfilter (A), Abgasstrecke mit Gegenstromkühler, Abgasfilter und Druckregelventilen (B), Steuergerät mit Reglern für pH, Redoxpotential, Temperatur, Druck und Rührerdrehzahl (C), Säure- und Basepumpe zur pH-Regelung (D), Rührermotor (E) und Abgasanalytik durch Massendurchflussmessung und  $\mu\text{GC}$  (F). Abgeändert nach Doll (2018)

Am oberen Ende des Mantels ist mit einer Flanschverbindung der Reaktordeckel verbunden. Dieser verfügt über Durchführungen, in welche ein Sicherheitsventil, eine Drucksonde, die Gaszuleitung, jeweils eine Durchführung für die pH-Korrekturmittel Säure (1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und Base (3 M  $\text{NaOH}$ ), sowie die Abgasstrecke eingeschraubt sind. Zusätzlich ist eine Durchführung mit einer Anstechmembran versehen, durch welche Zusätze wie die Vitaminlösung, Cysteinlösung, Antischaummittel oder Inokulum über sterile Einwegspritzen und -kanülen zugeführt werden können. Die Abgasstrecke bestand aus einem Abgaskühler, einem Sterilfilter, einem Handventil und einem pneumatischen

Druckregelventil. Im Anschluss an die Abgasstrecke wurde das Abgas zuletzt durch eine Flasche mit Silicagel zur Trocknung des Gases vor der Abgasanalytik geleitet. Die Abgaskühlung wurde stets auf 2 °C eingestellt, um somit die Verdunstung von Medium und von flüchtigen Produkten aus dem Reaktor zu vermeiden. Der Aufbau des Bioreaktors ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Der schematische Aufbau des Reaktors ist in Abbildung 4-2 dargestellt.



**Abbildung 4-2** Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors für kontinuierlich begaste Satzprozesse zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Gasversorgungssystem für die Reingase N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mit Ventilen zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen und Regelung der Gasmassenströme und einem Zuluftfilter; Rührkesselreaktor mit Begasung über Sintermetallfritte, Rührer mit zwei 6-Blattscheibenrührern (Rushton-Turbinen) und Sicherheitsventil; Abgasstrecke aus Doppelrohrwärmetauscher als Abluftkühler, Abluftfilter, Reaktordruckregelventil, Trockenmittelflasche; Abgasanalytik aus Massendurchflussmessung (MFM) und Mikrogaschromatographie (µGC).

Der Reaktor wurde vor jedem Prozess *in situ* sterilisiert, indem ein in der Steuerungssoftware (BioScada, BioEngineering, Wald, Schweiz) hinterlegtes Programm durchlaufen wurde. Dazu wurde der Reaktor mit 1 L VE-Wasser befüllt und es wurden die Deckeldurchführungen für Begasung, Säure und Base mit Anstechmembranen und Blindstutzen verschlossen. Diese wurden nach der Sterilisation mit separat sterilisierten Anstechnadeln an den Reaktor angeschlossen. Das Sterilisationsprogramm heizte den Reaktor zunächst unter Rühren mit 200 min<sup>-1</sup> auf 121 °C und hielt diese Temperatur für 20 min. Mit dem Abgasregelventil wurde dabei ein Drucksollwert von 2,2 bar eingestellt. Während der ganzen Sterilisationsphase wird die Abgasstrecke von den Abgasanalytoren getrennt, um diese vor Feuchtigkeit zu schützen.

Im Anschluss an die Sterilisationsphase wurde die Temperatur auf 100 °C gekühlt. Die Gaszufuhr wurde daraufhin auf 5 L h<sup>-1</sup> N<sub>2</sub> eingestellt und mit der sterilisierten Begasungsstrecke aus einer Anstechnadel mit einem Zuluftfilter verbunden. Diese wurde durch eine der Anstechmembranen an das Gasleitrohr im Reaktor angestoßen. Die Begasungsrate wurde daraufhin auf 20 L h<sup>-1</sup> N<sub>2</sub> erhöht und der Druck aus dem Reaktor langsam bis 1,2 bar abgelassen. Dieser Druck wurde gehalten um eine Sterilbarriere während des Anstechens der Anstechnadeln zu gewährleisten. Währenddessen begann die Kühlung des Reaktors auf 37 °C.

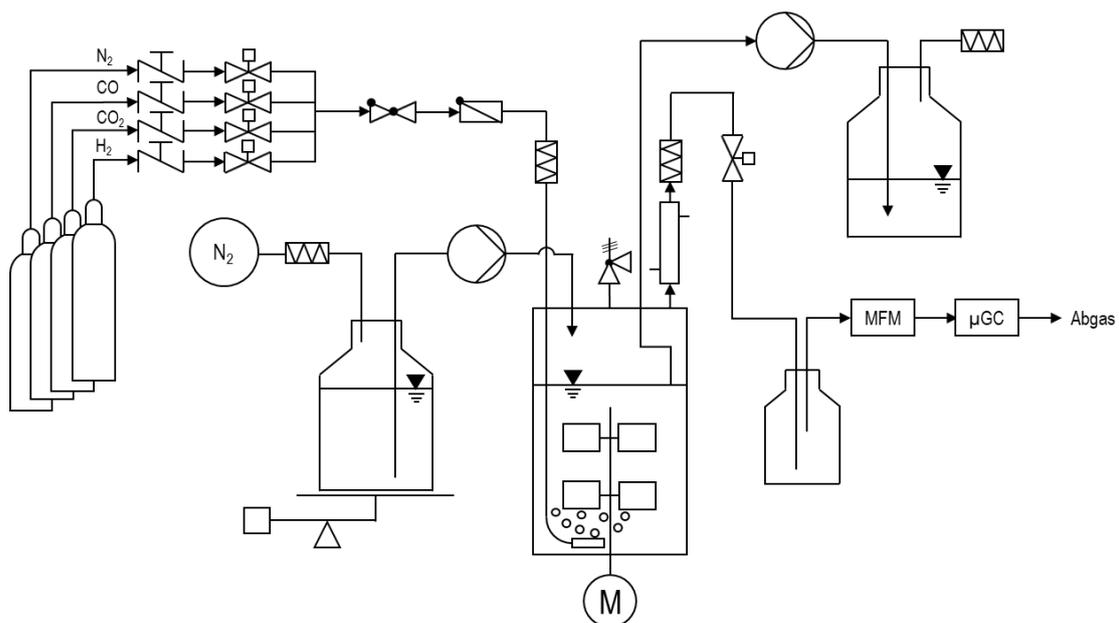
Für das Medium im Reaktorprozess wurde von der in Kapitel 4.2 beschriebenen Zusammensetzung des Mediums nur die Mineralstoff-, Ca-, Mg- und Spurenelementlösung mit 1,0 g Hefeextrakt mit VE-Wasser auf 970 mL eingestellt und in einer 1 L beschichteten Anaerobflasche mit Butylgummiseptum und Lochkappe dicht verschlossen. Daraufhin wurde das Medium mit den Anstechnadeln und einem Silikonschlauch für den Medientransfer im Dampfautoklaven für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Sobald der Reaktor eine Temperatur von 65 °C erreichte, wurde das Wasser über den Probenahmehahn abgelassen und über eine sterilisierte Anstechnadel und den ebenfalls sterilisierten Silikonschlauch wurde das Medium mit einer Schlauchpumpe in den Reaktor gefördert. Sobald das Medium vollständig in den Reaktor gepumpt wurde und die Temperatur 37 °C erreichte, wurden 10 mL der Vitaminlösung sterilfiltriert dem Reaktor zugegeben. Die Schläuche für Säure (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und Base (3 M NaOH) wurden mit dem jeweiligen Korrekturmittel vorgepumpt und steril an den Reaktor angeschlossen. Der pH wurde im Reaktor stets auf den Start-pH 6,0 eingestellt. Sobald alles vollständig angeschlossen war, wurde der Druck im Reaktor auf 1,0 bar reduziert und der Reaktor insgesamt für ca. 2 h mit Stickstoff anaerobisiert und anschließend mit der gewünschten Synthesegasmischung für mindestens 12 h begast. Die Zugabe von Cystein-Hydrochlorid erfolgte immer erst nachdem der Reaktor bereits anaerobisiert wurde unmittelbar vor der Inokulation. Eine Menge von ca. 200 µL 10 %-ige Polypropylenglykol-Lösung (PPG) wurde nach Bedarf als Antischaummittel zugegeben.

Wenn nicht anders angegeben waren die Reaktionsparameter in autotrophen Satzprozessen konstant bei  $V_{\text{flüssig}} = 1 \text{ L}$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $p_{\text{gesamt}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  (entspricht 15,1 W L<sup>-1</sup>),  $\dot{V}_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$  und ungeregeltem Redoxpotential. Der pH wurde für *C. carboxidivorans* nicht geregelt, wobei zu Beginn des Prozesses pH<sub>initial</sub> 6,0 eingestellt wurde. Für *C. autoethanogenum* wurde der pH 6,0 mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> geregelt.

#### 4.5.2. Kontinuierliche Chemostatprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor

Für die Durchführung kontinuierlicher Prozesse im Rührkesselreaktor wurde der beschriebene Reaktor aus Kapitel 4.5.1 am Deckel um zwei weitere Durchführungen für Medienzulauf und -ablauf erweitert. Zur Förderung des Mediums dienten jeweils eine separate peristaltische Pumpe (Ismatec Reglo Digital MS-4/12, ColeParmer, St Neots, Vereinigtes Königreich) für Zulauf und Ablauf. Die Medienflasche wurde auf einer Waage platziert, um die Medienzufuhr zu überwachen. Der schematische Aufbau des Reaktors für kontinuierliche Prozesse ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

Vor jedem kontinuierlichen Prozess wurde der Bioreaktor gemäß des Vorgehens für Satzprozesse in Kapitel 4.5.1 vorbereitet und *in situ* sterilisiert, wobei zuvor die Anstechnadel für den Medienablauf bereits im Reaktordeckel verbaut wurde und der Ablaufschlauch auf der entsprechenden Höhe des Flüssigkeitsfüllstandes von 1 L am Strombrecher fixiert wurde. Für den Medienzulauf wurde eine zusätzliche Anstechnadel vorbereitet und sterilisiert, sodass diese nach der Sterilisation des Reaktors steril über eine Anstechmembran eingebracht werden konnte. Die Prozessbedingungen im kontinuierlichen Betrieb wurden analog zu den Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* stets mit  $V_{\text{flüssig}} = 1 \text{ L}$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $p_{\text{gesamt}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $\dot{V}_{\text{Gas}} = 5 \text{ L h}^{-1}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  (entspricht  $15,1 \text{ W L}^{-1}$ ), unregelmäßigem Redoxpotential und pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gearbeitet.



**Abbildung 4-3** Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors für kontinuierlich begaste Prozesse im kontinuierlichen Betrieb (als Chemostat) zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Frischmedienzufuhr über peristaltische Pumpe, steriler, anaerober

Druckausgleich mit Stickstoff und Waage zur Überprüfung des Volumenstroms; Gasversorgungssystem für die Reingase  $N_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  und  $H_2$  mit Ventilen zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen und Regelung der Gasmassenströme und einem Zuluftfilter; Rührkesselreaktor mit Begasung über Sintermetallfritte, Rührer mit zwei 6-Blattscheibenrührern (Rushton-Turbinen) und Sicherheitsventil; Abgasstrecke aus Doppelrohrwärmetauscher als Abluftkühler, Abluftfilter, Reaktordruckregelventil, Trockenmittelflasche; Abgasanalytik aus Massendurchflussmessung (MFM) und Mikrogaschromatographie ( $\mu GC$ ).

Als Zulaufmedium wurde Medium nach Doll et al. (2018) verwendet, welches in 5 L-Flaschen hergestellt wurde. Hierzu wurden die Mineralstoff-, Ca-, Mg-, Spurenelementlösung und Hefeextrakt gemischt und mit VE-Wasser auf 4 L aufgefüllt. Die Flaschen wurden mit einem eigens angefertigten Deckel mit drei Durchführungen (für Medienentnahme, Begasung und Druckausgleich mit jeweils schließenden Schnellkupplungen) bestückt und im Dampfautoklaven bei  $121\text{ }^\circ C$  für 20 min offen sterilisiert. Im Anschluss an die Sterilisation wurde das noch ca.  $80\text{ }^\circ C$  heiße Medium entnommen und der Deckel sofort dicht verschlossen. Im Anschluss wurde das noch heiße Medium anaerobisiert, indem über eine Gasleitung mit Sterilfilter das Medium mit einer Mischung von 80 %  $N_2$  und 20 %  $CO_2$  zur Einstellung des  $CO_2$ -Gleichgewichts begast wurde. Dabei diente eine dampfsterilisierte Schnellkupplung mit Silikonschlauch zum Druckausgleich. Während des Anaerobisierens wurde das Medium in einem Eiswasserbad gekühlt. Nachdem das Medium für mindestens 2 h anaerobisiert wurde und dabei abgekühlt war, wurde über den Deckelanschluss für die Medienentnahme 40 mL einer sterilfiltrierten Vitaminlösung (Tabelle 10-3) sowie 4 mL einer dampfsterilisierten Polypropylenglykol-Lösung (10 %) als Antischaummittel aus einer anaeroben Flasche mit Butylgummiseptum durch einen sterilisierten Silikonschlauch mit steriler Einwegkanüle in das Medium transferiert. Nachdem das Medium für insgesamt 4 h anaerobisiert wurde, wurden 40 mL einer dampfsterilisierten  $40\text{ g L}^{-1}$  Cys-HCl-Lösung (Tabelle 10-5) in einer Anaerobflasche mit Butylgummiseptum durch einen ebenfalls sterilisierten Silikonschlauch und eine Einwegkanüle in das Medium transferiert. Daraufhin wurde sofort die Begasung gestoppt und die Gasleitungen für Begasung und Druckausgleich wieder abgekoppelt, sodass das Medium in der Flasche gasdicht verschlossen wurde. Die Schnellkupplungen wurden mit Ethanol desinfiziert und mit Alufolie abgedeckt. Bis zur Benutzung wurde das Medium bei  $4\text{ }^\circ C$  bis  $8\text{ }^\circ C$  dunkel gelagert.

Für den Ablauf aus dem Reaktor wurden 5 L-Flaschen leer mit Deckeln mit zwei Durchführungen für Medienzufuhr und Druckausgleich über einen Sterilfilter bestückt und für 20 min bei  $121\text{ }^\circ C$  im Dampfautoklaven dampfsterilisiert. Anschließend wurden die Deckel sofort dicht verschlossen und die Flaschen bis zur Benutzung bei Raumtemperatur gelagert.

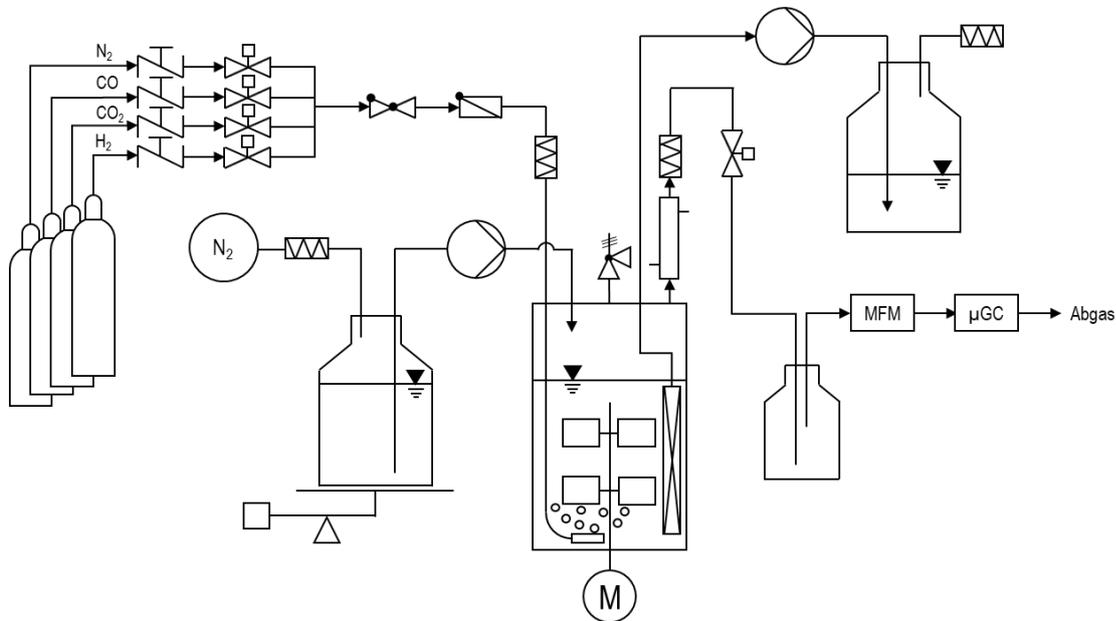
In allen kontinuierlichen Prozessen mit *C. autoethanogenum* wurde zunächst für 48 h in einem Satzprozess Biomasse generiert, bevor der kontinuierliche Betrieb gestartet wurde. Für die kontinuierlichen Prozesse wurde das Medium mindestens 2 h vor dem Einsatz bei Raumtemperatur gelagert. Das Medium wurde mit dampfsterilisierten Marpren-Schläuchen an die Medienflasche und den Bioreaktor angeschlossen und in die Schlauchpumpe eingespannt. Die Schnellkupplungen am Pumpschlauch wurden zusätzlich vor der Verbindung mit Ethanol desinfiziert. Dabei wurden an der peristaltischen Pumpe Volumenströme von  $0,667 \text{ mL min}^{-1}$  für die Durchflussrate  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  und  $1,333 \text{ mL min}^{-1}$  für  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  eingestellt. Um einen sterilen, anaeroben Druckausgleich mit Stickstoff in der Medienflasche zu gewährleisten wurde ein Gasreservoir (PLAS-TIGAS, Linde plc, Pullach, Deutschland) mit Stickstoff gefüllt und mit einem dampfsterilisierten Schlauch mit Sterilfilter an die Medienflasche angeschlossen.

#### **4.5.3. Kontinuierliche Prozesse im Rührkesselreaktor als Membranbioreaktor zur Zellrückhaltung**

Für kontinuierliche Prozesse mit vollständiger Zellrückhaltung wurde zusätzlich zum Aufbau des Bioreaktors als Chemostat eine getauchte Mikrofiltrationsmembran (Start AXM Microfiltration Cross Flow Cartridge, CFP-4-E-2U, Cytiva, Marlborough, MA, USA) in den Bioreaktor eingebaut. Hierzu wurde die Mikrofiltrationskartusche umgebaut, indem das Gehäuse der Membran abgenommen wurde und anschließend ein flexibler Silikon-schlauch mit kreisförmigen Perforationen (Durchmesser 10 mm) zum Schutz der freiliegenden Membranen angebracht wurde. Zudem wurden die nicht benötigten Anschlüsse für den Betrieb als Querstromfiltration mit Silikon dicht verschlossen analog zum Vorgehen aus der Arbeit von Mayer (2018). Die auf diese Art modifizierte Membran wurde an zwei der vier Strömungsbrecher im Bioreaktor fixiert, sodass sie bewegungslos im Reaktor stabilisiert war und außerhalb der Rührorgane im Bioreaktor verlief. Das obere Ende der Mikrofiltrationsmembran wurde dabei etwa auf der Höhe des Flüssigkeitsniveaus platziert, sodass die gesamte Membranoberfläche sich in der Flüssigkeit befand. Die Membran wurde über eine Luer-Lock-Verbindung mit dem Schlauch an der peristaltischen Ablaufpumpe analog zum Aufbau ohne Zellrückhaltung verbunden, sodass Reaktionsmedium mit totaler Zellrückhaltung aus dem Reaktor gefördert werden konnte. Die optische Dichte  $OD_{600}$  des Ablaufstroms wurde während der Prozesse laufend kontrolliert, um die erfolgreiche Zellrückhaltung zu bestätigen.

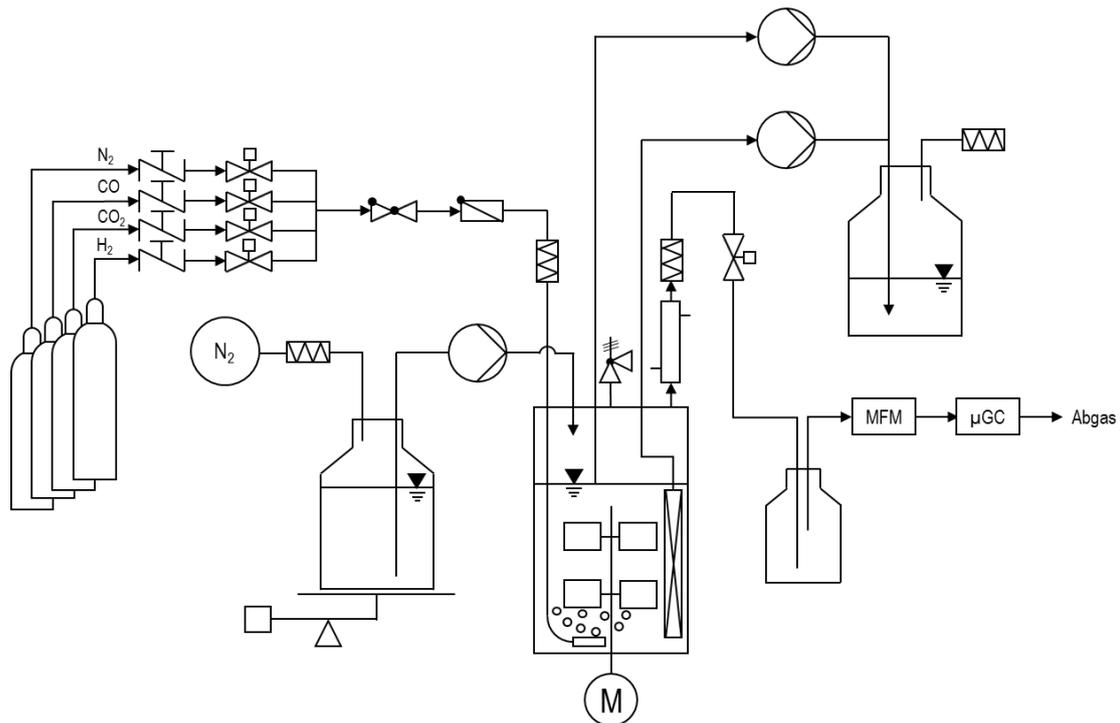
Das Medium wurde analog zum Vorgehen aus Kapitel 4.5.2 für den kontinuierlichen Prozess als Chemostat hergestellt und an den Bioreaktor angeschlossen. Ebenso wurden

die Prozessparameter genauso gewählt wie im kontinuierlichen Prozess ohne Zellrückhaltung. Der schematische Aufbau des Bioreaktors für kontinuierliche Prozesse im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung ist in Abbildung 4-4 dargestellt.



**Abbildung 4-4** Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors für kontinuierlich begaste Prozesse im kontinuierlichen Betrieb mit totaler Zellrückhaltung (als Membranbioreaktor) zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Frischmedienzufuhr über peristaltische Pumpe, steriler, anaerober Druckausgleich mit Stickstoff und Waage zur Überprüfung des Volumenstroms; Ablauf über getauchte Mikrofiltrationsmembran mit peristaltischer Pumpe; Gasversorgungssystem für die Reingase  $N_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  und  $H_2$  mit Ventilen zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen und Regelung der Gasmassenströme und einem Zuluftfilter; Rührkesselreaktor mit Begasung über Sintermetallfritte, Rührer mit zwei 6-Blattscheibenrührern (Rushton-Turbinen) und Sicherheitsventil; Abgasstrecke aus Doppelrohrwärmetauscher als Abluftkühler, Abluftfilter, Reaktorregelventil, Trockenmittelflasche; Abgasanalytik aus Massendurchflussmessung (MFM) und Mikrogaschromatographie ( $\mu GC$ ).

Zudem wurde neben dem Aufbau für totale Zellrückhaltung auch ein Aufbau für teilweise Zellrückhaltung etabliert. Hierzu wurde neben dem Ablaufstrom über die getauchte Membran auch einen Ablaufstrom ohne Filtration eingeführt. Dieser so genannte Verluststrom (engl. *bleed*) ermöglicht es ein unkontrolliertes Ansteigen der Biomassekonzentration zu vermeiden. Für diesen Aufbau wurde sowohl die getauchte Membran als auch der Schlauch zur Absaugung ohne Filtration (Kapitel 4.5.2) bereits vor der *in situ* Sterilisation eingebaut. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 4-5 dargestellt.



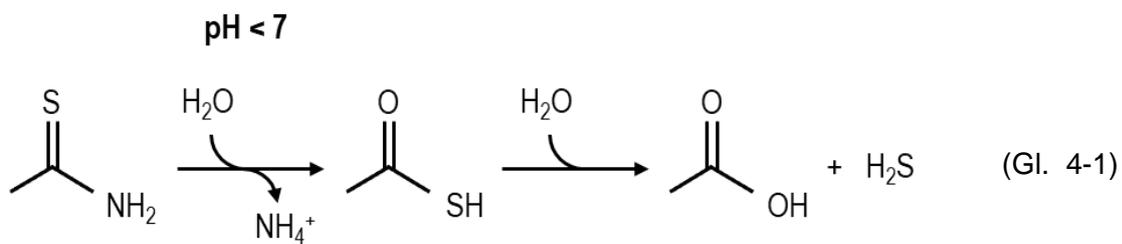
**Abbildung 4-5** Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors für kontinuierlich begaste Prozesse im kontinuierlichen Betrieb mit teilweiser Zellrückhaltung (als Membranbioreaktor) zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Frischmedienzufuhr über peristaltische Pumpe, steriler, anaerober Druckausgleich mit Stickstoff und Waage zur Überprüfung des Volumenstroms; Ablauf über getauchte Mikrofiltrationsmembran mit peristaltischer Pumpe zusätzlicher unfiltrierter Ablauf (Verluststrom, engl. *bleed*) über zweite Pumpe; Gasversorgungssystem für die Reingase N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mit Ventilen zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen und Regelung der Gasmassenströme und einem Zuluftfilter; Rührkesselreaktor mit Begasung über Sintermetallfritte, Rührer mit zwei 6-Blattscheibenrührern (Rushton-Turbinen) und Sicherheitsventil; Abgasstrecke aus Doppelrohrwärmetauscher als Abluftkühler, Abluftfilter, Reaktordruckregelventil, Trockenmittelflasche; Abgasanalytik aus Massendurchflussmessung (MFM) und Mikrogaschromatographie (µGC).

Für die kontinuierlichen Prozesse mit teilweiser Zellrückhaltung in dieser Arbeit wurde ein Verluststrom von 25 % des Gesamtablaufstroms gewählt. Die gesamte Durchflussrate wurde stets bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $1,333 \text{ ml min}^{-1}$ ) festgelegt, sodass sich an den beiden Ablaufpumpen für den filtrierten Strom  $1,000 \text{ mL min}^{-1}$  und für den Verluststrom  $0,333 \text{ mL min}^{-1}$  ergaben. Beide Ströme wurden in einer gemeinsamen Abaufflasche gesammelt.

Nach jedem Prozess im Membranbioreaktor wurde das Membranmodul anschließend ausgebaut und mit 70 % Ethanolösung gründlich abgespült sowie für mindestens 20 min entgegen der Strömungsrichtung im Bioprozess mit 70 % Ethanol bei  $1 \text{ ml min}^{-1}$  von der Schlauchpumpe durchgespült. Anschließend wurde die Membran in 70 % Ethanolösung bis zur nächsten Verwendung gelagert.

## 4.6. Bereitstellung definierter Konzentrationen von Spurenverunreinigungen

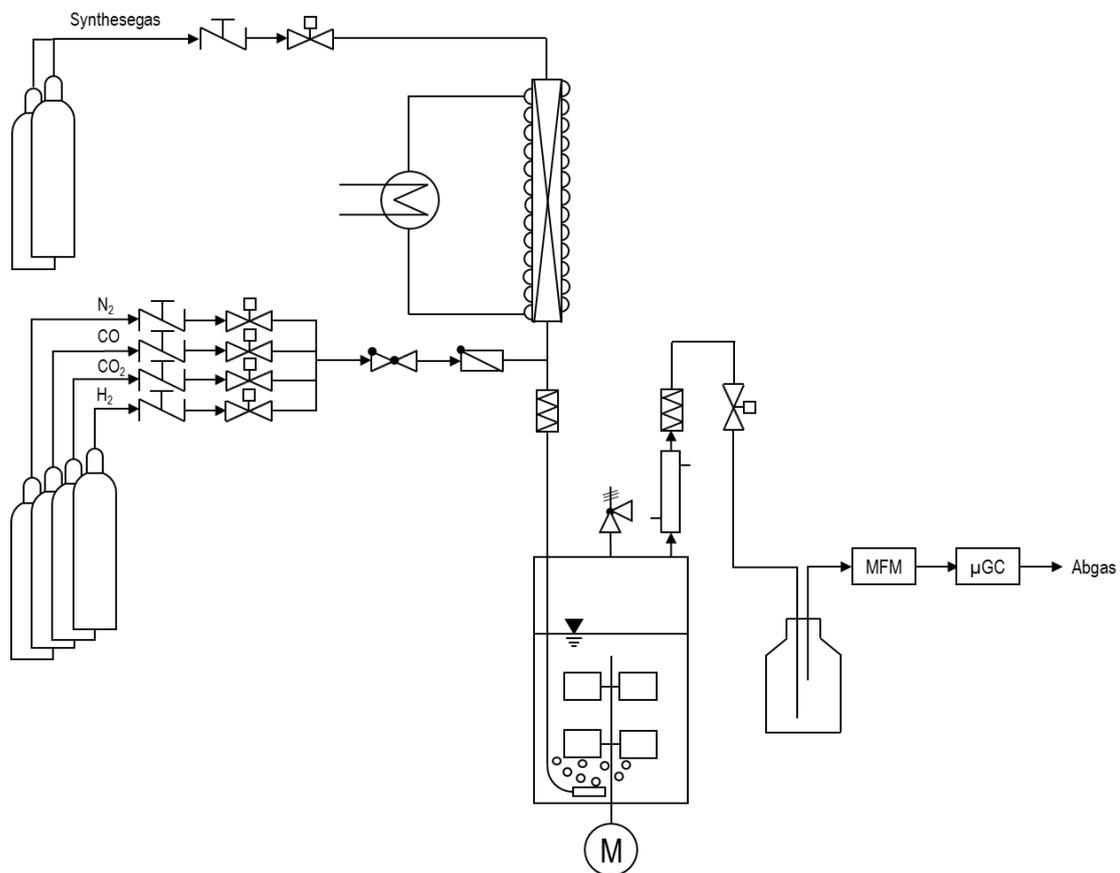
Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden definierte Mengen von Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen zu Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor zugefügt. Hierbei wurden die Einflüsse der typischen Spurenverunreinigungen biogener Synthesegase  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$  untersucht. Die Zugabe definierter Konzentrationen erfolgte stets über die Flüssigphase mit Lösungen der Spurenverunreinigungs-komponente, welche über eine Einwegspritze und -kanüle durch eine Anstechmembran am Reaktordeckel dem Reaktionsmedium zugegeben wurde. Zur Untersuchung der Einflüsse von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_x$  wurden die jeweiligen Salzkomponenten  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  und  $\text{NaNO}_2$  als gut wasserlösliche Spezies verwendet. Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  erfolgte durch die *in situ* Erzeugung mittels Thioacetamid, welches bei saurem  $\text{pH} < 7$  dissoziiert und  $\text{H}_2\text{S}$  freisetzt (Gl. 4-1) (Gunning 1955).



Die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Thioacetamid und  $\text{NaNO}_3$  erfolgte jeweils einmalig unmittelbar vor der Inokulation. Die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  erfolgte jeweils erst nachdem eine Biotrockenmassekonzentration von mindestens  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  BTM mit *C. carboxidivorans* und  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  BTM mit *C. autoethanogenum* vorlagen. Die Zugabe erfolgte jeweils als anaerobe Vorratslösung. Die Konzentrationen betragen  $200 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $100 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  und  $10 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$ . Zur Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  wurde eine Vorratslösung von  $40 \text{ g L}^{-1}$  Thioacetamid in anaerober  $10 \text{ mM}$   $\text{NaOH}$ -Lösung gelöst, um eine vorzeitige Dissoziation des Thioacetamids bei zu niedrigem  $\text{pH}$  zu vermeiden.

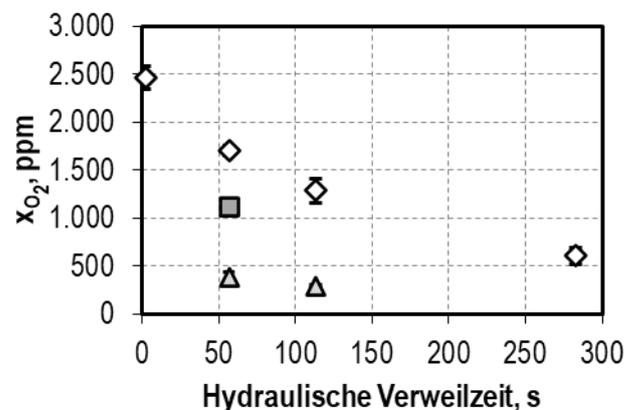
## 4.7. Chemisch-Katalytische Sauerstoffreduktion im kontinuierlichen Rohrreaktor

Für Prozesse mit biogenem Synthesegas aus der Vergasung von Biomasse wurde ein Rohrreaktorsystem zur Reduktion von im Synthesegas enthaltenem Sauerstoff etabliert. Dieser Rohrreaktor wurde dem Rührkesselreaktor vorgeschaltet und erlaubte die alternative Begasung des Reaktors mit biogenem Synthesegas anstelle der Gasmischungen aus Reingasen. Die Vorbereitung des Rührkesselreaktors erfolgte analog zur Vorbereitung für die Satzprozesse mit Reingasen (Kapitel 4.5.1). Die Anordnung des Rohrreaktors zum Rührkesselreaktor ist in Abbildung 4-6 gezeigt.



**Abbildung 4-6** Schematischer Aufbau des Rührkesselreaktors für kontinuierlich begaste Satzprozesse zur Gasfermentation mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Gasversorgungssystem für die Reingase  $N_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  und  $H_2$  mit Ventilen zur Einstellung beliebiger Gaszusammensetzungen und Regelung der Gasmassenströme und einem Zuluftfilter; Versorgung für biogenes Synthesegas mit Regelventilen zur Regelung der Gasmassenströme sowie Rohrreaktor mit Füllung aus Pd-Katalysator (Actisorb O3) und Silicagel und Temperierung über umgebenden Heizschlauch mit Thermostat; Rührkesselreaktor mit Begasung über Sintermetallfritte, Rührer mit zwei 6-Blattscheibenrührern (Rushton-Turbinen) und Sicherheitsventil; Abgasstrecke aus Doppelrohrwärmetauscher als Abluftkühler, Abluftfilter, Reaktordruckregelventil, Trockenmittelflasche; Abgasanalytik aus Massendurchflussmessung (MFM) und Mikrogaschromatographie ( $\mu GC$ ).

Alle Bauteile des Rohrreaktors waren handelsübliche Standardteile der Firma Landefeld (Landefeld GmbH, Kassel, Deutschland) aus rostfreiem Edelstahl. Er besteht aus einem nahtlosen Rohr (rostfreier Edelstahl 1.4571) mit einer Länge von 1 m und einem Innendurchmesser von 10 mm bei 1 mm Wandstärke. An beiden Enden des Rohres wurden Reduziernippel mit Schneidringverschraubungen (rostfreier Stahl 1.4571) angebracht, um die Verbindung des Rohres mit den vorhandenen Gasverrohrungen und Schläuchen zu ermöglichen. Am unteren Ende des Rohres wurde zusätzlich ein Sieb (rostfreier Edelstahl 1.4401) mit 0,8 mm Maschenweite eingebaut. Als Füllung für das Rohr wurden in der unteren Schicht 10 g Kieselgelkugeln (Silica Gel Orange 2 – 5 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und in der oberen Schicht 30 g eines Palladium-Katalysators (Pd auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) der Firma Clariant (Actisorb O3, 3 – 5 mm, Clariant AG, Muttenz, Schweiz) mit einer Partikelgröße von 3 mm – 5 mm als regellose Schüttung eingefüllt. Dabei dient der Katalysator in der oberen Schicht zur Reduktion von Sauerstoff im biogenen Synthesegas, welcher mit dem ebenfalls im Synthesegas enthaltenen Wasserstoff zu Wasser abreagiert. Anschließend wird das gebildete Wasser am Kieselgel gebunden. Somit kann vermieden werden, dass durch die Bildung von Feuchtigkeit am hydrophoben Zuluftfilter Wasser kondensieren kann. Das Rohr wurde mit einem Silikon-schlauch umwickelt, durch welchen mit einer Umwälzpumpe aus einem Thermostat entsalztes Wasser bei definierter Temperatur zur Temperierung im Kreis gepumpt wurde. Die Temperatur wurde mit dem Thermostat auf eine Gastemperatur im Rohrreaktor von 25 °C, 40 °C und 50 °C geregelt. Die Gasverweilzeit im Rohrreaktor wurde zwischen 0 s und 250 s variiert. Der Gasphasenanteil des Sauerstoffs ist in Abbildung 4-7 als Funktion der Gasverweilzeit bei verschiedenen Temperaturen dargestellt.



**Abbildung 4-7** Sauerstoffanteil des biogenen Synthesegases als Funktion der hydraulischen Verweilzeit im Rohrreaktor bei Temperaturen von 25 °C (weiße Raute), 40 °C (dunkelgraue Quadrate) und 50 °C (hellgraue Dreiecke). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 10 unabhängigen GC-Messungen.

Für die Prozesse mit biogenem Synthesegas und Reduzierung von Sauerstoff mit dem Rohrreaktor wurde aufgrund der besten Sauerstoffreduktion 50 °C als Temperatur gewählt. Höhere Temperaturen wurden vermieden, um die Gefahr unerwünschter Nebenreaktionen am Katalysator zu vermeiden. Als Verweilzeit im Rohrreaktor wurden 56 s gewählt, um den gewünschten Gasvolumenstrom von 5 L h<sup>-1</sup> zu ermöglichen.

## 4.8. Analytische Methoden

### 4.8.1. Bestimmung von Biomassekonzentrationen

Die Biomassekonzentrationen wurden über photometrische Messungen in einem Spektrophotometer der Firma Thermo Fisher Scientific (Genesys 10S UV/VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm und Raumtemperatur durchgeführt. Die gemessenen optischen Dichten bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) wurden mit einer linearen Korrelation in Biotrockenmassekonzentrationen (BTM) umgerechnet. Die Korrelationsfaktoren waren 0,46 g L<sup>-1</sup>  $OD_{600}^{-1}$  für *C. carboxidivorans* und 0,38 g L<sup>-1</sup>  $OD_{600}^{-1}$  für *C. autoethanogenum*.

### 4.8.2. Produktquantifizierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Quantifizierung flüssiger Produkte erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Hierzu diente ein HPLC-System der Firma Shimadzu (LC-2030C, Shimadzu, Kyoto, Japan) mit einem zusätzlichen Brechungsindexdetektor (RID-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) und einer Kationentauschersäule der Firma Bio-Rad als Trennsäule (Aminex HPX-87H, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland). Alle Messungen erfolgten mit 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als mobile Phase bei isokratischer Elution mit einer Flussrate von 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei einer Temperatur von 60 °C.

Bei jeder Messung wurde eine Serie von Standards mit verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die Konzentrationen der jeweiligen Standards sind in Tabelle 4-2 dargestellt.

**Tabelle 4-2** Konzentrationen der Standardreihen für HPLC-Messungen zur Quantifizierung flüssiger Produkte, Metabolite und Substrate in Prozessen mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*.

Konzentration, g L <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucose	10,0	8,0	6,0	4,0	2,0	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
Xylose	10,0	8,0	6,0	4,0	2,0	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
Formiat	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Acetat	10,0	8,0	6,0	4,0	2,0	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
2,3-Butandiol	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Ethanol	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Butyrat	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
1-Butanol	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Hexanoat	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
1-Hexanol	-	-	-	2,03	1,02	-	0,41	-	0,20	0,08

Alle Proben für die Quantifizierung von 1-Hexanol sowie die Standards zur 1-Hexanolbestimmung wurden vor der HPLC-Messung zunächst extrahiert und konzentriert (Doll 2018). Dazu wurden 900 µL der wässrigen Probe mit 300 µL Ethylacetat in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss versetzt, sodass sich ein Zweiphasensystem bildet. Das Gefäß wurde danach dicht verschlossen und zur Durchmischung der Phasen für 15 min bei 25 s<sup>-1</sup> in einer Schwingmühle (MM200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) geschüttelt. Anschließend wurden die Gefäße für 3 min bei 13.000 min<sup>-1</sup> in einer Laborzentrifuge (Mikro20, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) bei Raumtemperatur abzentrifugiert, um eine klare Phasentrennung zu erreichen. Von der organischen Phase wurden vorsichtig 125 µL mit einer Pipette abgenommen und in ein Rollrandgläschen mit einem 200 µL Mikroinsert pipettiert. Die Standards für die HPLC-Messung von 1-Hexanol wurden ebenso extrahiert. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Stammlösung mit einem Volumenanteil von 1:400 1-Hexanol in VE-Wasser erstellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von 1-Hexanol in Wasser wurde diese Verdünnung in einem Schritt in einem Messkolben durchgeführt. Daraufhin wurde die Stammlösung mit einem Vortex-Mixer vollständig homogenisiert. Anschließend wurden die Verdünnungen 1:400, 1:800, 1:2.000, 1:4.000 und 1:10.000 in 1,5 mL Reaktionsgefäßen hergestellt und anschließend genau wie die Proben aus den Prozessen mit Ethylacetat extrahiert.

### 4.8.3. Quantifizierung von Gasaufnahmezeiten mittels Mikrogaschromatographie ( $\mu$ GC)

Die Quantifizierung von Gaspartialdrücken im Reaktorabgas erfolgte mit einem Mikrogaschromatographiesystem ( $\mu$ GC) der Firma Agilent (Mikro GC 490, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Das System war dabei ausgestattet mit 3 Kanälen mit jeweils individuellem thermischem Leitfähigkeitsdetektor (TCD, thermal conductivity detector), eigener Trennsäule und Trägergas. Die detaillierte Beschreibung der 3 Kanäle ist in Tabelle 4-3 gezeigt.

**Tabelle 4-3** Beschreibung der  $\mu$ GC-Systeme zur Bestimmung von Gaspartialdrücken im Reaktorabgas mit 3 separaten Kanälen mit individuellem thermischem Leitfähigkeitsdetektor, separater Trennsäule und Trägergas sowie jeweils individuellen Parametern von Temperatur, Druck und Zeitparametern.

	Kanal 1	Kanal 2	Kanal 3
Trennsäule	Molsieb	PPQ	CP-Sil
Trägergas	Argon	Helium	Helium
Injektionstemperatur	90 °C	90 °C	90 °C
Säulentemperatur	80 °C	80 °C	45 °C
Injektionszeit	50 ms	50 ms	50 ms
Druck	250 kPa	150 kPa	100 kPa
Backflushzeit	8,0 s	15,0 s	8,0 s
Detektor	TCD	TCD	TCD
Gaskomponenten	He, H <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , CO, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , HCN, H <sub>2</sub> O, NO <sub>x</sub>	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, H <sub>2</sub> O, COS, CS <sub>2</sub>

Die Gasproben wurden *at-line* über ein T-Stück in der Abgasleitung direkt aus dem Reaktorabgasstrom entnommen. Das Gas wurde zuvor durch eine Flasche mit Trockenmittel geleitet um das Gas zu entfeuchten, damit eine schädliche Kondensation von Flüssigkeit im Gaschromatographen ausgeschlossen werden kann.

Die Abgasvolumenströme wurden durch Massendurchflussmesser der Firma Bronkhorst für Synthesegasmischungen aus Reingasen (F-101D-RAD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) und für korrosive Gase wie biogene Synthesegase (F-201CV-500-RGD-33-V, Bronkhorst, Reinach, Schweiz) am Reaktorausgang bestimmt. Gasaufnahmezeiten wurden ermittelt durch die Kombination der aus  $\mu$ GC-Messungen ermittelten Gaspartialdrücke und der Abgasmassenströme.

Für die Bestimmung der Abgasmassenströme der einzelnen Synthesegaskomponenten wurde die Methode von Kantzow (2015) verwendet, indem für jede Gaskomponente ein Mischgaskonvektionsfaktor (MGK) bestimmt wurde (Gl. 4-2).

$$MGK = \sum \frac{y_i}{G_{f,i}} \quad (\text{Gl. 4-2})$$

$G_{f,i}$	Gaskonversionsfaktor der Komponente i	-
$MGK$	Mischgaskonversionsfaktor	-

Mithilfe des Mischgaskonvektionsfaktors wurden die gemessenen Gasvolumenströme bezogen auf die Kalibrierung des Massendurchflussmessers mit Stickstoff in tatsächliche Gasvolumenströme der Synthesegaskomponente i umgerechnet (Gl. 4-3).

$$\dot{V}_i = MGK \cdot \dot{V}_{N_2} \cdot y_i \quad (\text{Gl. 4-3})$$

$\dot{V}_i$	Volumenstrom der Komponente i	L h <sup>-1</sup>
$\dot{V}_{N_2}$	Volumenstrom des Gases bezogen auf Stickstoff	L h <sup>-1</sup>

Die Gasaufnahme  $r_i$  der Komponente i ergibt sich somit durch die Änderung in Bezug auf den Gaszustrom des Reaktors  $\dot{V}_{i,0}$  nach (Gl. 4-4):

$$r_i = \frac{\dot{V}_{i,0} - \dot{V}_i}{V_M \cdot V_R} \quad (\text{Gl. 4-4})$$

$r_i$	Gasaufnahme der Komponente i	mol L h <sup>-1</sup>
$\dot{V}_{i,0}$	Gaszustrom der Komponente i	L h <sup>-1</sup>
$\dot{V}_i$	Abgasvolumenstrom der Komponente i	L h <sup>-1</sup>
$V_M$	Molares Volumen	L mol <sup>-1</sup>
$V_R$	Reaktionsvolumen	L

Um aus den so erhaltenen Gasaufnahme  $r_i$  die Gesamtmengen aufgenommenen Gases zu bestimmen, muss die Gasaufnahme  $r_i$  über die Zeit integriert werden (Gl. 4-5). Die Integration erfolgte durch eine numerische Integration, indem die diskreten Messpunkte mit einem Zeitintervall von 10 min aufsummiert wurden (Gl. 4-6).

$$n_i = \int_{t=0}^{t_{max}} r_i \cdot V_R dt \quad (\text{Gl. 4-5})$$

$$n_i = \sum_{i=0}^t r_i \cdot V_R \cdot \Delta t \quad (\text{Gl. 4-6})$$

$n_i$	Aufgenommene Stoffmenge der Komponente i	mol
$r_i$	Gasaufnahme rate der Komponente i	mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$V_R$	Reaktionsvolumen	L
$t$	Prozesszeit	h
$\Delta t$	Zeitintervall für die numerische Integration (10 min)	h

Basierend auf diesen Gesamtmengen der aufgenommenen Gase wurden zusammen mit den über HPLC bestimmten Produktmengen (siehe Kapitel 4.8.2) und Biomassekonzentrationen (siehe Kapitel 4.8.1) Kohlenstoffbilanzen erstellt und die Kohlenstoffwiederfindung berechnet. Für eine vollständig geschlossene Kohlenstoffbilanz müssen die Summe aller Kohlenstoffe in Substraten und Produkten identisch sein (Gl. 4-7). Die Kohlenstoffwiederfindung gibt den Quotienten von Kohlenstoff in Produkten und Kohlenstoff in Substraten wieder (Gl. 4-8).

$$\sum h_{i,Produkt} \cdot n_{i,Produkt} = \sum h_{i,Substrat} \cdot n_{i,Substrat} \quad (\text{Gl. 4-7})$$

$$C_{Wiederfindung} = \frac{\sum h_{i,Produkt} \cdot n_{i,Produkt}}{\sum h_{i,Substrat} \cdot n_{i,Substrat}} \quad (\text{Gl. 4-8})$$

$h_{i,Substrat}$	Kohlenstoff in Komponente i im Substrat	-
$n_{i,Substrat}$	Substratkonzentration der Komponente i	mol
$h_{i,Produkt}$	Kohlenstoff in Komponente i im Produkt	-
$n_{i,Produkt}$	Produktkonzentration der Komponente i	mol
$C_{Wiederfindung}$	Kohlenstoffwiederfindung	%

#### 4.8.4. Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsrate

Die Bestimmung von Wachstums- und Produktbildungsrate erfolgte durch nichtlineare Regression der ermittelten Konzentrationen von Biomasse und Produkten. Dabei wurde eine Sigmoidale nach Gompertz (1825) (Gl. 4-9) als Zielfunktion verwendet und diese mit dem GRG-Nichtlinear-Algorithmus des Solver-Plugins von Microsoft Excel die Fehlerquadratsumme minimiert. Die Gompertz-Funktion ist mit den Parametern  $a$ ,  $b$  und  $c$  definiert als (Gl. 4-9) (Gompertz 1825; Tjørve und Tjørve 2017):

$$f(t) = c_{i,approximiert}(t)$$

$$f(t) = a \cdot e^{-b \cdot e^{-c \cdot t}} \quad (\text{Gl. 4-9})$$

mit  $a \geq 0$ ;  $b \geq 0$ ;  $c \geq 0$

$f(t)$	Gompertz-Funktion zur nicht-linearen Regression	$\text{g L}^{-1}$
$a$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	$\text{g L}^{-1}$
$b$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	-
$c$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	$\text{h}^{-1}$
$t$	Prozesszeit	$\text{h}$
$c_{i,approx.(t)}$	Durch Regression berechnete zeitliche Konzentration	$\text{g L}^{-1}$

Alle Parameter wurden für die Lösung als nichtnegativ definiert. Durch die Ableitung der erhaltenen Approximationsfunktion für die Konzentration nach der Zeit können volumetrische Wachstums- und Produktbildungsrate als Funktion der Zeit berechnet werden (Gl. 4-10):

$$\frac{d}{dt} f(t) = f'(t) = \frac{d}{dt} c_{i,approximiert}(t) = Q_{i,approximiert}(t)$$

$$f'(t) = a \cdot b \cdot c \cdot e^{-b \cdot e^{-c \cdot t} - c \cdot t} \quad (\text{Gl. 4-10})$$

mit  $a \geq 0$ ;  $b \geq 0$ ;  $c \geq 0$

$f'(t)$	Ableitung der Gompertz-Funktion nach der Zeit	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$Q_{i,approx.(t)}$	Durch Regression berechnete zeitliche Änderungsrate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Die Berechnung der spezifischen Raten als Funktion der Zeit kann über die mit (Gl. 4-9) berechneten Biomassekonzentration als Funktion der Zeit und der mit (Gl. 4-10) berechneten volumetrischen Rate bestimmt werden (Gl. 4-11):

$$q_{i,approximiert}(t) = \frac{Q_{i,approximiert}(t)}{c_{x,approximiert}(t)} \quad (\text{Gl. 4-11})$$

$q_{i,approx.}(t)$	Ableitung der Gompertz-Funktion nach der Zeit	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$c_{x,approx.}(t)$	Durch Regression berechnete zeitliche Biotrockenmassenkonzentration	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

## 5. Inhibierungsstudien und Realgasfermentationen mit *Clostridium carboxidivorans*

Dieses Kapitel behandelt und diskutiert die Ergebnisse der Untersuchungen mit *C. carboxidivorans* in Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor. Neben der Reproduktion des Referenzsatzprozesses von Doll (2018) liegt der Fokus dieses Kapitels auf Untersuchungen zum Einfluss definierter Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen mit *C. carboxidivorans*. Abschließend werden die Ergebnisse erster Realgasfermentationen mit biogenem Synthesegas aus der Flugstromvergasung biogener Reststoffe (torrefiziertes Holz (TorrCoal)) mit Reingasprozessen verglichen und diskutiert.

### 5.1. Inhibierungsstudien mit *Clostridium carboxidivorans* im Satzverfahren<sup>1</sup>

#### 5.1.1. Referenzsatzprozess mit *C. carboxidivorans*

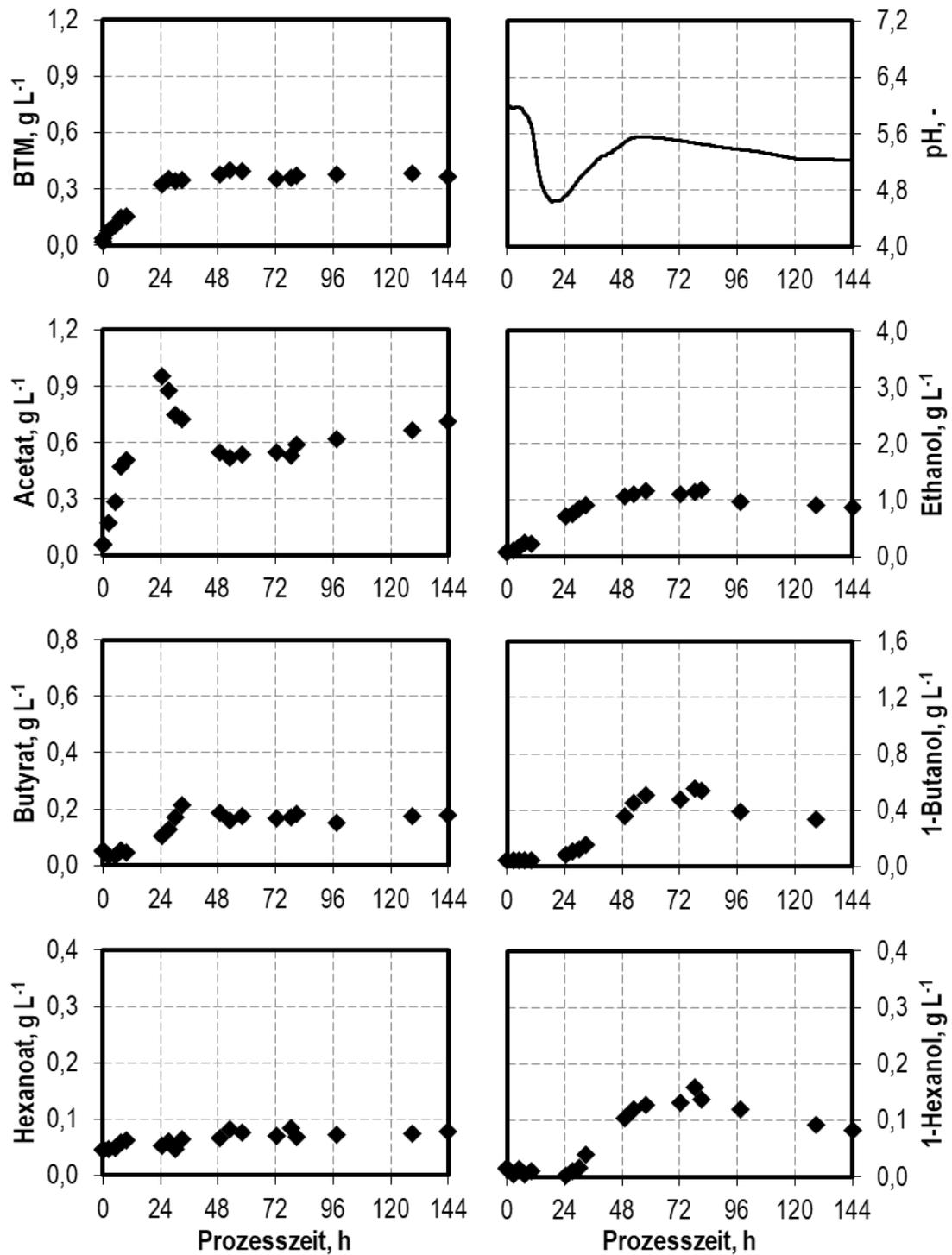
Zu Beginn der Untersuchungen wurde der autotrophe Referenzsatzprozess aus der vorangegangenen Arbeit von Doll (2018) reproduziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-1 dargestellt.

Der Satzprozess mit *C. carboxidivorans* ist charakterisiert durch ein initiales, relativ starkes Biomassewachstum, welches jedoch nach ca. 24 h bei niedrigen maximalen Biomassekonzentrationen von 0,40 g L<sup>-1</sup> endet. Während der Wachstumsphase wurde insbesondere Acetat produziert, welches ebenfalls nach 24 h ein Maximum bei 0,96 g L<sup>-1</sup> erreichte. Durch die Essigsäurebildung sank der unregelmäßige pH im Prozess bis zum Minimum bei pH 4,5 nach ca. 24 h ab.

---

<sup>1</sup> Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind wissenschaftlich publiziert in:

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 *Front. Microbiol.* 12, Article 655390. doi:10.3389/fmicb.2021.655390.



**Abbildung 5-1** Autotropher Referenzsatzprozess mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab (schwarze Raute ◆, schwarze Linie) bei den Referenzbedingungen von Doll (2018):  $T = 37\text{ °C}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt),  $F_{\text{gas}} = 5,0\text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013\text{ mbar}$ ,  $n = 1200\text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 800\text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200\text{ mbar}$ .

Der gesunkene pH wirkt als Auslöser für die zweite Phase des Prozesses. In der ersten Phase fand zwar bereits eine geringe Ethanolbildung statt. Die hauptsächliche Ethanolproduktion fand jedoch in der zweiten Prozessphase statt, in welcher die Ethanolbildungsrate zunahm, indem Acetat von den Mikroorganismen wiederaufgenommen und in Ethanol umgesetzt wurde. Die Acetatkonzentration sank somit auf bis zu  $0,52 \text{ g L}^{-1}$  ab. Dadurch stieg der pH aufgrund des Abbaus organischer Säuren wieder auf bis zu pH 5,8 an. Somit wurden die maximalen Alkoholkonzentrationen von  $1,17 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol,  $0,54 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol und  $0,16 \text{ g L}^{-1}$  1-Hexanol nach etwa 84 h Prozesszeit erreicht. Im Anschluss daran sank die Alkoholkonzentrationen lediglich aufgrund von Verdunstungseffekten langsam ab. Nur die Acetatkonzentration nahm am Ende der Prozesszeit noch langsam auf  $0,71 \text{ g L}^{-1}$  zu.

### Diskussion

Der Referenzsatzprozess mit *C. carboxidivorans* zeichnet sich durch ein ausgeprägtes zweistufiges Verhalten aus. In der ersten Prozessphase wird neben dem Biomassewachstum hauptsächlich Acetat gebildet. Diese Phase wird als Acidogenese bezeichnet, da hier hauptsächlich organische Säuren produziert werden. Aufgrund der Essigsäurebildung nimmt der pH ab und es folgt die zweite Prozessphase, in der hauptsächlich Alkohole gebildet werden. Diese zweite Prozessphase wird als Solventogenese bezeichnet. Das charakteristische zweistufige Prozessverhalten von *C. carboxidivorans* in einer acidogenen und einer solventogenen Phase ist eine Besonderheit dieses Mikroorganismus, welche selten bei anderen acetogenen Mikroorganismen beobachtet wurde (Ramíó-Pujol et al. 2015a; Ganigué et al. 2016; Fernández-Naveira et al. 2017). Insbesondere die Wiederaufnahme und der damit verbundene Abbau zu Alkoholen von bereits gebildeter Essigsäure wurde in der Literatur bei anderen Mikroorganismen selten quantitativ beschrieben (Abubackar et al. 2015b). Diese Eigenschaft ist bedeutend, da ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis von Bedeutung für einen effizienten Produktabtrennungsprozess durch technische Standardverfahren wie die Rektifikation ist (Daniell et al. 2012; Ezeji et al. 2004).

Im in dieser Arbeit durchgeführten Referenzsatzprozess konnte eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der drei Referenzsatzprozesse der vorangegangenen Arbeit von Doll (2018) erreicht werden. Die maximale Biotrockenmasse- und Alkoholkonzentrationen lagen bei  $0,45 \text{ g L}^{-1} \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  BTM,  $1,21 \text{ g L}^{-1} \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol,  $0,44 \text{ g L}^{-1} \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol und  $0,15 \text{ g L}^{-1} \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  1-Hexanol (Doll 2018). Lediglich die Acetatproduktion in dieser Arbeit zeigte eine etwas höhere Abweichung, da

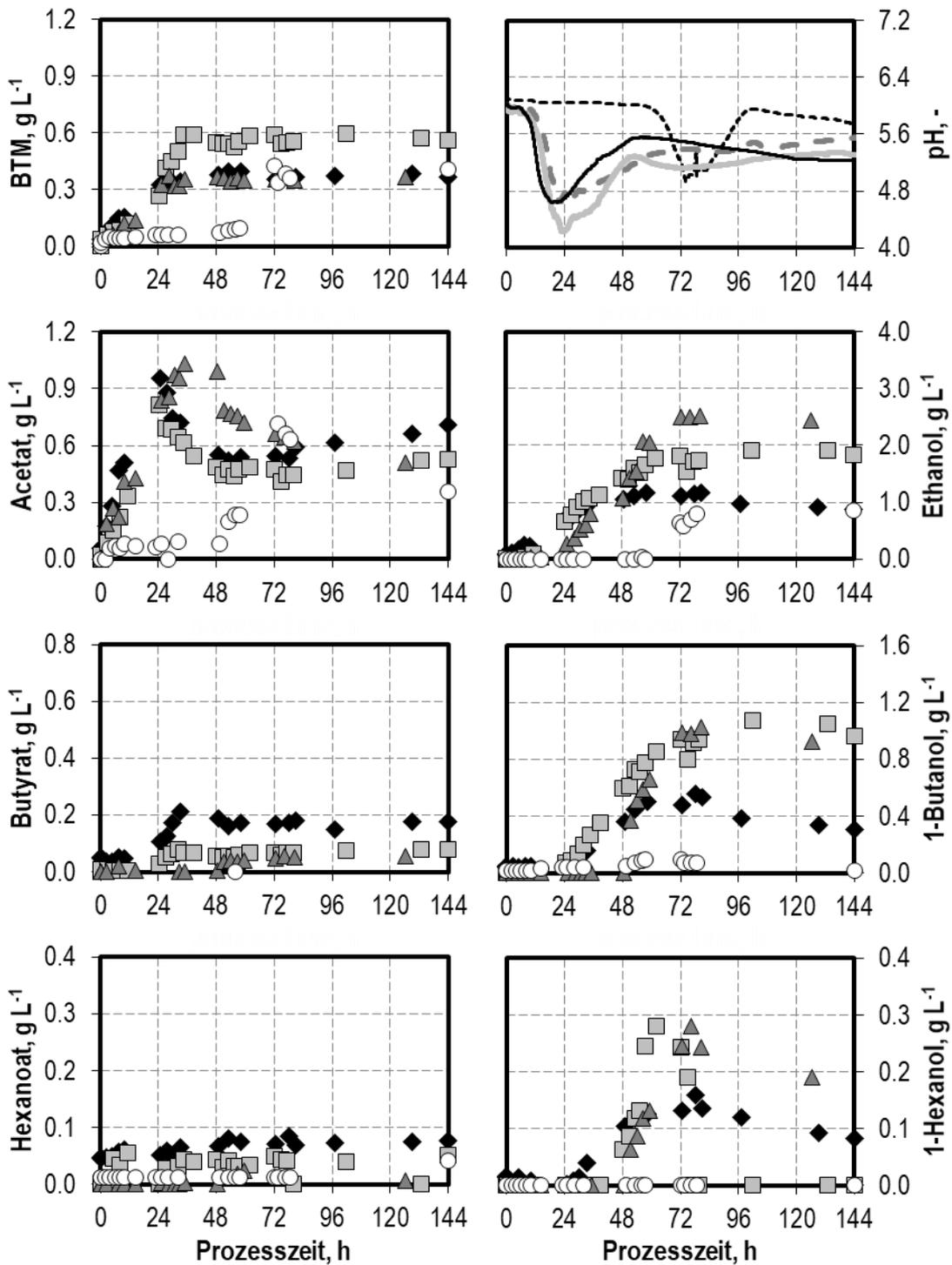
nach 48 h die Umsetzung des bereits gebildeten Acetats etwas langsamer erfolgte und insgesamt am Prozessende mit  $0,71 \text{ g L}^{-1}$  Acetat eine höhere Restkonzentration von Acetat vorlag als in den drei Referenzsatzprozessen von Doll (2018) mit  $0,47 \text{ g L}^{-1} \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  Acetat.

### 5.1.2. Ammoniak als Spurenverunreinigung

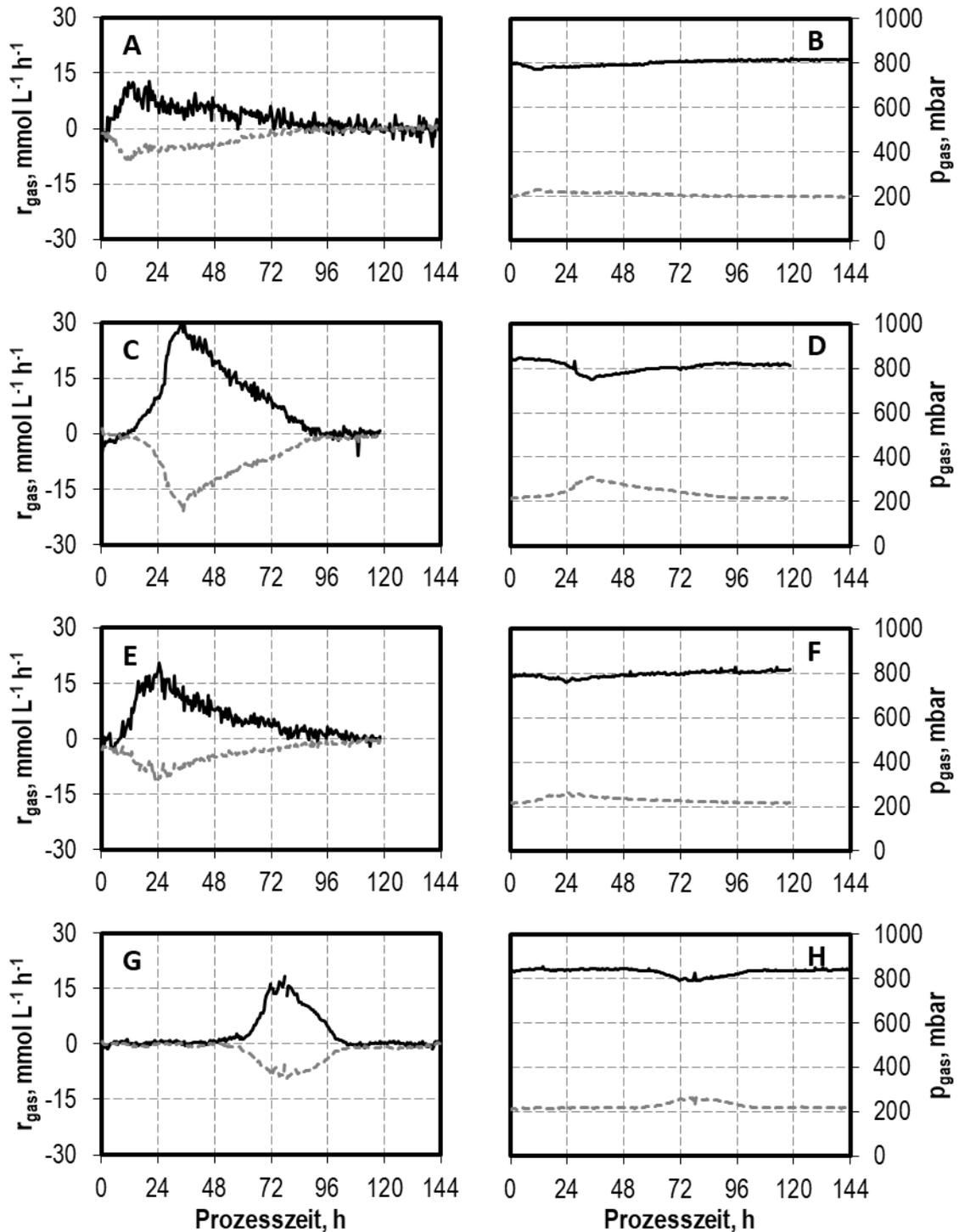
Die Effekte von Ammoniak als typische Spurenverunreinigung biogener Synthesegase auf *C. carboxidivorans* wurde durch die einmalige Zugabe definierter Konzentrationen von Ammoniumchlorid  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zum Reaktionsmedium zu Beginn von Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor untersucht. Die Ergebnisse der Satzprozesse sind in Abbildung 5-2 und Abbildung 5-3 im Vergleich zum etablierten Referenzsatzprozess (siehe Kapitel 5.1.1) gezeigt.

Die initiale Zugabe von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  führte zu einer Steigerung der maximalen Biotrockenmassekonzentration um 50 % im Vergleich zum Referenzsatzprozess auf  $0,60 \text{ g L}^{-1}$  BTM nach 34,5 h. Der minimal erreichte pH wurde dabei im Vergleich zum Referenzsatzprozess auf pH 4,2 nach 23,5 h gesenkt. Die maximalen Alkoholkonzentrationen wurden dabei erhöht auf Maximalwerte von  $1,91 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol,  $1,08 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol und  $0,28 \text{ g L}^{-1}$  1-Hexanol. Gleichzeitig war die Akkumulation organischer Säuren geringer als im Referenzsatzprozess, wobei die Wiederaufnahme der Säuren, insbesondere der Essigsäure, zu einer geringeren Endkonzentration von  $0,53 \text{ g L}^{-1}$  Acetat führte. Die längerkettigen organischen Säuren wurden nahezu vollständig in Alkohole umgesetzt mit Endkonzentrationen von lediglich jeweils  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  Butyrat und  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  Hexanoat.

Die Erhöhung der anfänglichen Zugabe von Ammoniumchlorid führte nicht zu einer weiteren Steigerung der maximalen BTM im Vergleich zum Referenzsatzprozess mit *C. carboxidivorans*. Die Erhöhung auf  $10,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  führte zu einer ausgeprägten initialen Verzögerungsphase des Wachstums und der Alkoholproduktion bis zu 57,5 h nach der Inokulation. Ebenso wurde auch der pH-Abfall aufgrund der Essigsäureproduktion verzögert. Jedoch wurden durch die Zugabe von  $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  die höchsten finalen Ethanolkonzentration von  $2,52 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und ebenfalls erhöhte Konzentrationen von 1-Butanol ( $1,02 \text{ g L}^{-1}$ ) und 1-Hexanol ( $0,28 \text{ g L}^{-1}$ ) im Vergleich zum Referenzsatzprozess erzielt.



**Abbildung 5-2** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie) und mit Zugabe definierter Konzentrationen von + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie), + 7,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgraue gestrichelte Linie) und + 10,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (weiße Kreise  $\circ$ , schwarze gepunktete Linie) bei T = 37 °C, pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt), F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), p<sub>co</sub> = 800 mbar, p<sub>co2</sub> = 200 mbar.



**Abbildung 5-3** Gasaufnahme- und Gaspartialdruckverläufe der Synthesegaskomponenten  $\text{CO}$  (schwarze durchgezogene Linie) und  $\text{CO}_2$  (dunkelgrau gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 5,0 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  (C und D), + 7,5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  (E und F) und + 10,0 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  (G und H) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt),  $p_{\text{CO}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ .

Die maximalen CO-Aufnahmeraten sowie minimalen CO<sub>2</sub>-Bildungsraten wurden mit Zugabe von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl erreicht, gefolgt von 7,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 10,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, wobei der Referenzsatzprozess das geringste Maximum erreichte. Allerdings wurde im Prozess mit 10,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl nur über einen Zeitraum von ca. 48 h CO aufgenommen und somit insgesamt weniger CO konsumiert als im Referenzsatzprozess. Die Partialdrücke der Gaskomponenten wurden aufgrund der relativ hohen Gasvolumenströme und der relativ geringen Gasaufnahme der Mikroorganismen bei niedrigen Biomassekonzentrationen nur geringfügig gegenüber dem Gaszustrom verringert. In Kombination mit dem hohen volumetrischen Leistungseintrag durch den Rührer können daher trotz der gesteigerten Gasaufnahme durch die Ammoniumzugabe nicht CO-limitierte Bedingungen in allen gezeigten Satzprozessen angenommen werden.

Die Gesamtaufnahme von CO und Gesamtproduktion von CO<sub>2</sub> in den gezeigten Satzprozessen auf C-mol Basis war am höchsten für die Zugabe von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl mit 1 002,58 mmol aufgenommenem CO (Erhöhung um Faktor 2,3) und wurde mit 7,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl ebenfalls im Vergleich zum Referenzsatzprozess erhöht auf 632,38 mmol CO (Erhöhung um 45 %). Alle Prozesse erreichten ein niedriges Verhältnis von aufgenommenem CO zu gebildetem CO<sub>2</sub> um 1,4 mit Kohlenstoffbilanzwiederfindungen zwischen 82,5 % und 94,7 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind aufgrund von nicht quantifizierten Effekten durch unvollständig verwerteten Kohlenstoff im Medium (Hefeextrakt und Cystein) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.

**Tabelle 5-1** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener NH<sub>4</sub>Cl-Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 7,5 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 10,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl
C im Medium, mmol C	9,94	9,94	9,94	9,94
CO-Aufnahme, mmol C	436,69	1 002,58	632,38	411,86
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	328,11	720,22	450,54	281,41
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,33	1,39	1,40	1,40
C in Produkten, mmol C	81,06	152,86	123,26	51,14
C in Biomasse, mmol C	13,98	21,49	14,14	15,58
C-Bilanz (Wiederfindung), %	94,74%	88,35%	91,53%	82,53%

Die spezifische Wachstumsrate sowie die Produktbildungsrate aus Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* mit Zugaben von NH<sub>4</sub>Cl sind in Tabelle 5-2 dargestellt. Während die maximale spezifische Wachstumsrate aller Prozesse mit Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl gegenüber dem Referenzsatzprozess abnahmen, nahm die maximale Ethanolbildungsrate zu. Auch

die 1-Butanol- und 1-Hexanolbildungsraten waren mit Zugabe von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 7,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl gesteigert. Die Zugabe von 10,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl führte hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Bildungsraten längererkettiger Alkohole.

**Tabelle 5-2** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener NH<sub>4</sub>Cl-Konzentrationen.

	Referenzsatz- prozess	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 7,5 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 10,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl
$\mu_{\max}, h^{-1}$	0,181	0,149	0,134	0,110
$Q_{\text{Acetat,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,064	0,042	0,035	0,039
$q_{\text{Acetat,max}}, h^{-1}$	0,414	0,591	0,579	0,515
$Q_{\text{Ethanol,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,030	0,046	0,058	0,046
$q_{\text{Ethanol,max}}, h^{-1}$	0,106	0,385	0,164	0,223
$Q_{\text{Butyrat,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,013	0,014	0,011	0,000
$q_{\text{Butyrat,max}}, h^{-1}$	0,033	0,050	0,032	0,000
$Q_{\text{Butanol,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,014	0,027	0,065	0,002
$q_{\text{Butanol,max}}, h^{-1}$	0,037	0,049	0,182	0,045
$Q_{\text{Hexanoat,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,007	0,013	0,000	0,000
$q_{\text{Hexanoat,max}}, h^{-1}$	0,123	0,189	0,002	0,000
$Q_{\text{Hexanol,max}}, g L^{-1} h^{-1}$	0,000	0,020	0,012	0,000
$q_{\text{Hexanol,max}}, h^{-1}$	0,000	0,037	0,034	0,000

### Diskussion

Die Zugabe von bis zu 7,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl zu Satzprozessen im Rührkesselreaktor mit *C. carboxidivorans* führte zu Steigerungen der CO-Aufnahme, der Biomassebildung und der Alkoholproduktion um bis zu 100 % bei gleichzeitiger Verringerung der Produktion organischer Säuren. Ammonium stellt eine bedeutende Stickstoffquelle für Mikroorganismen dar. Daher kann die zusätzliche Zugabe von Vorteil für das Wachstum der Mikroorganismen sein. Außerdem wirkt Ammonium als mildes Reduktionsmittel und kann somit das Redoxpotential im Bioreaktor senken, was vorteilhaft für anaerobe Mikroorganismen sein kann (Liu et al. 2013).

Typische Größenordnungen des Anteils von Ammoniak in Synthesegasen aus Vergasungsprozessen liegen bei bis zu 4500 ppm NH<sub>3</sub> (Jeremiáš et al. 2014; Kremling 2018). Dieser Gasphasenanteil würde unter der Annahme vollständiger Absorption des Ammoniaks und keiner Aufnahme durch die Mikroorganismen mit einem Synthesegasstrom von 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> über eine Prozesszeit von 144 h zu Konzentrationen von

0,133 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> führen, was 7,1 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl entspricht. Daher würden in einem Synthesegasfermentationsprozess mit einem typischen Synthesegas mit 4500 ppm NH<sub>3</sub> keine negativen Auswirkungen auf *C. carboxidivorans* durch das Ammoniak erwartet werden. Stattdessen könnten Erhöhungen der Gasaufnahme, Biomasse- und Alkoholkonzentrationen durch den Ammoniumeintrag ermöglicht werden.

Anders als in den gezeigten Ergebnissen mit *C. carboxidivorans* wurden mit *C. ragsdalei* keine Ammoniakaufnahme mit einem Synthesegas mit 4000 ppm NH<sub>3</sub> bei Gasvolumenströmen von 0,067 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> beobachtet. Die Autoren geben dabei eine Akkumulation von 0,226 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (12,1 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl) nach 37 h an (Xu et al. 2011). Basierend auf einer einfachen Massenbilanz würde unter der Annahme vollständiger Absorption des Ammoniaks und keiner Aufnahme durch die Mikroorganismen unter den gegebenen Prozessparametern jedoch eine Konzentration von maximal 0,023 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> resultieren.

### 5.1.3. Schwefelwasserstoff als Spurenverunreinigung

Der Einfluss verschiedener definierter Konzentrationen von Schwefelwasserstoff wurde durch die Zugabe von Thioacetamid zur *in situ* Erzeugung von H<sub>2</sub>S (siehe Kapitel 4.6) zu Prozessbeginn in Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* untersucht. Die Effekte verschiedener Schwefelwasserstoffkonzentrationen im Medium sind dem Referenzsatzprozess in Abbildung 5-4 und Abbildung 5-5 gegenübergestellt.

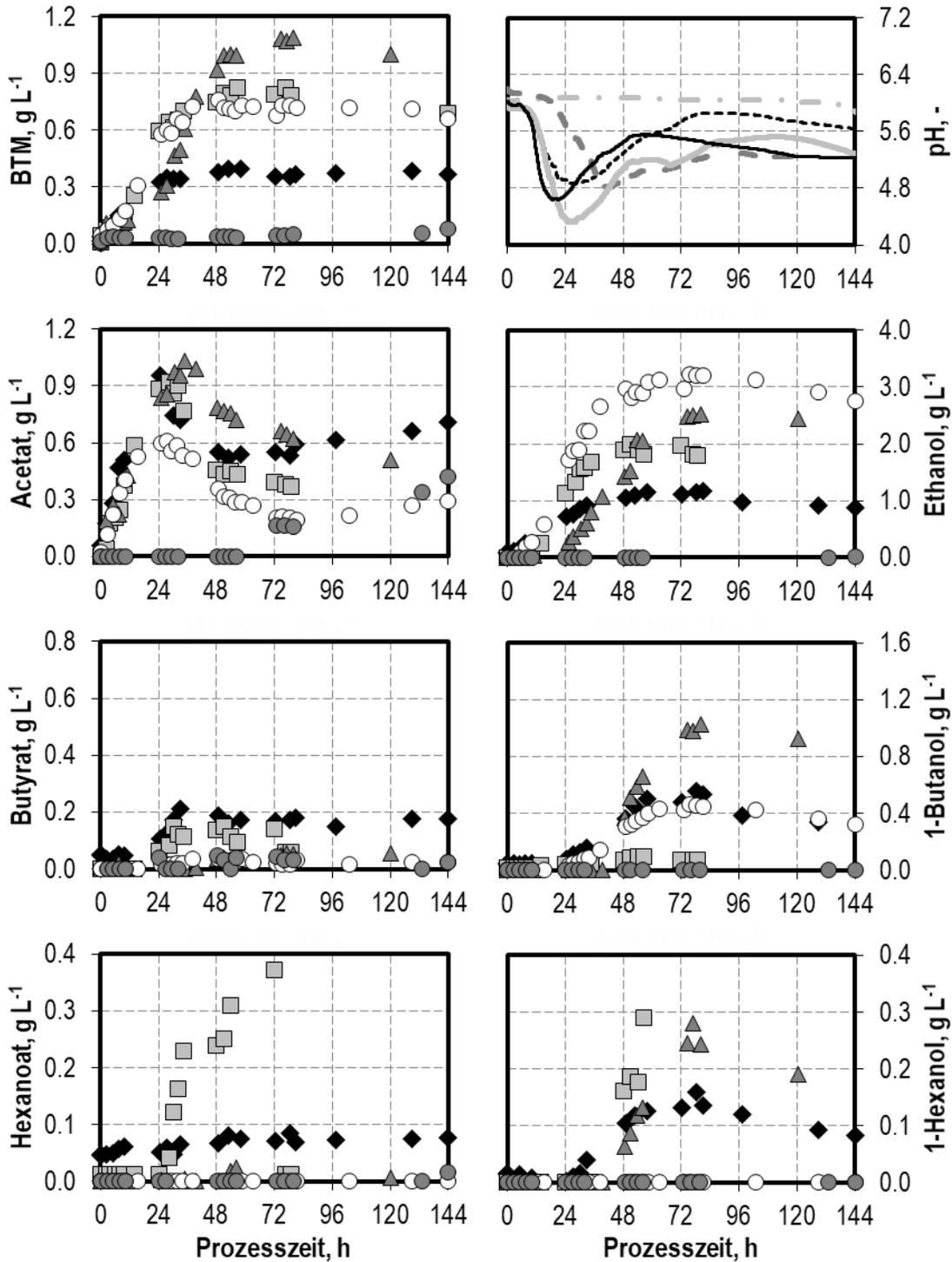
Bei initialer Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (in Form von 0,22 g L<sup>-1</sup> Thioacetamid) oder 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (in Form von 1,1 g L<sup>-1</sup> Thioacetamid) wurde die Zelldichte von *C. carboxidivorans* auf maximal 0,76 g L<sup>-1</sup> BTM erhöht, was mehr als einer Verdopplung gegenüber dem Referenzsatzprozess entspricht. Die höchste Biotrockenmassekonzentration von 1,09 g L<sup>-1</sup> wurde mit der Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (in Form von 2,2 g L<sup>-1</sup> Thioacetamid) erreicht, obwohl die initiale Verzögerungsphase dadurch deutlich erhöht wurde. Die initiale Zugabe von 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (in Form von 4,4 g L<sup>-1</sup> Thioacetamid) sorgte für eine deutlich stärkere Verzögerung des Wachstums bis nach 132 h Prozesszeit. Danach begann jedoch das Wachstum und es wurde zu Prozessende nach 244 h die gleiche finale Biotrockenmassekonzentration erreicht wie im Prozess mit 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (siehe Anhang Kapitel 10.1).

In der Prozesszeit von 144 h waren die Konzentrationen von Hexanoat und 1-Hexanol am höchsten in den Prozessen mit 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S mit 0,38 g L<sup>-1</sup> Hexanoat und 0,28 g L<sup>-1</sup> 1-Hexanol (Steigerungen um Faktor 4,75 und 1,8 im Vergleich zum Referenz-

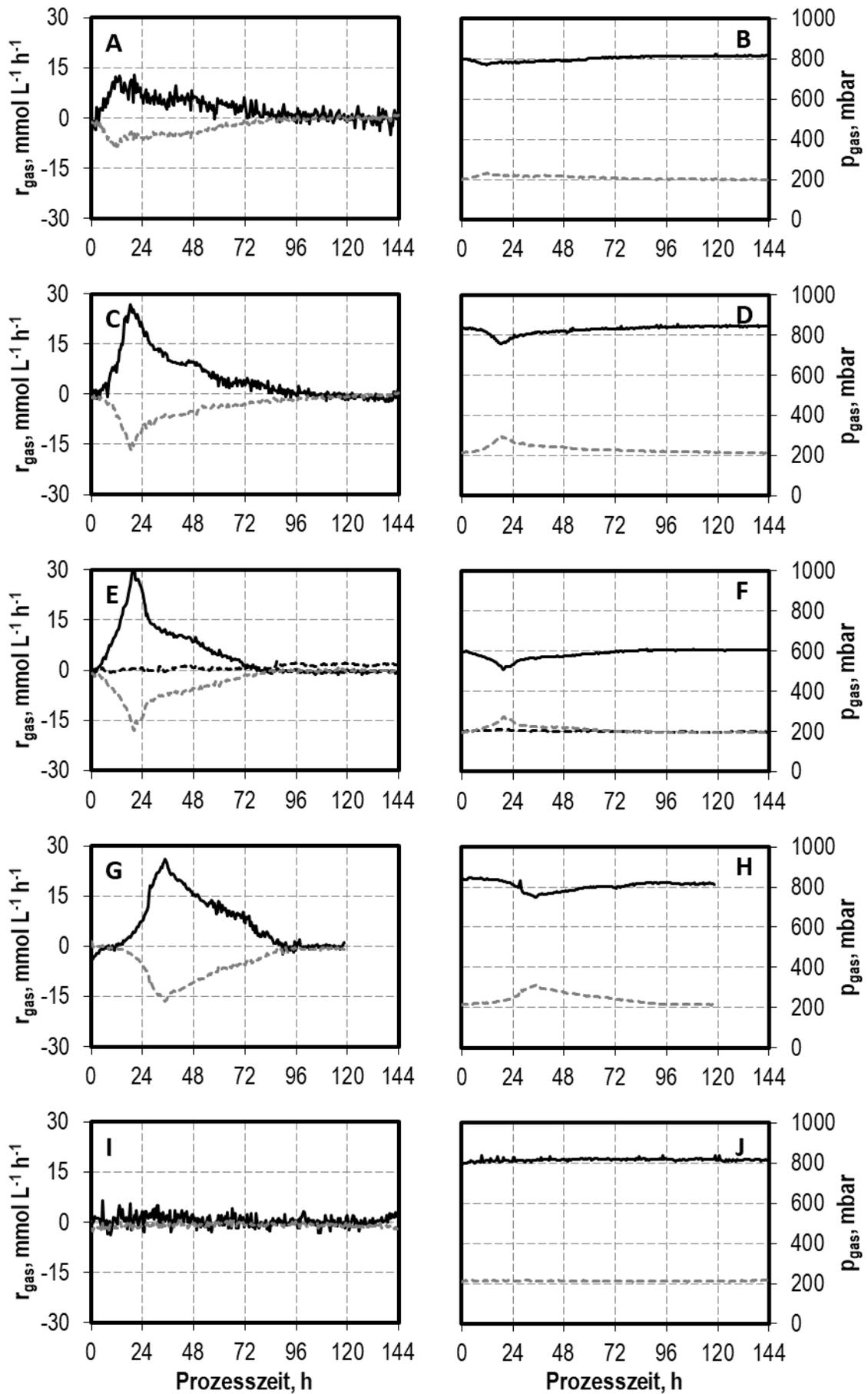
satzprozess). Die maximale Ethanolkonzentration hingegen wurde mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  erreicht, wobei bis zu  $3,23 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol (Steigerung um Faktor 3) erreicht wurden. Die höchste 1-Butanolkonzentration wurde bei Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  mit  $1,02 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol (Steigerung um Faktor 2) erreicht. Allerdings wurden im Prozess mit  $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  nach 244 h höhere Ethanol- und 1-Butanolkonzentrationen von  $3,59 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $1,09 \text{ g L}^{-1}$  1-Butanol erreicht. Allerdings wurde in diesem Prozess nur eine minimale 1-Hexanolproduktion gemessen.

Ebenso wie die Biomasse- und Alkoholkonzentrationen wurde durch die Zugaben von  $\text{H}_2\text{S}$  auch die maximale CO-Aufnahmerate und  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate im Vergleich zum Referenzsatzprozess gesteigert. Um die Zusammensetzung eines tatsächlichen biogenen Synthesegases besser abzubilden, wurde im Prozess mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  eine angepasste Gaszusammensetzung von 60 % CO, 20 %  $\text{CO}_2$  und 20 %  $\text{H}_2$  verwendet. Über die gesamte Prozesszeit dieses Satzprozesses wurde keine Aufnahme von Wasserstoff beobachtet, die außerhalb des Messrauschens läge. Die höchste maximale CO-Aufnahmerate lag mit  $31,6 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Prozess mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  vor. Trotz der stark erhöhten metabolischen Aktivität, die durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  erreicht wurde, sind die Gaspartialdrücke nur geringfügig durch die Aufnahme der Mikroorganismen gegenüber den Eingangspartialdrücken gesenkt. Zusammen mit dem hohen volumetrischen Leistungseintrag durch den Rührer kann daher von nicht CO-limitierten Bedingungen ausgegangen werden.

Die insgesamt aufgenommene Menge von CO und Bildung von  $\text{CO}_2$  (Tabelle 5-3) wurde ebenfalls durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  erhöht. Die CO-Aufnahme stieg um jeweils 47 % ( $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ ), 62 % ( $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ ), 88 % ( $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ ) und 190 % ( $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ ). Die CO: $\text{CO}_2$ -Verhältnisse lagen zwischen 1,39 und 1,47, sowie die Kohlenstoffbilanzwiederfindung zwischen 86,6 % und 99,9 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind aufgrund von nicht quantifizierten Mengen von nicht verwertetem Kohlenstoff im Medium (Hefeextrakt, Cystein und Thioacetamid) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.



**Abbildung 5-4** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie) und mit Zugabe definierter Konzentrationen von  $+0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie),  $+0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgraue gestrichelte Linie),  $+1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (weiße Kreise  $\circ$ , schwarze gepunktete Linie) und  $+2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (dunkelgraue Kreise  $\bullet$ , hellgraue Strich-Punkt-Linie) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (pH ungerregelt),  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Abweichende Gasmischung im Satzprozess mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ :  $600 \text{ mbar CO}$ ,  $200 \text{ mbar CO}_2$ ,  $200 \text{ mbar H}_2$ .



**Abbildung 5-5** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (schwarze gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (C und D), + 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (E und F), + 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (G und H) und + 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (I und J) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt), p<sub>CO</sub> = 800 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar. Abweichende Gaszusammensetzung bei + 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S: p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar, p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

**Tabelle 5-3** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>S-Konzentrationen durch Zugabe von Thioacetamid.

	Referenz- satzprozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 2,0 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
C im Medium, mmol C	9,94	12,61	23,25	36,56	63,19
CO-Aufnahme, mmol C	436,69	706,38	707,54	821,99	1 287,83
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	328,11	480,95	488,34	587,77	924,25
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,33	1,47	1,45	1,40	1,39
C in Produkten, mmol C	81,06	205,53	138,07	159,14	215,16
C in Biomasse, mmol C	13,98	31,68	41,11	28,07	30,59
C-Bilanz (Wiederfindung), %	94,74%	99,88%	91,34%	90,27%	86,60%

Die maximalen spezifischen Wachstumsraten sowie Produktbildungsrate der Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* mit H<sub>2</sub>S-Zugaben sind in Tabelle 5-4 dargestellt. Die Wachstumsrate wurde durch die Zugabe von H<sub>2</sub>S im Vergleich zum Referenzsatzprozess verringert. Die maximalen Alkoholbildungsrate wurden jedoch durch die Zugaben von H<sub>2</sub>S bis zu 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S gesteigert, wobei die höchsten Alkoholbildungsrate mit 0,101 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Ethanol mit 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,051 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol mit 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S erreicht wurden. Die maximale Acetatbildungsrate wurde gleichzeitig mit zunehmender H<sub>2</sub>S-Konzentration verringert.

**Tabelle 5-4** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>S-Konzentrationen.

	Referenzsatz- prozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 2,0 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
$\mu_{\max}$ , h <sup>-1</sup>	0,181	0,151	0,141	0,087	0,081
$Q_{\text{Acetat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,064	0,052	0,049	0,039	0,011
$q_{\text{Acetat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,414	0,528	0,591	0,406	0,285
$Q_{\text{Ethanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,030	0,095	0,101	0,066	0,082
$q_{\text{Ethanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,106	0,284	0,326	0,141	0,236
$Q_{\text{Butyrat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,013	0,008	0,002	0,004	0,001
$q_{\text{Butyrat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,033	0,021	0,003	0,004	0,020
$Q_{\text{Butanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,014	0,002	0,014	0,051	0,029
$q_{\text{Butanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,037	0,010	0,020	0,053	0,037
$Q_{\text{Hexanoat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,007	0,079	0,000	0,001	0,000
$q_{\text{Hexanoat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,123	0,112	0,000	0,009	0,000
$Q_{\text{Hexanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,000	0,097	0,000	0,010	0,000
$q_{\text{Hexanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,000	0,125	0,000	0,010	0,000

### Diskussion

Die initiale Zugabe von bis zu 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S führte zu Steigerungen der Biomassebildung (Faktor 2,1) sowie der Alkoholproduktion (Faktor 2,7 für Ethanol) im Vergleich zum Referenzsatzprozess. Die Zugabe von 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S führte zu einer deutlichen Verlängerung der Verzögerungsphase, ermöglichte aber die höchsten finalen Ethanol- und 1-Butanolkonzentrationen. H<sub>2</sub>S stellt zum einen eine Schwefelquelle für die Mikroorganismen dar, welche sich bei erhöhter Verfügbarkeit positiv auf die Mikroorganismen auswirken kann. Zum anderen ist H<sub>2</sub>S ein Reduktionsmittel, dass das Redoxpotential im Reaktor deutlich senkt und somit die Bedingungen für anaerobes Wachstum verbessern kann (Liu et al. 2013).

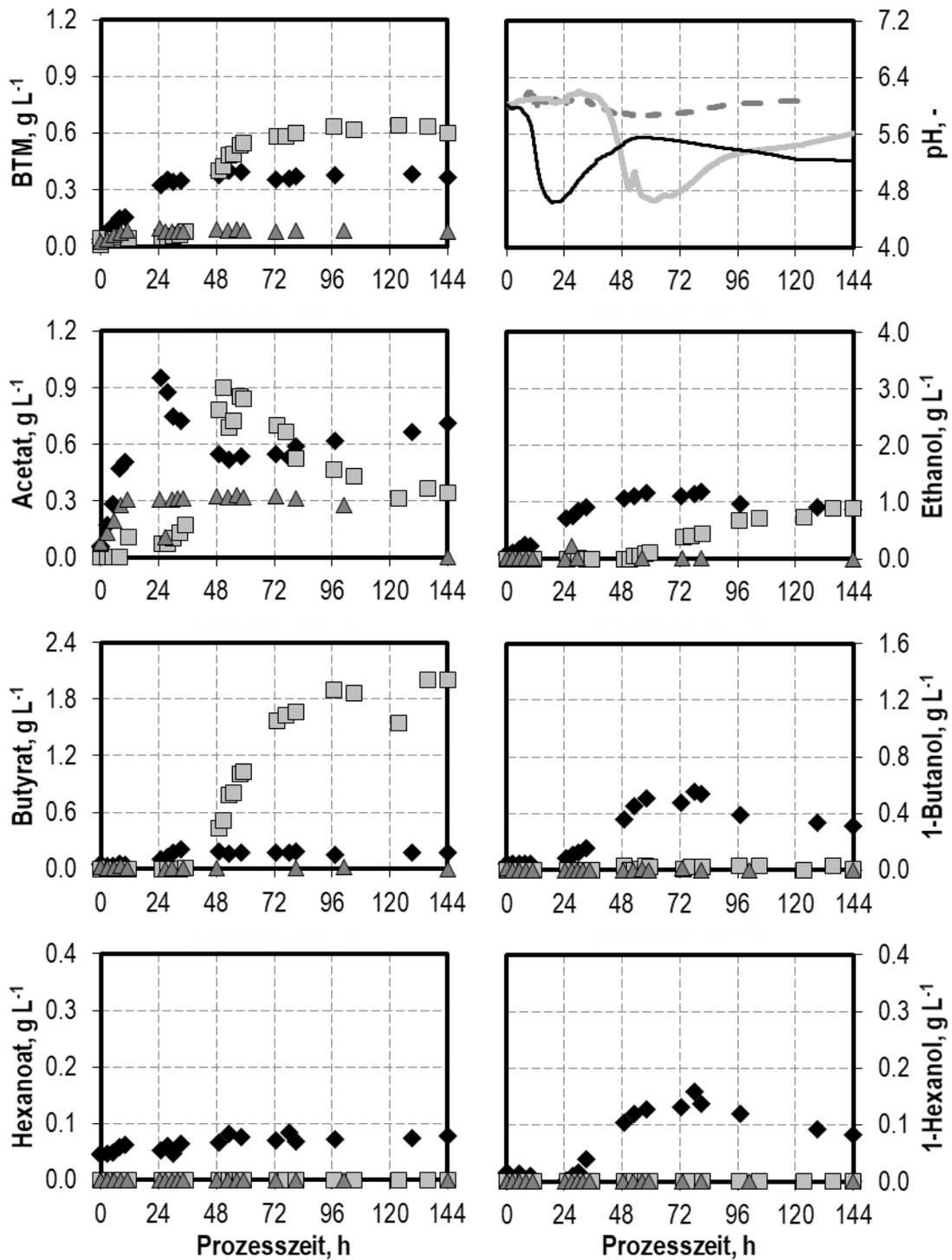
Eine typische Konzentration von H<sub>2</sub>S in biogenen Synthesegasen von bis zu 500 ppm H<sub>2</sub>S (Öhrman et al. 2012; Öhrman et al. 2013; Öhrman et al. 2014; Kremling 2018) würde in einem Prozess mit 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> über 144 h zur Akkumulation von maximal 0,33 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S führen unter der Annahme vollständiger Absorption im Medium und keiner Aufnahme durch die Mikroorganismen. Die Löslichkeit von H<sub>2</sub>S in reinem Wasser ist mit 1,83 mmol mol<sup>-1</sup> (entspricht 3,90 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S) bei 1013 mbar und 298,15 K relativ hoch (Battino et al. 2011), wobei die Henry-Konstante in reinem Wasser 3,1 bar mol<sup>-1</sup> bei 310 K und 1 bar beträgt (Suleimenov und Krupp 1994). Ein Stripping

von Schwefelwasserstoff außerhalb der Messgenauigkeit von 50 ppm wurde nur unmittelbar zu Prozessbeginn beobachtet, wobei über die Prozesszeit von 144 h insgesamt weniger als 10 % des zugegebenen H<sub>2</sub>S aus dem Reaktionsmedium ausgetragen wurden. Insgesamt sind typische Mengen von bis zu 500 ppm H<sub>2</sub>S in biogenem Synthesegas daher unkritisch für *C. carboxidivorans* anzusehen, da diese sich eher förderlich für Wachstum und Alkoholproduktion von *C. carboxidivorans* auswirken würden.

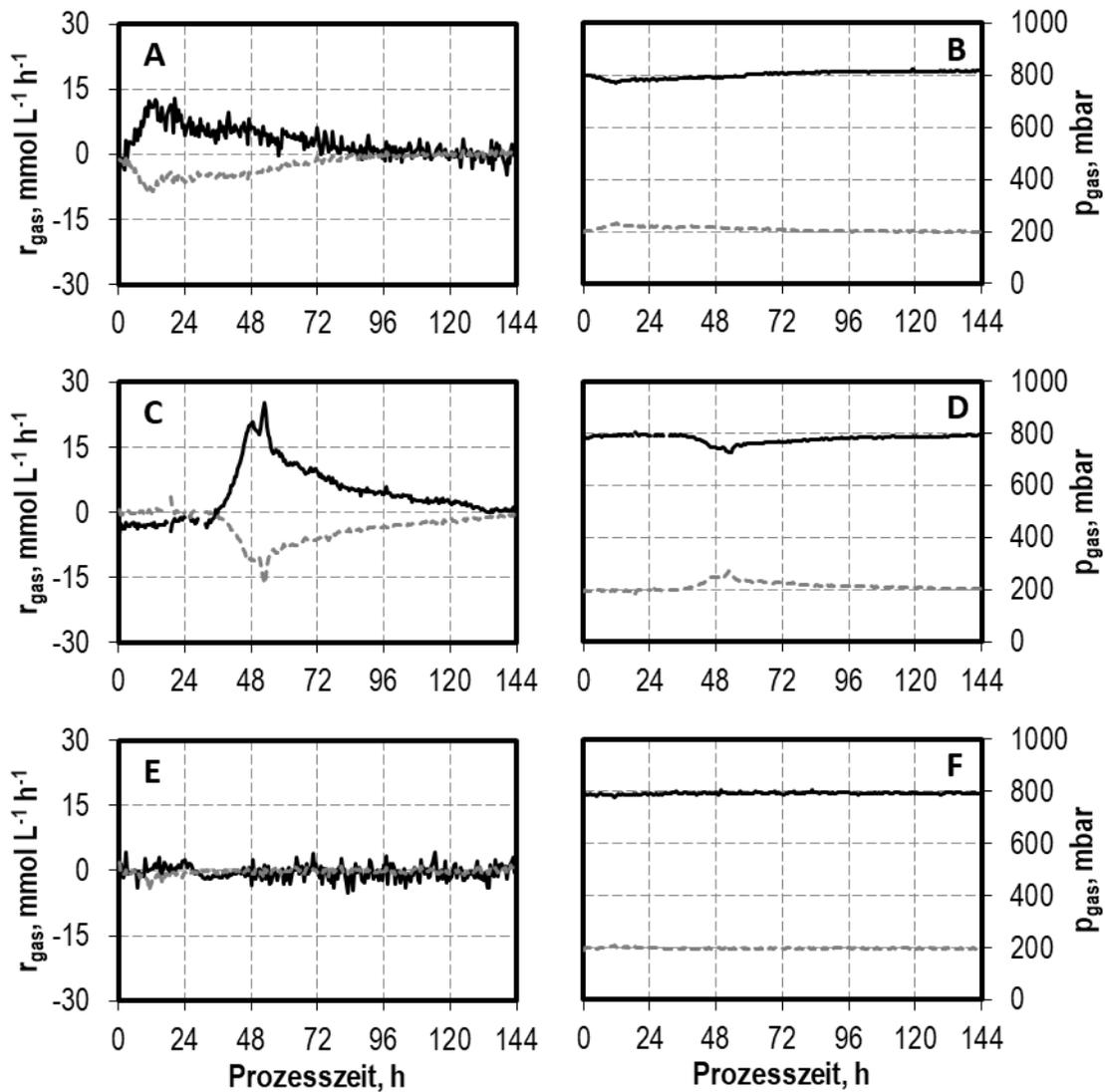
#### 5.1.4. Nitrat als Spurenverunreinigung

Der Einfluss verschiedener Nitratkonzentrationen auf *C. carboxidivorans* wurde durch die einmalige, initiale Zugabe definierter Konzentrationen von NaNO<sub>3</sub> zu Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor untersucht. Die Ergebnisse zu diesen Prozessen sind in Abbildung 5-6 und Abbildung 5-7 mit den Daten aus dem Referenzsatzprozess gegenübergestellt.

Die initiale Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> erhöhte die maximale Biomassekonzentration um 60 % im Vergleich zum Referenzprozess, verlängerte jedoch die initiale Verzögerungsphase deutlich auf 30 h. Während dieser Verzögerungsphase musste der pH einseitig mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> geregelt werden, da es zu einem Anstieg des pH über pH 6,1 kam. Im Vergleich zum Referenzsatzprozess begann auch die Produktion erst nach der Verzögerungsphase des Wachstums. Die maximalen Konzentrationen von Acetat und Ethanol wurden durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> leicht verringert auf 0,90 g L<sup>-1</sup> Acetat (6 % geringer) und 0,88 g L<sup>-1</sup> Ethanol (25 % geringer). Gleichzeitig wurde die Butyratkonzentration auf 2,04 g L<sup>-1</sup> Butyrat nach 144 h drastisch gesteigert im Vergleich zum Referenzsatzprozess (Steigerung um Faktor 9,7). Die anderen Produkte 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol wurden nicht in Mengen über der Bestimmungsgrenze gebildet. Initiale Zugabe höherer Nitratkonzentrationen inhibierte das Wachstum von *C. carboxidivorans* sowie die Produktbildung deutlich. Mit der Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> wurde außer einem geringen initialen Wachstum in den ersten 10 h keine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration in der Prozesszeit von 144 h beobachtet. Ebenso wurde außer einer geringen Acetatproduktion in den ersten 10 h Prozesszeit keine weitere Bildung anderer Produkte beobachtet.



**Abbildung 5-6** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie), mit Zugabe definierter Konzentrationen von  $+0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie) und  $+1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgraue gestrichelte Linie) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (einseitig geregelt mit  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  bei  $\text{pH} > \text{pH } 6,1$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ .



**Abbildung 5-7** Gasenaufnahmeraten und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie) und CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (C und D) und + 1,0 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (E und F) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt), p<sub>CO</sub> = 800 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

Die CO-Aufnahmerate und CO<sub>2</sub>-Bildungsrate wurde durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> gegenüber dem Referenzsatzprozess auf 28,3 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erhöht (Steigerung um Faktor 2,2), wobei jedoch die Zeit bis zum Erreichen der maximalen CO-Aufnahme deutlich verzögert wurde. Die insgesamt Aufnahme von CO und Bildung von CO<sub>2</sub> wurden durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> um 53 % bzw. 49 % erhöht (Tabelle 5-5). Das CO:CO<sub>2</sub>-Verhältnis wurde dabei auf 1,45 leicht erhöht. Die Kohlenstoffbilanzwiederfindung lag zwischen 94,7 % und 95,3 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind aufgrund von nicht quantifizierten Kohlenstoff in unvollständig verwertetem Kohlenstoff im

Medium (Hefeextrakt und Cystein) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.

**Tabelle 5-5** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener NaNO<sub>3</sub>-Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
C im Medium, mmol C	9,94	9,94	9,94
CO-Aufnahme, mmol C	436,69	666,05	<50,00
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	328,11	473,95	<20,00
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,33	1,41	-
C in Produkten, mmol C	81,06	146,10	11,54
C in Biomasse, mmol C	13,98	24,37	3,03
C-Bilanz (Wiederfindung), %	94,74%	95,33%	-

Die maximalen spezifischen Wachstumsraten sowie Produktbildungsraten der Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* mit verschiedenen Nitratkonzentrationen sind in Tabelle 5-6 dargestellt. Dabei zeigt sich eine deutliche Abnahme der maximalen spezifischen Wachstumsrate durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Die Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> führte zu einer deutlich höheren spezifischen Wachstumsrate aufgrund eines enormen initialen Wachstums während der ersten 10 h, in denen zwar keine Gasaufnahme erfolgte, jedoch durch den Nitratstoffwechsel Energie konserviert wurde (Kapitel 3.1.2). Dabei kann der Kohlenstoff beispielsweise aus dem im Medium enthaltenen Hefeextrakt oder Cystein gewonnen werden. Die Produktbildungsraten aller Produkte mit Ausnahme von Butyrat, welches durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> deutlich gesteigert wurde, wurden alle anderen Produktbildungsraten durch Nitratzugaben stark bis nahezu vollständig inhibiert.

**Tabelle 5-6** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener  $\text{NaNO}_3$ -Konzentrationen.

	Referenzsatzprozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
$\mu_{\text{max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,181	0,130	0,612
$Q_{\text{Acetat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,064	0,046	0,033
$q_{\text{Acetat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,414	0,378	4,928
$Q_{\text{Ethanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,030	0,021	0,000
$q_{\text{Ethanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,106	0,035	0,000
$Q_{\text{Butyrat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,013	0,069	0,000
$q_{\text{Butyrat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,033	0,165	0,000
$Q_{\text{Butanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,014	0,001	0,000
$q_{\text{Butanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,037	0,006	0,000
$Q_{\text{Hexanoat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,007	0,000	0,000
$q_{\text{Hexanoat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,123	0,000	0,000
$Q_{\text{Hexanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,000	0,000	0,000
$q_{\text{Hexanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,000	0,000	0,000

### Diskussion

Stickoxide können eine typische Spurenverunreinigung biogener Synthesegase darstellen. Zu diesen gehören verschiedene Spezies wie unter anderem NO, NO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Reines Stickstoffmonoxid verfügt über eine sehr geringe Löslichkeit in reinem Wasser bei 37 °C und 1013 mbar von 35 μmol mol<sup>-1</sup> (entspricht 0,065 mg L<sup>-1</sup>) (Battino et al. 2011) und reagiert nicht mit Wasser. Stattdessen fördert es die Reaktion von NO<sub>2</sub> mit Wasser, indem es die Bildung von N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ermöglicht (Joshi et al. 1985). In Prozessen mit NO wurde bei Konzentrationen zwischen 40 ppm und 160 ppm NO nahezu vollständig inhibiertes Wachstum und H<sub>2</sub>-Aufnahme von *C. carboxidivorans* in geschüttelten Anaerobflaschen mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als Substratgas festgestellt (Ahmed und Lewis 2007). Hierbei wurde eine nichtkompetitive Inhibierung der Hydrogenasen in *C. carboxidivorans* als Ursache beschrieben. Das besser lösliche NO<sub>2</sub> (Löslichkeit 445 μmol mol<sup>-1</sup>, entspricht 1,28 mg L<sup>-1</sup>) (Battino et al. 2011) disproportioniert in wässriger Lösung zu HNO<sub>2</sub> und HNO<sub>3</sub> (Joshi et al. 1985). Bei äquimolaren Verhältnissen von NO zu NO<sub>2</sub> werden bis zu 2 mol HNO<sub>2</sub> gebildet (Joshi et al. 1985). Bei saurem pH ist HNO<sub>2</sub> instabil und zerfällt in HNO<sub>3</sub> und NO (Chan et al. 1976). Ein biogenes Synthesegas aus der Flugstromvergasung von Biomasse enthält typischerweise unter 200 ppm NO<sub>x</sub> (Kremling 2018). Unter der Annahme vollständiger Absorption und keiner Aufnahme durch die Mikroorganismen nach 144 h bei einem Gasvolumenstrom von 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> könnten

0,006 mol L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub> gelöst werden. Die vollständige Umsetzung dieses NO<sub>2</sub> in Nitrat würde einer Konzentration von 0,55 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> entsprechen.

Die initiale Zugabe von Nitratkonzentrationen von 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> zu autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* führte zu einer ausgeprägten Verzögerungsphase mit gleichzeitig verringerter Alkoholproduktion bei gleichzeitig deutlich größerer Säureproduktion. Nitrat dient im Stoffwechsel einiger Clostridien als alternativer terminaler Elektronenakzeptor (Kapitel 3.1.2) (Emerson et al. 2019; Klask et al. 2020). Dabei wird Nitrat durch die Nitratreduktase zunächst zu Nitrit und anschließend weiter zu Ammoniak reduziert (Emerson et al. 2019). In Satzprozessen mit NaNO<sub>3</sub> wurde ein Anstieg des pH beobachtet, welcher durch Säurezugabe kontrolliert werden musste. Dieser pH-Anstieg kann auf die Bildung von Ammoniak durch Umsetzung von Nitrat zu Ammoniak zurückgeführt werden ((Gl. 3-3), Abbildung 3-3). Während der Prozesszeit, in der die Nitratumsetzung stattfand, wurde keine gleichzeitige Gasaufnahme beobachtet. Dies deutet auf eine starke Bevorzugung von Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor gegenüber CO hin, welche an den deutlich negativeren Gibbs'schen freien Enthalpien der Reaktionen mit Nitrat als Elektronenakzeptor liegt (siehe Kapitel 3.1.2). Während der Phase der Nitratverwertung stehen lediglich Hefeextrakt (1 g L<sup>-1</sup>) und Cystein (0,4 g L<sup>-1</sup>) als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, welche initial im Kultivierungsmedium vorlagen, da weder CO- noch CO<sub>2</sub>-Aufnahme beobachtet wurden. Im Prozess mit 1,0 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> lag das stärkste initiale Wachstum vor mit einer um Faktor 3 erhöhten maximalen spezifischen Wachstumsrate im Vergleich zum Referenzsatzprozess, welche jedoch bereits nach 10 h Prozesszeit endete. Während dieser Zeit wurde kein CO aufgenommen, was auf ein Wachstum allein mit dem Kohlenstoff im Medium (Cystein, Hefeextrakt) und Nitrat als Elektronenakzeptor hinweist (Emerson et al. 2019; Göbbels et al. 2021). Im Anschluss daran fand keine weitere metabolische Aktivität statt. Ein Zusammenbruch des Metabolismus in Gegenwart von NaNO<sub>3</sub> konnte von Klask et al. (2020) mit *C. ljungdahlii* beobachtet werden und wurde auf die Bildung und Akkumulation von Nitrit zurückgeführt.

Die Inhibierung der CO-Aufnahme in Gegenwart von Nitrat kann durch die Inhibierung von Hydrogenasen der Clostridien durch Stickoxidspezies und die Reduktion der Alkoholbildung durch die Inhibierung der Alkoholdehydrogenase durch Stickoxide verursacht werden (Ahmed et al. 2006; Gergel und Cederbaum 1996). Im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* zeigte *C. ljungdahlii* bei Zugabe von bis zu 15 mM Nitrat (entspricht 1,3 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>) in geschüttelten Anaerobflaschen mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als gasförmiges Substrat eine Steigerung der spezifischen Wachstumsrate um 75 % und eine Erhöhung des Alkohol-zu-Säure-Verhältnisses (Emerson et al. 2019). Andere sporenbildende Clostri-

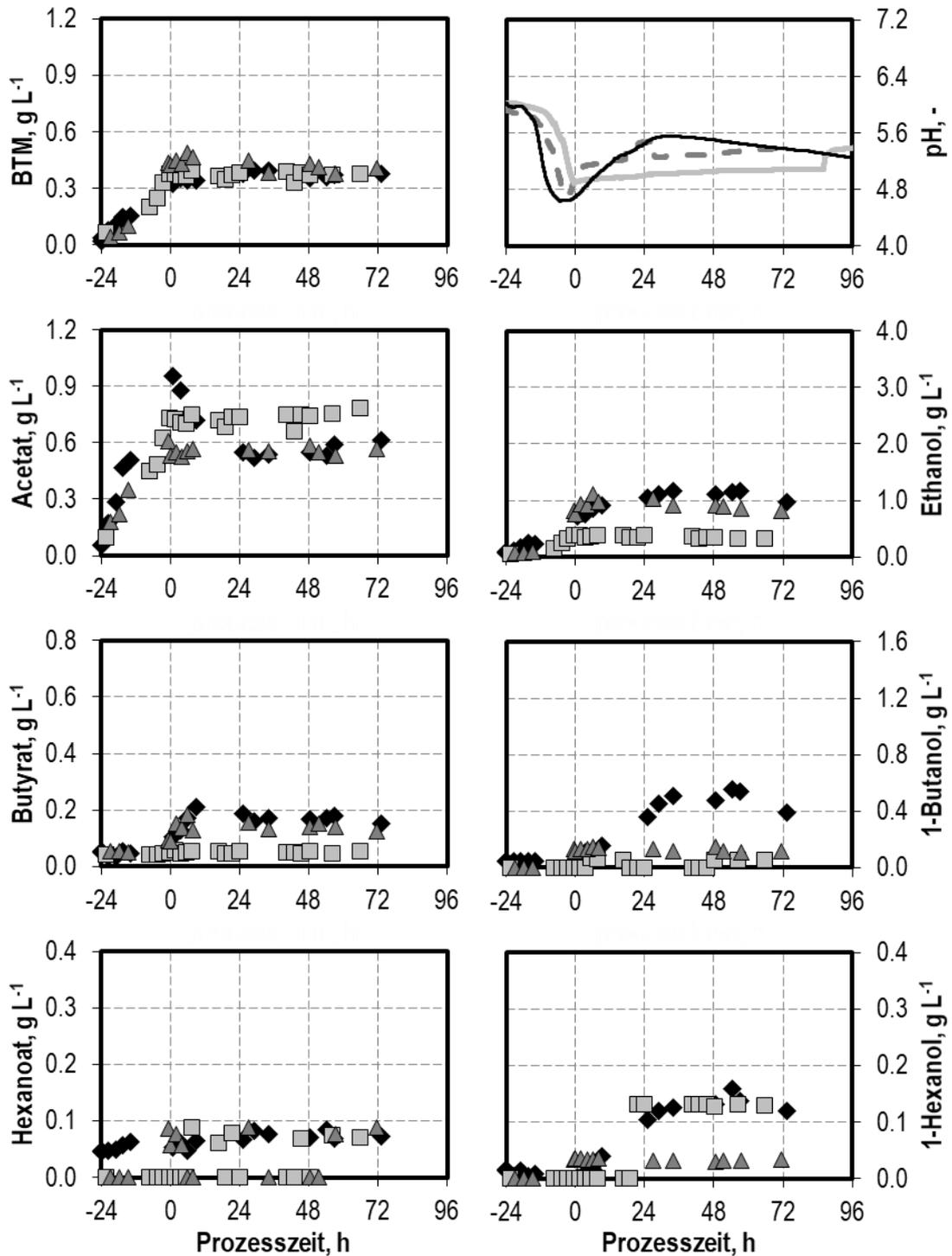
dien wie *Clostridium perfringens* zeigte eine drastisch verringerte Sporenbildung in Gegenwart von Nitratsalzen. Die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$  führte zu einer Reduktion des Wachstums und der Sporenanzahl um zwei Größenordnungen mit *C. perfringens* (Yasugi et al. 2016), wobei die Nitrat- und Nitritreduktase in Gegenwart der Nitratsalze hoch reguliert wurden. Daher wurde von den Autoren gefolgert, dass die Bildung von Nitrit aus Nitrat den negativen Effekt hervorrufen könnte (Yasugi et al. 2016; Klask et al. 2020).

### 5.1.5. Nitrit als Spurenverunreinigung

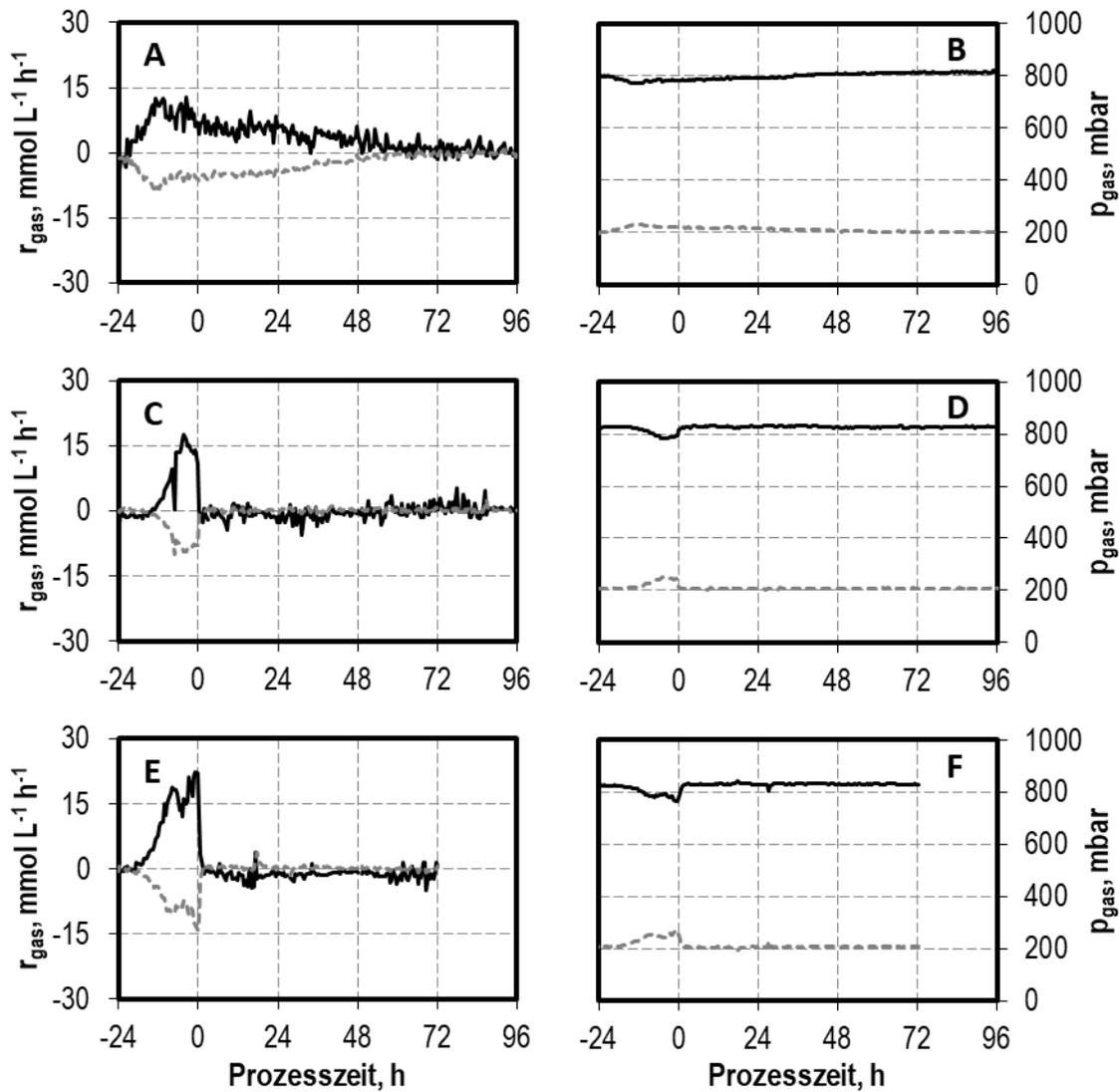
Der Einfluss von Nitrit auf *C. carboxidivorans* wurde durch die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  in Satzprozessen im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor untersucht. Im Unterschied zu den Prozessen mit Ammonium, Schwefelwasserstoff und Nitrat wurde die Zugabe von Nitrit stets erst durchgeführt, nachdem bereits eine Biotrockenmassekonzentration von mindestens  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  im Bioreaktor vorlag, da in Voruntersuchungen in geschüttelten Anaerobflaschen kein Wachstum mit initialen Nitritkonzentrationen festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Daten für die Nitritzugabe sind in Abbildung 5-8 und Abbildung 5-9 mit dem Referenzsatzprozess gegenübergestellt. Die Prozesszeit 0 h repräsentiert dabei den Zeitpunkt der Zugabe von  $\text{NaNO}_2$ .

Unabhängig von der zugegebenen Menge zwischen  $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  wurde im Anschluss keine Veränderung der Produktkonzentrationen aller Produkte mehr beobachtet. Aufgrund eines Abweichenden Zugabezeitpunktes sind die Ergebnisse der Zugabe von  $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  in Abbildung 5-8 nicht gezeigt. Bis zum Zeitpunkt der Zugabe zeigten die Satzprozesse eine hohe Reproduzierbarkeit der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Acetat und Ethanol zum Referenzsatzprozess. Nach der Zugabe von Nitrit fand jedoch weder Abbau von Acetat noch Produktion von Ethanol statt. Die längerkettigen Produkte, deren Produktion im Referenzsatzprozess erst nach dem Zugabezeitpunkt in den Prozessen mit Nitritzugabe erfolgte, wurde in den Prozesse mit Nitrit gar nicht außerhalb der Messgenauigkeit beobachtet.

Sowohl die  $\text{CO}$ -Aufnahme als auch die  $\text{CO}_2$ -Bildung endeten in den Prozessen mit Nitritzugabe für alle verwendeten Nitritkonzentrationen schlagartig und blieben bis zum Prozessende auf  $0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Gegensatz zum Referenzsatzprozess, in dem noch bis Prozessende Gasaufnahme stattfand. Die Nitritzugabe unterband den autotrophen Metabolismus von *C. carboxidivorans*, führte jedoch nicht zu einem Absterben der Biomasse, da die Biotrockenmassekonzentration auch nach der Nitritzugabe bis Prozessende stabil auf dem Niveau des Referenzsatzprozesses blieb.



**Abbildung 5-8** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie), mit Zugabe definierter Konzentrationen von + 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie) und + 0,5 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgraue gestrichelte Linie) bei  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt),  $F_{\text{gas}} = 5,0\text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013\text{ mbar}$ ,  $n = 1200\text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 800\text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200\text{ mbar}$ . Prozesszeit 0 h zeigt den Zugabezeitpunkt der NaNO<sub>2</sub>-Lösung.



**Abbildung 5-9** Gasaufnahme- und Gaspartialdruckverläufe der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie) und CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (C und D) und + 0,5 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (E und F) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt), p<sub>CO</sub> = 800 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar. Prozesszeit 0 h zeigt den Zugabezeitpunkt der NaNO<sub>2</sub>-Lösung.

### Diskussion

Wie in Kapitel 5.1.4 erläutert ist das Lösen von Stickoxidspezies in wässriger Lösung kritisch, da dadurch sowohl Nitrat als auch Nitrit entstehen können. Insbesondere bei gleichzeitiger Anwesenheit von äquimolaren Verhältnissen von 1 mol NO und 1 mol NO<sub>2</sub> können bis zu 2 mol HNO<sub>2</sub> entstehen (Joshi et al. 1985). Unter der Annahme, dass NO und NO<sub>2</sub> äquimolar mit einer typischen Konzentration in biogenen Synthesegasen von bis zu 200 ppm NO<sub>x</sub> im Synthesegas vorhanden sind (Kremling 2018) und sich bei

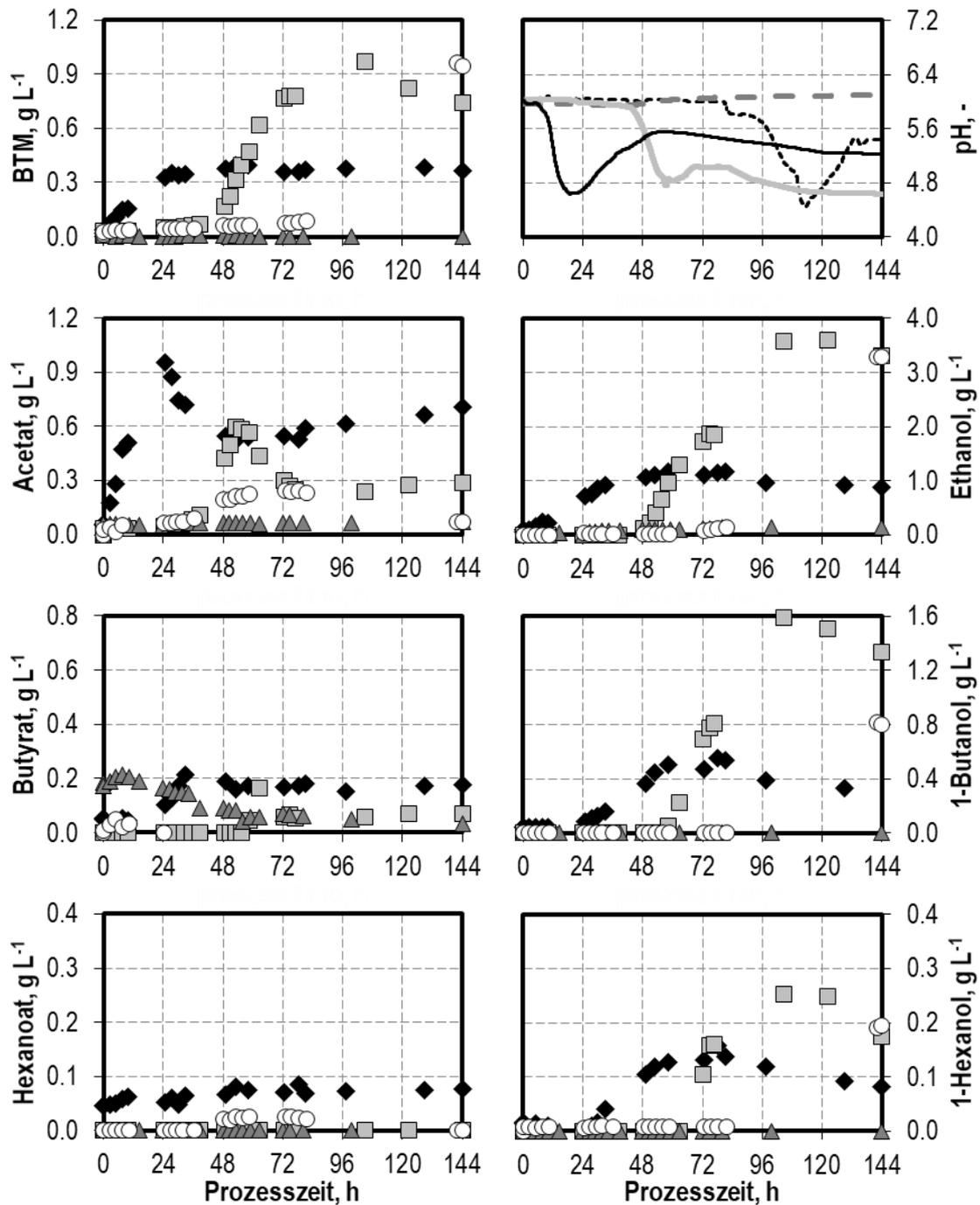
0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> für 144 h vollständig im Medium lösen und nicht von den Mikroorganismen abgebaut werden, könnten bis zu 0,006 mol L<sup>-1</sup> Nitrit (entspricht 0,41 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>) im Medium entstehen.

Die Zugabe selbst geringer Konzentrationen von 0,01 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> zu autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* nach dem Erreichen von 0,3 g L<sup>-1</sup> BTM führte zu einer sofortigen Einstellung der CO-Aufnahme und des gesamten Metabolismus von *C. carboxidivorans*. *C. carboxidivorans* verfügt über die Gene für eine Nitritreduktase (Li et al. 2015), welche auch für die Verwertung von Nitrat in der Reduktion zu Ammonium (siehe Kapitel 3.1.2 und 5.1.4) benötigt wird (Emerson et al. 2019). Andere anaerobe Mikroorganismen wie *Moorella thermoacetica* sind in der Lage in Gegenwart von bis zu 0,35 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (0,005 mol L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu wachsen und dieses als alternativen terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Seifritz et al. 2003).

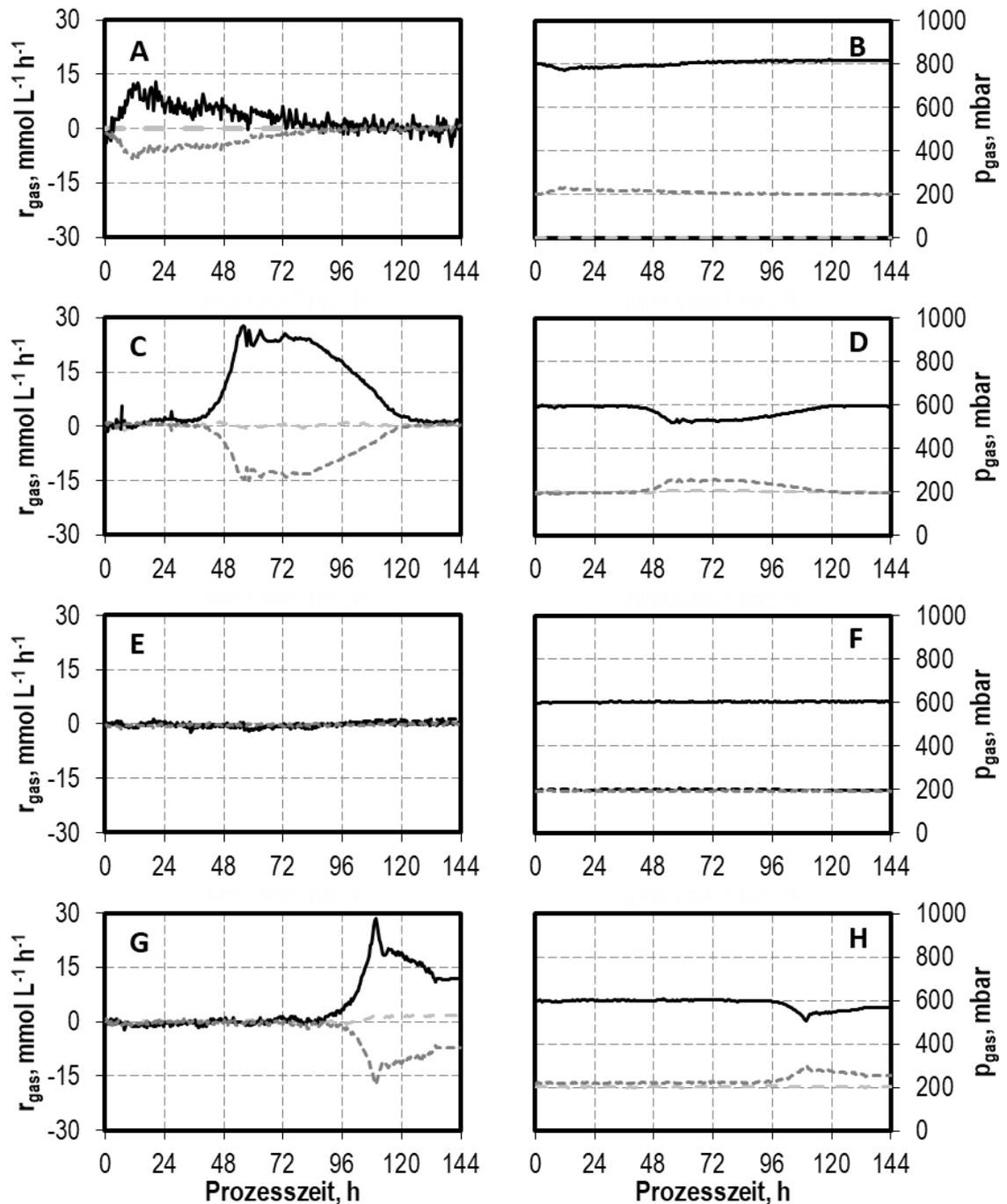
Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von *C. carboxidivorans* gegenüber NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und insbesondere NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ist die Anwesenheit von Stickoxiden in biogenen Synthesegasen kritisch für Synthesegasfermentationsprozess mit *C. carboxidivorans*. Die Anwesenheit der gelösten Stickoxidspezies inhibiert die Aufnahme des gasförmigen Synthesegaskohlenstoffs und ist daher für Gasfermentationsprozesse hochproblematisch. Daher ist die Entfernung von Stickoxidspezies aus Synthesegasen ein wichtiger Aspekt der Synthesegasreinigung.

### 5.1.6. Kombinationen von Spurenverunreinigungen

Aufbauend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit einzelnen Spurenverunreinigungen wurden Untersuchungen mit ausgewählten Kombinationen der Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und NO<sub>x</sub> in autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* durchgeführt. Dabei wurden die Kombination von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S sowie von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S sowie zuletzt von 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> untersucht. Die Spurenverunreinigungskonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie einzeln zu Steigerungen von Wachstum und Alkoholproduktion führten beziehungsweise nur geringe Inhibierungen zeigten. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit kombinierten Spurenverunreinigungen sind in Abbildung 5-10 und Abbildung 5-11 dargestellt.



**Abbildung 5-10** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie) und mit Zugabe definierter Kombinationen von Konzentrationen von  $+ 5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie),  $+ 5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $+ 0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgraue gestrichelte Linie) und  $+ 5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (weiße Kreise  $\circ$ , schwarze gepunktete Linie) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt; pH-Regelung nur einseitig mit  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  auf  $\text{pH } 6,0$  im Satzprozess mit  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$   $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ). Substratgaszusammensetzung:  $p_{\text{CO}} = 800 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  (Referenzsatzprozess),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$  (Prozesse mit kombinierten Spurenverunreinigungen).



**Abbildung 5-11** Gasaufnahmeraten und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe von Kombinationen definierter Spurenverunreinigungen + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und + 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (C und D), + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (E und F) und + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, + 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und + 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (G und H) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt). Substratgaszusammensetzung: p<sub>CO</sub> = 800 mbar und p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar (Referenzsatzprozess), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar und p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar (Prozesse mit kombinierten Spurenverunreinigungen).

Der Satzprozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  zeigte eine ausgeprägte etwa 36 h dauernde Verzögerungsphase des Wachstums. Allerdings erreichte er mit maximal  $0,97 \text{ g L}^{-1} \text{ BTM}$  eine um den Faktor 2,5 höhere maximale Biotrockenmassekonzentration als der Referenzsatzprozess. Die Produktbildung wurde ebenfalls zeitlich verzögert, wobei mit maximal  $3,59 \text{ g L}^{-1} \text{ Ethanol}$  eine um Faktor 3 höhere Ethanolkonzentration im Vergleich zum Referenzsatzprozess erreicht wurde. Ebenso wurden die maximalen Konzentrationen der längerkettigen Alkohole um Faktor 2,8 für 1-Butanol und um 67 % für 1-Hexanol gesteigert sowie die finale Acetatkonzentration um 59 % gesenkt. Die weitere Erhöhung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration bei gleicher Ammoniumkonzentration von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  führte hingegen zu keinem Biomassewachstum und keiner Produktbildung während der gesamten Prozesszeit von 144 h.

Die Kombination von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  führte zu einer noch deutlich stärker ausgeprägten Verzögerungsphase von 82 h als die Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  ohne Nitrat. Bis dahin kam es nur zu einer Verdoppelung der Biotrockenmassekonzentration gegenüber der initialen BTM bei der Inokulation. Während dieser Zeit war das einzige gebildete Produkt Acetat mit maximal  $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ Acetat}$  neben einer sehr geringen Menge Butyrat mit  $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ Butyrat}$ . Bis zum Prozessende nach 144 h stiegen jedoch die Biomasse- und Alkoholkonzentrationen stark an und erreichten höhere maximale Werte als der Referenzsatzprozess und ähnlich hohe maximale BTM und Alkoholkonzentrationen von Ethanol und 1-Butanol wie der Prozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  ohne  $\text{NaNO}_3$ .

Die  $\text{CO}$ -Aufnahmeraten zeigen, dass durch die Zugaben von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  sowie von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  zwar die  $\text{CO}$ -Aufnahme um 36 h und 88 h verzögert wurde, allerdings auch die maximalen  $\text{CO}$ -Aufnahmeraten um Faktor 2,2 und um 72 % gesteigert wurden. Die über die Prozesszeit von 144 h aufgenommene Menge von  $\text{CO}$  (Tabelle 5-7) wurde dabei um Faktor 2,8 und 67 % erhöht. Im Prozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  wurde hingegen keine  $\text{CO}$ -Aufnahme im gesamten betrachteten Prozesszeitraum beobachtet. Die Kohlenstoffbilanzwiederfindungen lagen zwischen 90,0 % und 95,1 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind aufgrund von nicht quantifizierten Kohlenstoff in unvollständig verwertetem Kohlenstoff im Medium (Hefeextrakt und Cystein) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.

**Tabelle 5-7** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse, sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener Kombinationen definierter Spurenverunreinigungen aus Synthesegasen NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>S und NaNO<sub>3</sub>.

	Referenzsatzprozess	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
C im Medium, mmol C	9,94	12,61	23,25	12,61
CO-Aufnahme, mmol C	436,69	1241,65	730,90	< 50
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	328,11	822,82	471,56	< 50
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,33	1,51	1,55	-
C in Produkten, mmol C	81,06	269,19	208,75	37,29
C in Biomasse, mmol C	13,98	37,08	37,03	0,31
C-Bilanz (Wiederfindung), %	94,74%	90,02%	95,12%	-

Die maximale spezifische Wachstumsrate sowie die maximalen volumetrischen und spezifischen Produktbildungsraten sind in Tabelle 5-8 dargestellt. Dabei zeigen sich deutliche Anstiege der maximalen volumetrischen Produktbildungsraten der Alkohole bei Satzprozessen mit der Zugabe von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S sowie bei der Zugabe von 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>. Gleichzeitig wurden die maximalen Acetatbildungsraten im Vergleich zum Referenzsatzprozess gesenkt. Für den Satzprozess mit 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> sind die Absolutwerte der ermittelten Raten jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da in der Phase des größten Wachstums und der größten Produktbildung keine Messpunkte verfügbar waren. Daher sind aufgrund der geringen Zahl von Messpunkten die Raten nur als Abschätzungen zu sehen. Für den Satzprozess mit 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl und 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S können keine Raten ermittelt werden, da es weder zu Wachstum noch zu Produktbildung in diesem Prozess kam.

**Tabelle 5-8** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener Kombinationen definierter Spurenverunreinigungen aus Synthesegasen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NaNO}_3$ .

	Referenz- satzpro- zess	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
$\mu_{\text{max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,181	0,090	0,037	-
$Q_{\text{Acetat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,064	0,037	0,005	-
$q_{\text{Acetat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,414	0,322	0,138	-
$Q_{\text{Ethanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,030	0,072	0,061	-
$q_{\text{Ethanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,106	0,172	0,234	-
$Q_{\text{Butyrat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,013	0,022	0,013	-
$q_{\text{Butyrat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,033	0,053	0,378	-
$Q_{\text{Butanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,014	0,051	0,079	-
$q_{\text{Butanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,037	0,068	0,037	-
$Q_{\text{Hexanoat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,007	0,000	0,000	-
$q_{\text{Hexanoat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,123	0,000	0,015	-
$Q_{\text{Hexanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,000	0,017	0,008	-
$q_{\text{Hexanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,000	0,022	0,021	-

### Diskussion

Die Untersuchungen zu ausgewählten Kombinationen der Spurenverunreinigungen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  (in Form von Thioacetamid) und  $\text{NaNO}_3$  aus Synthesegasen zeigte im Vergleich zu den Untersuchungen mit einzelnen Spurenverunreinigungen (Kapitel 5.1.2, Kapitel 5.1.3 und Kapitel 5.1.4) eine deutlich längere initiale Verzögerungsphase.

Obwohl mit 5,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{S}$  eine Kombination von zwei Komponenten gewählt wurde, die individuell das Wachstum verstärkten (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3), wurde durch die gleichzeitige Zugabe dieser Komponenten die Verzögerungsphase auf 36 h verlängert. Trotzdem wurden die maximalen Konzentrationen von Biomasse und Ethanol im Satzprozess mit 5,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{S}$  gegenüber dem Referenzsatzprozess und gegenüber den Prozessen mit 5,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (61 % mehr BTM, 88 % mehr Ethanol) sowie dem Prozess mit 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{S}$  (17 % mehr BTM, 74 % mehr Ethanol) deutlich gesteigert. Durch die Kombination von 5,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{S}$  wurde trotz der initialen Verzögerungsphase die insgesamt höchste maximale Ethanolkonzentration aller Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* in dieser Arbeit erreicht. Die initiale Verzögerungsphase kann möglicherweise auf eine notwendige Adaption der Mikroorganismen an die neuen Bedingungen im Bioreaktor zurückgeführt werden, da in den

Vorkulturflaschen keine Spurenverunreinigungen vorlagen. Nach dieser Adaptionsphase wurde das Wachstum und die Produktbildung im Vergleich zum Referenzsatzprozess jedoch verstärkt und diese übertrafen sogar die Verbesserungen im Vergleich zu den Prozessen mit den individuellen Zugaben von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{H}_2\text{S}$  (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3).

Im Satzprozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$  zeigte sich eine deutlich stärkere Wachstumsverzögerung als im Satzprozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  sowie ebenfalls länger als im Satzprozess mit  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$ , bei dem Wachstum und CO-Aufnahme um bis zu 86 h verzögert waren. Wie im Satzprozess mit  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$  (Kapitel 5.1.4) wurde im Satzprozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$  während der ersten 24 h der pH einseitig mit  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  geregelt, um einen Anstieg über pH 6,0 zu vermeiden. Dieser Anstieg deutet auf die Umsetzung von Nitrat in Ammoniak durch *C. carboxidivorans* hin (Kapitel 3.1.2) (Emerson et al. 2019). Gleichzeitig wird in dieser Phase bei einem sehr geringen Biomassewachstum keinerlei CO-Aufnahme oder  $\text{CO}_2$ -Bildung beobachtet. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor im Vergleich zu  $\text{CO}_2$  thermodynamisch deutlich besser geeignet ist (Emerson et al. 2019). Dadurch wird so lange Nitrat verfügbar ist kein Gas aufgenommen. Erst nachdem das Nitrat im Reaktionsmedium zur Neige ging, begann die Gasaufnahme und somit die Bildung von Acetat ab 24 h Prozesszeit. Das Biomassewachstum und die CO-Aufnahme blieben jedoch bis 86 h Prozesszeit sehr gering und die maximale Acetatkonzentration war nach dieser Zeit mit  $0,23 \text{ g L}^{-1}$  Acetat sehr gering im Vergleich zu anderen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans*. Diese Phase könnte auf eine zusätzlich notwendige Adaption an die Komponenten  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{H}_2\text{S}$  hindeuten. Im Anschluss daran fand ein ähnlich starkes Wachstum wie im Satzprozess mit  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  ohne Nitrat statt. Die starke Steigerung der Säureproduktion auf Kosten der sinkenden Alkoholproduktion wie im Satzprozess mit  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$  (Kapitel 5.1.4) wurde durch die Kombination von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{NaNO}_3$  nicht beobachtet.

Die Konzentrationen von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{H}_2\text{S}$  entsprechen Gelöstkonzentrationen im Reaktionsmedium unter der Annahme vollständiger Absorption der Komponente und weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen während der gesamten Prozesszeit von 144 h bei einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{min}^{-1}$  und einem Gasanteil von 3 169  $\text{NH}_3$  und 45 ppm  $\text{H}_2\text{S}$ . Im Vergleich zu biogenen Synthesegasen aus der Flugstromvergasung biogener Reststoffe, die typischerweise bis zu 4 500 ppm  $\text{NH}_3$  und bis zu 500 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  enthalten (Kremling 2018; Jeremiáš et al. 2014; Öhrman et al. 2013), sind diese Werte unter den maximal möglichen Anteilen. Allerdings

ist zu beachten, dass in einem tatsächlichen industriellen Gasfermentationsprozess mit biogenem Synthesegas die Spurenverunreinigungen langsam über die Zeit akkumulieren und nicht wie in diesen Untersuchungen unmittelbar zu Prozessbeginn vorliegen. Daher könnte eine Adaption der Mikroorganismen an die Verunreinigungen erfolgen, sodass sich möglicherweise statt der Wachstumsverzögerung nur die beobachteten Steigerungen von Biomassewachstum und Ethanolproduktion einstellen.

Ebenso wie im Satzprozess mit  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  wurde in der Kombination von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  die starke Bevorzugung der Verwertung von Nitrat gegenüber  $\text{CO}_2$  durch *C. carboxidivorans* beobachtet (Kapitel 5.1.4). Diese Konzentration entspräche einem Anteil von 49 ppm  $\text{NO}_x$  unter der Annahme vollständiger Absorption und Umsetzung des Stickstoffs aus  $\text{NO}_x$  in Nitrat sowie weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen bei einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  über die gesamte Prozesszeit von 144 h. Daher kann  $\text{NO}_x$  mit typischen Größenordnungen für biogene Synthesegase von bis zu 200 ppm (Kremling 2018) kritisch für Synthesegasfermentationsprozesse mit *C. carboxidivorans* sein. Eine selektive Reinigung des Gases beziehungsweise eine Reduktion der Bildung von  $\text{NO}_x$  im Vergasungsprozess wäre somit erforderlich. Trotzdem könnte möglicherweise bei geringen  $\text{NO}_x$ -Anteilen nach einer Adaption der Mikroorganismen auch eine Steigerung von maximaler Biomasse- und Alkoholkonzentration erwartet werden.

Die Zugabe der Spurenverunreinigungskonzentrationen  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  führte zu einer vollständigen Inhibierung von Wachstum, Produktbildung und Gasaufnahme über die gesamte Prozesszeit von 144 h. Obwohl die beiden Konzentrationen individuell zu deutlichen Steigerungen von Wachstum und Alkoholproduktion führten (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3), könnte diese Spurenverunreinigungskombination einen zu großen Stressfaktor für die Mikroorganismen darstellen. Allerdings wurde bei diesem Satzprozess auch eine bisher ungeklärte hohe Butyratkonzentration kurz nach Prozessbeginn gemessen, welche im späteren Prozessverlauf abnahm. Diese Butyratkonzentration lässt sich anhand aller anderen Prozessparameter nicht erklären. Daher müsste dieser Satzprozess gegebenenfalls reproduziert werden, um sicherzustellen, dass der Effekt auf Wachstum und Produktbildung von den Spurenverunreinigungen zurückzuführen ist und nicht auf möglicherweise vorhandenes Butyrat im Medium. Trotzdem ist aufgrund der Ergebnisse mit  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  davon auszugehen, dass die höhere  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration zu einer stärkeren Inhibierung führen könnte.

## 5.2. Satzprozesse mit *Clostridium carboxidivorans* mit biogenem Synthesegas<sup>2</sup>

Für die Realgasfermentationen wurde ein Synthesegas aus der Vergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) vom Projektpartner (TUM, Lehrstuhl für Energiesysteme) bereitgestellt. Da die Zusammensetzung dieses biogenen Synthesegases vor allem in Bezug auf den CO-Anteil von den bisherigen Reingasprozessen abwich, wurden zusätzlich weitere Prozesse mit artifiziellem Synthesegas aus Reingasen mit einer dem biogenen Synthesegas ähnlichen Zusammensetzung durchgeführt. Die Zusammensetzung des biogenen Synthesegases ist in Tabelle 5-9 gezeigt und mit dem als Referenz verwendeten artifiziellem Synthesegas gegenübergestellt.

**Tabelle 5-9** Zusammensetzung von artifiziellem Synthesegas, biogenem Synthesegas aus der Vergasung biogener Reststoffe (torrefiziertes Holz, TorrCoal) ohne Sauerstoffreduktion und mit Sauerstoffreduktion in einem Rohrreaktor mit 30 g Pd-Katalysator (Actisorb O3) und 10 g Silicagel bei 50 °C und 56,5 s hydraulischer Verweilzeit.

Gaskomponente	Artifizielles Synthesegas	Biogenes Synthesegas	Biogenes Synthesegas mit O <sub>2</sub> -Reduktion
N <sub>2</sub>	36,7 % ± 0,3 %	34,4 % ± 2,9 %	30,2 % ± 3,8 %
CO	30,1 % ± 0,4 %	30,3 % ± 1,7 %	31,6 % ± 3,4 %
CO <sub>2</sub>	10,3 % ± 0,2 %	9,4 % ± 0,7 %	10,0 % ± 1,1 %
H <sub>2</sub>	18,5 % ± 0,1 %	22,2 % ± 0,4 %	21,9 % ± 1,7 %
CH <sub>4</sub>	<< 0,1 %	0,46 % ± 0,009 %	0,51 % ± 0,034 %
O <sub>2</sub>	<< 50 ppm	2.459 ppm ± 122 ppm	293 ppm ± 5 ppm
NH <sub>3</sub>	< 1 ppm	3.099 ppm ± 181 ppm	766 ppm ± 344 ppm
H <sub>2</sub> S	< 1 ppm	< 50 ppm	< 50 ppm
NO <sub>x</sub>	< 1 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm
HCN	< 1 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm

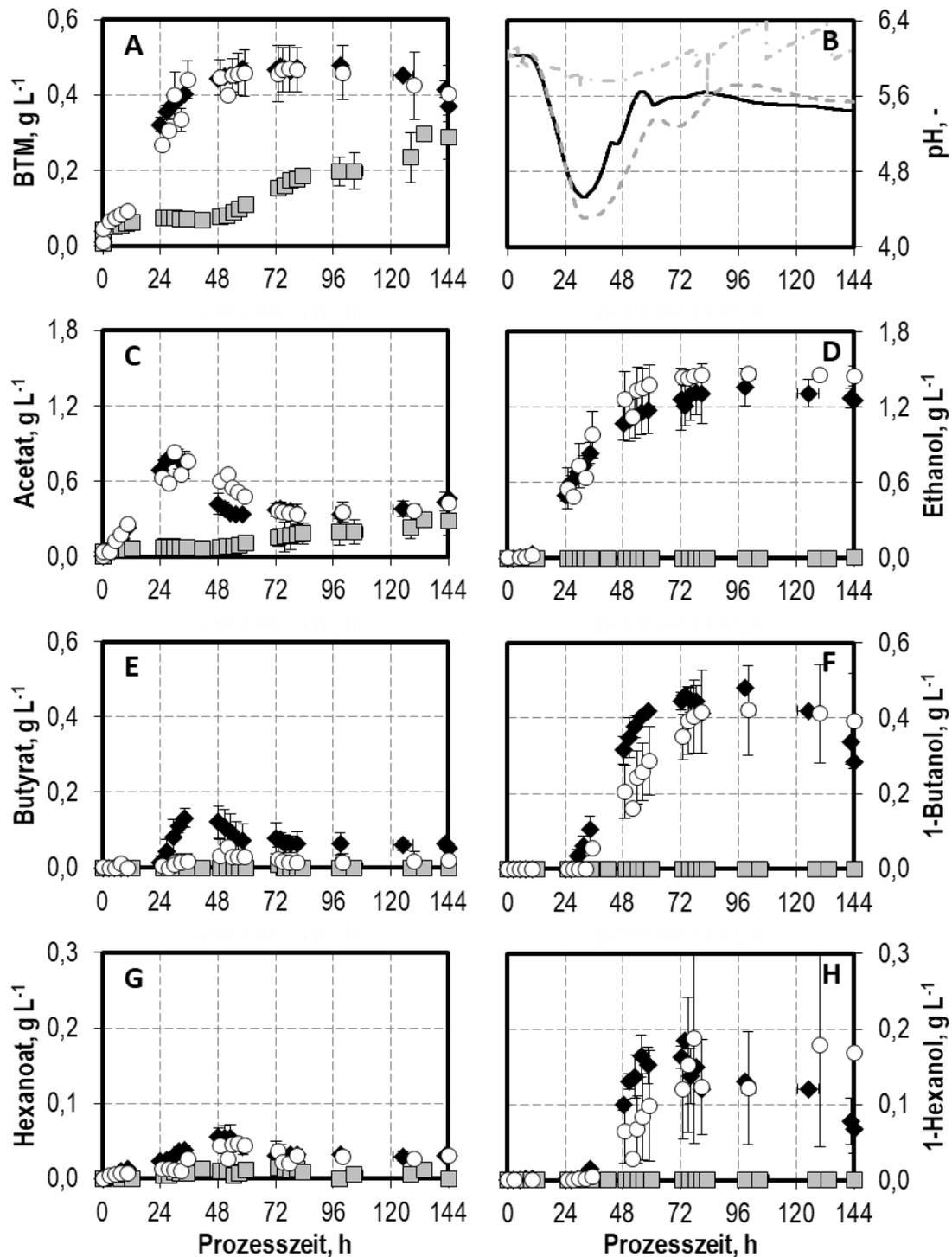
Die Satzprozesse mit biogenem Synthesegas zeigen eine deutliche Verringerung des Wachstums und der Produktbildung bei keiner beobachteten Alkoholproduktion und keiner Gasaufnahme in der gesamten Prozesszeit von 144 h (Abbildung 5-12, Abbildung 5-13). Das Redoxpotential stieg in den Prozessen mit biogenem Synthesegas im Gegensatz zum Referenzsatzprozess langsam stetig an und erreichte kritische Werte von -200 mV, woraufhin es durch die Zugabe von jeweils 0,4 g L<sup>-1</sup> Cystein-Hydrochlorid

<sup>2</sup> Die Ergebnisse dieses Kapitels sind wissenschaftlich publiziert in:

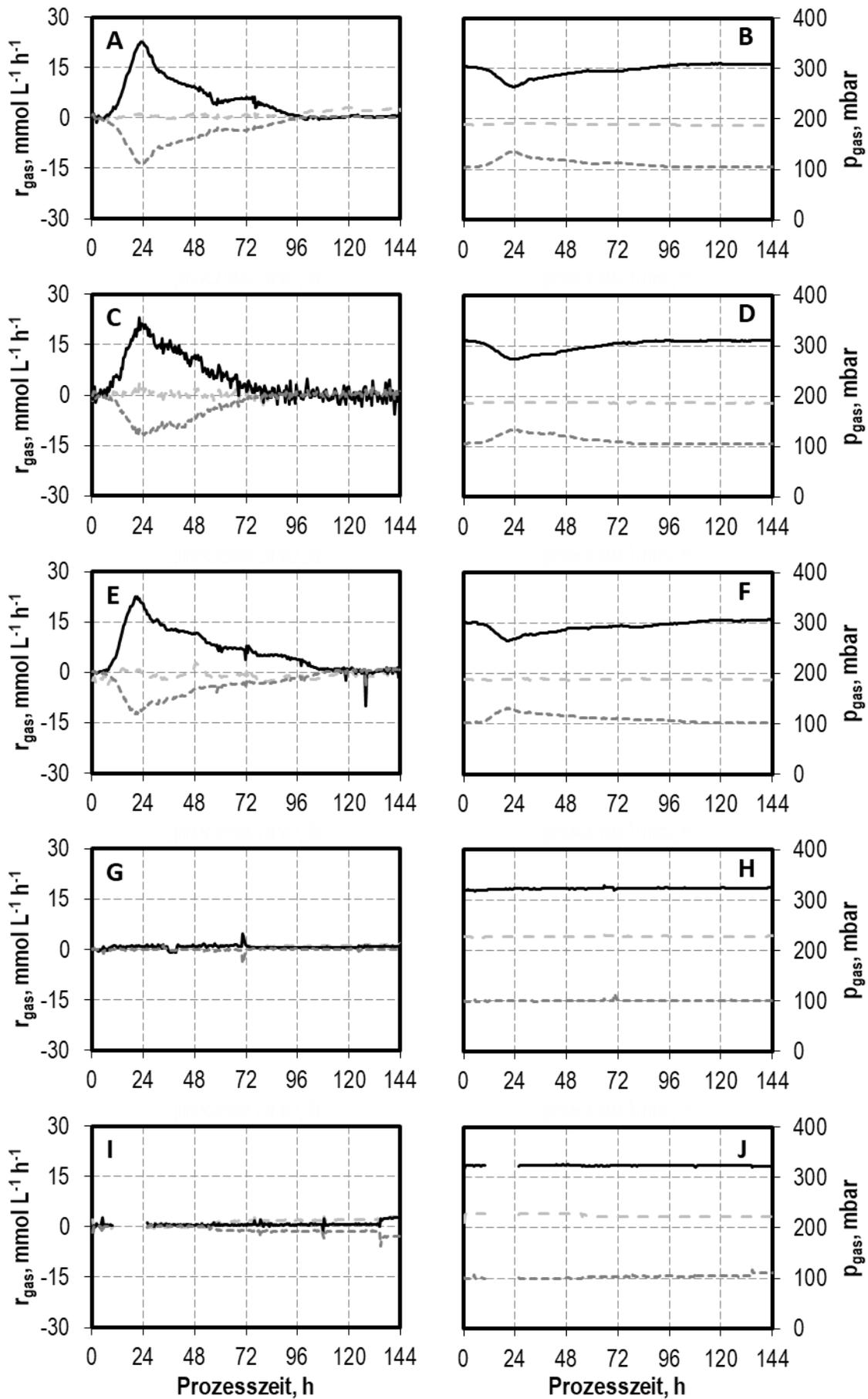
Rückel, Anton; Oppelt, Anne; Leuter, Philipp; Johne, Philipp; Fendt, Sebastian; Weuster-Botz, Dirk (2022): Conversion of syngas from entrained flow gasification of biogenic residues with *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium autoethanogenum*. In *Fermentation* 8 (9), p. 465. doi:10.3390/fermentation8090465.

als Reduktionsmittel nach 32 h und 78 h gesenkt wurde (Abbildung 5-14 B). In einem zweiten Prozess mit biogenem Synthesegas wurde das Redoxpotential durch eine Regelung mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  Cys-HCl über die gesamte Prozesszeit unter  $-250 \text{ mV}$  gehalten (Abbildung 5-14 B). Trotz der Regelung ergab sich kaum eine Veränderung des Biomassewachstums im Vergleich zum ersten Prozess mit biogenem Synthesegas. Lediglich am Prozessende wurde eine etwas höhere Biomassekonzentration erreicht. Allerdings wurde auch im zweiten Satzprozess mit biogenem Synthesegas trotz der hohen Zugabe von  $2 \text{ g L}^{-1}$  Cystein, die für die Redoxkontrolle benötigt wurde, keine Alkoholproduktion quantifiziert.

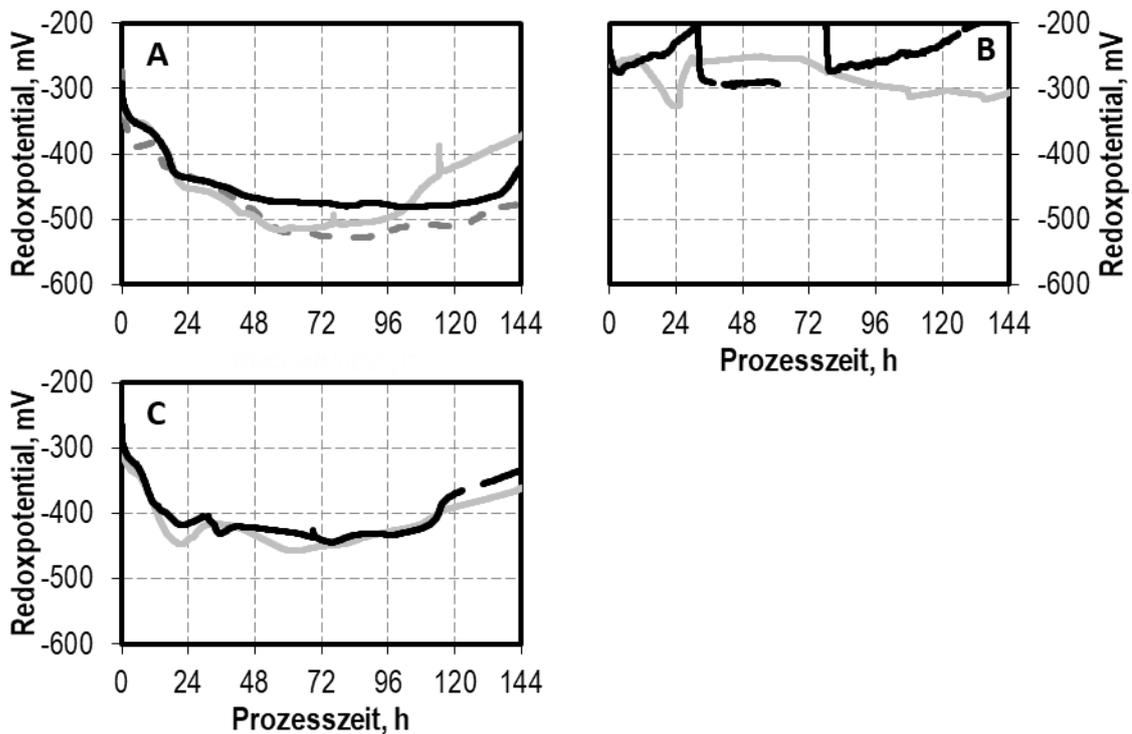
In weiteren Satzprozessen wurde dem Rührkesselreaktor ein Rohrreaktor mit einer Füllung aus Palladiumkatalysator (Actisorb O3) und Silicagel (siehe Kapitel 4.7) vorgeschaltet, um die  $\text{O}_2$ -Konzentration im biogenen Synthesegas zu reduzieren. Der Katalysator besteht dabei aus Kügelchen mit Durchmessern zwischen 2 mm und 5 mm aus einem Aluminiumoxidträger ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), der mit Palladium bedampft ist. Durch das im biogenen Synthesegas enthaltene  $\text{H}_2$  wird das  $\text{O}_2$  am Katalysator zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert. Anschließend wird das  $\text{H}_2\text{O}$  am Silicagel gebunden. Der Rohrreaktor wurde bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer mittleren hydraulischen Verweilzeit des Gases von  $56,5 \text{ s}$  ( $64,3 \text{ h}^{-1}$ ) betrieben. Durch den Rohrreaktor konnte so der Sauerstoffanteil im Synthesegas von  $2459 \text{ ppm}$  auf  $293 \text{ ppm}$   $\text{O}_2$  gesenkt werden. Dieser Rohrreaktor wurde zur Begasung von zwei unabhängigen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* genutzt (Abbildung 5-12, Abbildung 5-14, Abbildung 5-15). Diese beiden Satzprozesse zeigen eine größere Abweichung zueinander als die Referenzsatzprozesse. Es konnten aber vergleichbare Mittelwerte für die Konzentrationen von Biotrockenmasse, Acetat und Ethanol im Vergleich zu den Referenzsatzprozessen beobachtet werden. Trotz der hohen Reproduzierbarkeit der Konzentrationen von Biotrockenmasse, Acetat und Ethanol ergaben sich hohe Abweichungen zwischen den beiden Prozessen mit biogenem Synthesegas für die Konzentration von 1-Hexanol.



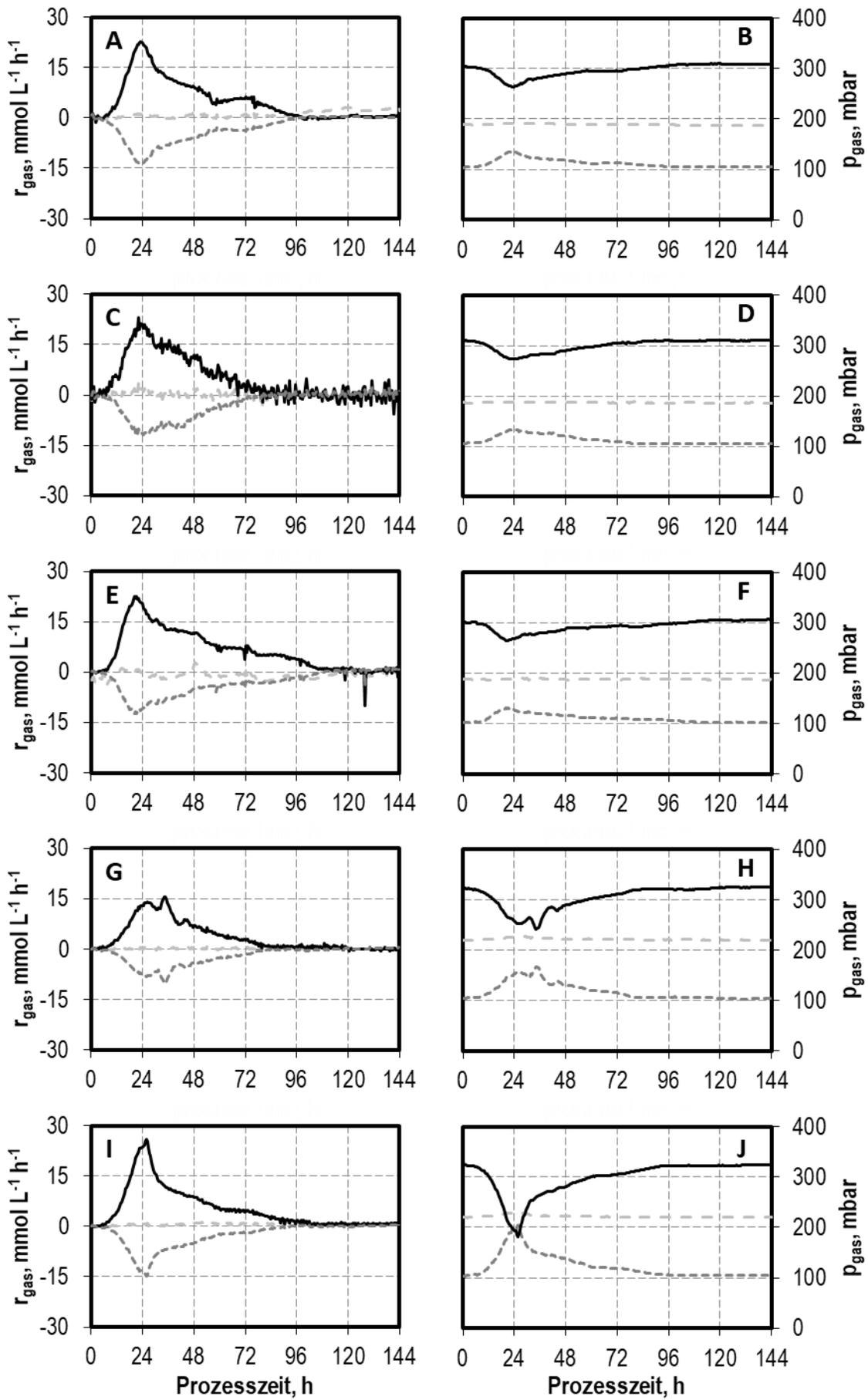
**Abbildung 5-12** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* mit artifiziellem Synthesegas mit  $p_{CO} = 300$  mbar,  $p_{CO_2} = 100$  mbar,  $p_{H_2} = 220$  mbar,  $p_{N_2} = 380$  mbar (schwarze Raute ◆, schwarze Linie) und biogenem Synthesegas aus der Flugstromvergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) ohne Sauerstoffreduktion (hellgraue Quadrate ◻, hellgraue Strich-Punkt-Linie) und mit Sauerstoffreduktion (weißer Kreis ○, hellgraue gestrichelte Linie).  $T = 37$  °C,  $pH_{initial} = pH$  6,0 (ungeregelt),  $F_{gas} = 5,0$  L h<sup>-1</sup>,  $p_{abs} = 1013$  mbar  $n = 1200$  min<sup>-1</sup> ( $P V^{-1} = 15,1$  W L<sup>-1</sup>). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Referenzsatzprozessen. Satzprozesse mit biogenem Synthesegas wurden jeweils zweimal durchgeführt und Fehlerbalken zeigen die Minimal- und Maximalwerte dieser Prozesse.



**Abbildung 5-13** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess mit artifiziellem Synthesegas ( $p_{\text{CO}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 220 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{N}_2} = 380 \text{ mbar}$ ) (A bis F) und mit biogenem Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion ohne Redoxpotentialregelung (G und H) und ohne Sauerstoffreduktion mit Redoxregelung mit Cystein auf unter  $-250 \text{ mV}$  (I und J) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt).



**Abbildung 5-14** Redoxpotentialverläufe bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess mit artifiziellem Synthesegas (A), in Prozessen mit biogenem Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion (B) und in Prozessen mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion (C). Referenzsatzprozesse wurden dreimal durchgeführt. Prozesse mit biogenem Synthesegas mit *C. carboxidivorans* wurden jeweils zweimal durchgeführt.



**Abbildung 5-15** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess mit artifiziellem Synthesegas ( $p_{\text{CO}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 220 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{N}_2} = 380 \text{ mbar}$ ) (A bis F) und mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion (G bis J) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (pH ungeregelt).

Die erreichten maximalen CO-Aufnahmeraten lagen mit  $14,9 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $24,0 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion im Durchschnitt auf dem gleichen Niveau wie der Referenzsatzprozess mit artifiziellem Realgas mit durchschnittlich  $20,5 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  am Maximum. Die insgesamt aufgenommene Menge CO lag mit  $388,99 \text{ mmol CO}$  mit biogenem Synthesegas im Vergleich zu  $444,38 \text{ mmol CO}$  mit artifiziellem Synthesegas etwas niedriger (Tabelle 5-10). In den Prozessen mit biogenem Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion wurden nahezu keine CO-Aufnahme oder CO<sub>2</sub>-Bildung außerhalb des Messrauschens quantifiziert. Die Kohlenstoffbilanzwiederfindung der Prozesse, in denen CO-Aufnahme stattfand, lagen zwischen 93,9 % und 91,5 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind aufgrund von nicht quantifizierten Mengen von nicht verwertetem Kohlenstoff im Medium (Hefeextrakt und Cystein) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.

**Tabelle 5-10** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse, sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzprozess mit artifiziellem Synthesegas und mit biogenem Synthesegas mit und ohne Sauerstoffreduktion im Rohrreaktor mit Pd-Katalysator (Actisorb O3). Der Referenzsatzprozess mit artifiziellem Gas wurde dreimal durchgeführt. Die Prozesse mit biogenem Synthesegas wurden jeweils zweimal durchgeführt und Mittelwert sowie Abweichung zu Minimal-/Maximalwert sind gezeigt.

	Referenzsatz- prozess	Biogenes Synthe- segas ohne O <sub>2</sub> -Reduktion	Biogenes Synthe- segas mit O <sub>2</sub> -Re- duktion
C im Medium, mmol C	9,94	21,5 ± 4,95	9,94
CO-Aufnahme, mmol C	444,38 ± 37,21	< 50	388,99 ± 57,12
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	281,45 ± 27,02	< 50	228,92 ± 42,56
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,58 ± 0,02	-	1,71 ± 0,07
C in Produkten, mmol C	127,23 ± 9,52	3,14 ± 2,88	119 ± 14,26
C in Biomasse, mmol C	18,19 ± 0,32	11,01 ± 1,58	18 ± 2,35
C-Bilanz (Wiederfindung), %	93,94 ± 0,51	-	91,48 ± 1,73

Die ermittelten maximalen Raten von Wachstum und Produktbildung (Tabelle 5-11) zeigen, dass mit dem biogenen Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion die maximale spezifische Wachstumsrate sowie alle volumetrischen Produktbildungsraten deutlich gesenkt wurden. In den Prozessen mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion

wurde zwar die maximale spezifische Wachstumsrate im Durchschnitt von  $0,118 \text{ h}^{-1}$  im Referenzsatzprozess auf  $0,083 \text{ h}^{-1}$  gesenkt. Allerdings wurde die maximale volumetrische Ethanolbildungsrate auf  $0,047 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um 34 % gesteigert. Die maximalen Bildungsraten längerkettiger Alkohole wurden jedoch gleichzeitig reduziert.

**Tabelle 5-11** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol, Butyrat, 1-Butanol, Hexanoat und 1-Hexanol bei Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzprozess mit artifiziellem Synthesegas und mit biogenem Synthesegas mit und ohne Sauerstoffreduktion im Rohrreaktor mit Pd-Katalysator (Actisorb O3). Der Referenzsatzprozess mit artifiziellem Gas wurde dreimal durchgeführt. Die Prozesse mit biogenem Synthesegas wurden jeweils zweimal durchgeführt und Mittelwert sowie Abweichung zu Minimal-/Maximalwert sind gezeigt.

	Referenzsatzprozess	Biogenes Synthesegas ohne O <sub>2</sub> -Reduktion	Biogenes Synthesegas mit O <sub>2</sub> -Reduktion
$\mu_{\text{max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,118 \pm 0,030$	$0,040 \pm 0,017$	$0,083 \pm 0,007$
$Q_{\text{Acetat,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,047 \pm 0,008$	$0,004 \pm 0,002$	$0,033 \pm 0,001$
$q_{\text{Acetat,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,540 \pm 0,115$	$0,064 \pm 0,028$	$0,370 \pm 0,032$
$Q_{\text{Ethanol,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,036 \pm 0,008$	$0,030 \pm 0,000$	$0,047 \pm 0,013$
$q_{\text{Ethanol,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,191 \pm 0,007$	$0,430 \pm 0,029$	$0,223 \pm 0,080$
$Q_{\text{Butyrat,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,018 \pm 0,004$	$0,013 \pm 0,000$	$0,002 \pm 0,002$
$q_{\text{Butyrat,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,052 \pm 0,009$	$0,185 \pm 0,012$	$0,007 \pm 0,007$
$Q_{\text{Butanol,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,023 \pm 0,005$	$0,022 \pm 0,000$	$0,014 \pm 0,004$
$q_{\text{Butanol,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,054 \pm 0,015$	$0,291 \pm 0,002$	$0,031 \pm 0,007$
$Q_{\text{Hexanoat,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,003 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,000$	$0,007 \pm 0,005$
$q_{\text{Hexanoat,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,019 \pm 0,005$	$0,062 \pm 0,004$	$0,015 \pm 0,013$
$Q_{\text{Hexanol,max}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,023 \pm 0,014$	$0,010 \pm 0,000$	$0,007 \pm 0,005$
$q_{\text{Hexanol,max}}, \text{ h}^{-1}$	$0,050 \pm 0,032$	$0,125 \pm 0,005$	$0,012 \pm 0,010$

### Diskussion

Sauerstoff ist ein starkes Oxidationsmittel und bewirkt somit einen Anstieg des Redoxpotentials, wenn es sich in wässrigem Medium löst. Obligat anaerobe Mikroorganismen können empfindlich selbst auf geringe Mengen Sauerstoff reagieren. Dabei ist die Empfindlichkeit insbesondere durch das oxidationsempfindlichste Enzym, das Methyl-THF/Methyl-THF Redox-Paar, vorgegeben, welches ein kritisches Redoxpotential zwischen  $-120 \text{ mV}$  und  $-200 \text{ mV}$  aufweist (Vanoni und Matthews 1984; Maden 2000; Müller et al. 2001; Schuchmann und Müller 2014; Thauer et al. 1977). Ein Anstieg des Redoxpotentials über diese kritischen Werte kann somit den anaeroben Metabolismus stören (Liu et al. 2013).

Karnholz et al. (2002) fanden in anaeroben Probenröhrchen mit verschiedenen anaeroben Mikroorganismen deutliche Unterschiede in Bezug auf die Sauerstofftoleranz, wobei der toleranteste untersuchte Mikroorganismus *C. magnum* Konzentrationen von bis zu 1,0 % O<sub>2</sub> im Kopfraum tolerierte und dadurch das Wachstum kaum gehemmt wurde und sogar Sauerstoff aufgenommen wurde. Allerdings wird in diesen Prozessen in anaeroben Probenröhrchen das Gas nicht kontinuierlich geführt, sondern nur einmalig vorgelegt. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit der Bioreaktor kontinuierlich begast. Kundiyana et al. (2010) fanden mit *C. ljungdahlii* keine deutliche Inhibierung in Satzprozessen in einem kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Pilotmaßstab mit einem Sauerstoffanteil im Kopfraum zwischen 400 ppm und 26 000 ppm. Allerdings war in diesem Prozess der Sauerstoff nicht ein Teil des Synthesegases, sondern stammte aus einer nicht identifizierten Leckage an der Reaktoranlage (Kundiyana et al. 2010).

Trotz der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser von 22,98 µmol mol<sup>-1</sup> bei 1013 mbar und 198,15 K (Battino et al. 2011) sorgte der Eintrag durch das biogene Synthesegas mit einem Sauerstoffanteil von 2459 ppm für einen Anstieg des Redoxpotentials auf über -200 mV. Somit wurde trotz der Zugabe von Cystein als Reduktionsmittel das anaerobe Wachstum von *C. carboxidivorans* inhibiert. Um das Redoxpotential unter -250 mV zu halten und somit das Wachstum von *C. carboxidivorans* mit diesem Synthesegas zu ermöglichen, mussten mindestens 2 g L<sup>-1</sup> Cystein-Hydrochlorid zugegeben werden. Die Zugabe solcher Mengen von Cystein ist aufgrund der geringen Wertschöpfung des Synthesegasfermentationsprozesses unwirtschaftlich und kann daher nicht in technischen Prozessen durchgeführt werden. Die Reduktion des im biogenen Synthesegas enthaltenen O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O mit einem Palladiumkatalysator auf 293 ppm O<sub>2</sub> ermöglichte einen erfolgreichen Gasfermentationsprozess mit *C. carboxidivorans*, welcher zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Prozesse mit Reingasen führte.

Im Vergleich zu den erreichten Konzentrationen bei Satzprozessen mit Reingasen und Zugabe definierter Spurenverunreinigungen wurden mit *C. carboxidivorans* durch Zugabe von Ammonium und Schwefelwasserstoff bis zu 3,2 g L<sup>-1</sup> Ethanol, 1,1 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol und 0,29 g L<sup>-1</sup> 1-Hexanol erreicht (höher um 113 %, 120 % und 53 % im Vergleich zum gezeigten biogenen Synthesegas, Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Die Verringerung der maximal erzielten Konzentrationen kann unter anderem auch auf die große Bevorzugung von hohen CO-Anteilen durch *C. carboxidivorans* zurückgeführt werden, welches einen optimalen CO-Anteil zwischen 40 % CO und 80 % CO besitzt (Doll 2018), während das verwendete Synthesegas lediglich 30 % CO aufwies.

Ein hoher Gasumsatz des Synthesegases in Bezug auf die Komponenten CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> ist essenziell für einen erfolgreichen, wirtschaftlichen und ökologischen, technischen

Prozess. Allerdings zeigen die meisten autotroph alkoholproduzierenden Mikroorganismen eine starke Präferenz von CO gegenüber CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (Doll 2018; Benevenuti et al. 2021; Hurst und Lewis 2010). Die negativere Gibbs'sche freie Enthalpie der Reaktionen aus CO (siehe Kapitel 3.1.3) führt zu einer thermodynamischen Bevorzugung dieser Reaktionen gegenüber der Reaktionen mit CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (Fernández-Naveira et al. 2017). Insbesondere die Gewinnung von Elektronen aus CO ist gegenüber H<sub>2</sub> immer thermodynamisch bevorzugt (Hu et al. 2011). Daher findet die Umsetzung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> durch Acetogene nur bei sehr geringen CO-Gelöstkonzentrationen statt. Beispielsweise wurde die gleichzeitige Verwertung von CO und CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> durch *C. autoethanogenum* mit einem CO-Anteil von 20 mbar bei einer Synthesegaszusammensetzung von 2 % CO, 23 % CO<sub>2</sub> und 65 % H<sub>2</sub> in einem kontinuierlichen Rührkesselreaktor mit einer Durchflussrate von 0,5 d<sup>-1</sup> beobachtet (Heffernan et al. 2020).

In industriellen Synthesegasfermentationsprozessen werden Prozesse aufgrund der hohen Betriebskosten durch den Leistungseintrag nicht in Rührkesselreaktoren, sondern in Blasensäulen oder Gas-Lift-Reaktoren durchgeführt (Daniell et al. 2012; Liew et al. 2013; Riegler et al. 2019b; Weuster-Botz 2022). In einem typischen Blasensäulenreaktor mit rund 30 m Höhe kann durch den großen hydrostatischen Druck der Wassersäule am unteren Ende des Reaktors eine hohe Löslichkeit der schwerlöslichen Gaskomponenten CO und H<sub>2</sub> erreicht werden (Youssef 2010). Durch die Umsetzung des Gases der Mikroorganismen sinkt die CO-Konzentration über die Höhe des Reaktors ab und ermöglicht so im oberen Bereich der Blasensäule die Umsetzung von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>. Ein korrekt ausgelegter Blasensäulenreaktor ermöglicht somit die zweistufige Umsetzung des Synthesegases mit der Umsetzung von CO im unteren Teil und CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> im oberen Teil der Blasensäule. Somit würden ausschließlich die Inertgaskomponenten wie N<sub>2</sub> im Reaktorabgas verbleiben.

Die Stöchiometrie der autotrophen Umsetzung von ausschließlich CO führt zur Bildung von 1 mol CO<sub>2</sub> pro 2 mol CO für die Acetatbildung und 1 mol CO<sub>2</sub> pro 1,5 mol CO für die Ethanolbildung (siehe Kapitel 3.1.3). Daher würde der CO<sub>2</sub>-Anteil in der Blasensäule über die Höhe steigen. Um dann im oberen Säulenteil hohe CO<sub>2</sub>-Umsätze zu erreichen wird ein Verhältnis von H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> von 2:1 für Acetatbildung und 3:1 für Ethanolbildung benötigt. Folglich beträgt das ideale Verhältnis von H<sub>2</sub>:CO für vollen Synthesegasumsatz in einer idealen Blasensäule 2:1 für reine Ethanolproduktion und 1:1 für reine Acetatproduktion.

Ein biogenes Synthesegas mit der in dieser Arbeit untersuchten Zusammensetzung würde unter der Annahme vollen Umsatzes von CO und ausschließlich Produktion von Ethanol im unteren Blasensäulenteil in einer Zusammensetzung von 34,2 % CO<sub>2</sub>,

24,5 % H<sub>2</sub> und 41,3 % N<sub>2</sub> resultieren. Im zweiten Blasensäulenteil würde schließlich unter der Annahme vollen H<sub>2</sub>-Umsatzes und ausschließlich Ethanolproduktion in einer Restgaszusammensetzung von 38,7 % CO<sub>2</sub> und 61,3 % N<sub>2</sub> resultieren. Der Abgasmassenstrom würde sich dabei auf 39,7 % des Eingangsvolumenstroms verringern. Um vollständigen Synthesegasumsatz zu ermöglichen, wäre also ein höheres H<sub>2</sub>:CO-Verhältnis erforderlich. Da der Umsatz von CO in der Bildung von CO<sub>2</sub> resultiert, sollte der CO<sub>2</sub>-Anteil idealerweise so gering wie möglich sein. Der Hauptteil des Stickstoffs des in dieser Arbeit verwendeten biogenen Synthesegases stammte aus dem Abfüllungsprozess in Druckgasflaschen. Hierbei wurde sowohl die geringen Mengen Sauerstoff als auch der Stickstoff durch Dosierstickstoff, Toträume an Sicherheitsventilen, Reststickstoff in Druckgasflaschen und an den Flammenkammeras, die für die wissenschaftliche Beobachtung des Vergasungsprozesses genutzt wird, eingetragen. In einem technischen Vergasungsprozess könnten diese Mengen deutlich reduziert werden, sodass nur wenig N<sub>2</sub> und sehr wenig bis fast kein O<sub>2</sub> im Synthesegas enthalten wären (Kremling 2018; Kremling et al. 2017). Mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % CO<sub>2</sub> in einem biogenen Synthesegas wie er in einer idealen Vergasung möglich wäre und bei einem reduzierten N<sub>2</sub>-Anteil im Vergleich zu dieser Arbeit, würde ein Synthesegas mit 23,3 % CO, 5,0 % CO<sub>2</sub>, 61,7 % H<sub>2</sub> und 10,0 % N<sub>2</sub> zu einem theoretisch vollen Synthesegasumsatz in einer idealen Blasensäule führen.

Der Flugstromvergasungsprozess sollte für ein für die Synthesegasfermentation ideales Synthesegas auf hohe CO- und H<sub>2</sub>-Anteile sowie geringen CO<sub>2</sub>-Anteil abzielen. Die typische elementare Zusammensetzung auf mol-Basis der Brennstoffe wie in dieser Arbeit torrefiziertes Holz (TorrCoal) liegt bei 38,0 % C, 44,6 % H und 17,0 % O (53,1 % (w/w) C, 5,2 % (w/w) H und 31,7 % (w/w) O (Kremling et al. 2017)). Daher ist das Erreichen des Optimalen H<sub>2</sub>:CO-Verhältnisses von 2:1 sehr herausfordernd. Eine Möglichkeit dieses Verhältnis dennoch zu erreichen stellt die Zudosierung von Dampf zum Vergasungsmittel Sauerstoff dar (Hernández et al. 2012), welche trotzdem möglicherweise das hohe Verhältnis von 2:1 nicht erreicht. Außerdem bietet die Plasma-Vergasung mit Dampf und Sauerstoff eine vielversprechende Methode diese Verhältnisse zu erreichen (Agon et al. 2016; Mazzoni et al. 2020; Vishwajeet et al. 2022). Allerdings ist dieser Prozess noch im relativ frühen Forschungsstadium und noch von der technischen Realisierung entfernt. Das benötigte hohe CO:CO<sub>2</sub>-Verhältnis hingegen kann durch Anpassungen des Sauerstoff-Brennstoff-Verhältnisses, der Vergasungstemperaturführung oder der Zugabe von Reformierungskatalysator verbessert werden (Hernández et al. 2012; Kobayashi et al. 2011; Kremling 2018; Kremling et al. 2017; Briesemeister et al. 2017; Schneider et al. 2016).

## 6. Inhibierungsstudien und Realgasumsetzungen mit *Clostridium autoethanogenum*

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit *C. autoethanogenum* in Prozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor dargestellt und diskutiert. Hierbei wird zunächst die Etablierung eines Referenzsatzprozesses erläutert und anschließend die Ergebnisse der Inhibierungsstudien mit definierten Konzentrationen von typischen Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen in Satzprozessen diskutiert. Die Ergebnisse der Realgasfermentationen mit biogenem Synthesegas aus der vergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) werden mit dem Referenzsatzprozess mit Reingasen gegenübergestellt. Zusätzlich werden die Ergebnisse der autotrophen Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* mit den Ergebnissen mit *C. carboxidivorans* verglichen. Zuletzt werden die Ergebnisse kontinuierlicher Prozesse mit *C. autoethanogenum* erläutert.

### 6.1. Inhibierungsstudien mit *Clostridium autoethanogenum* im Satzverfahren<sup>3</sup>

#### 6.1.1. Referenzsatzprozesse mit *C. autoethanogenum*

Bei der Etablierung eines autotrophen Referenzsatzprozesses mit *C. autoethanogenum* wurden zunächst die Gaszusammensetzung in Bezug auf den CO-Anteil und der pH während des Prozesses untersucht. Darüber hinaus wurde die Verarbeitung von Vorkulturen von *C. autoethanogenum* im Hinblick auf eine mehrstufige Vorkulturführung sowie den Erntezeitpunkt angepasst.

---

<sup>3</sup> Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind wissenschaftlich publiziert in:

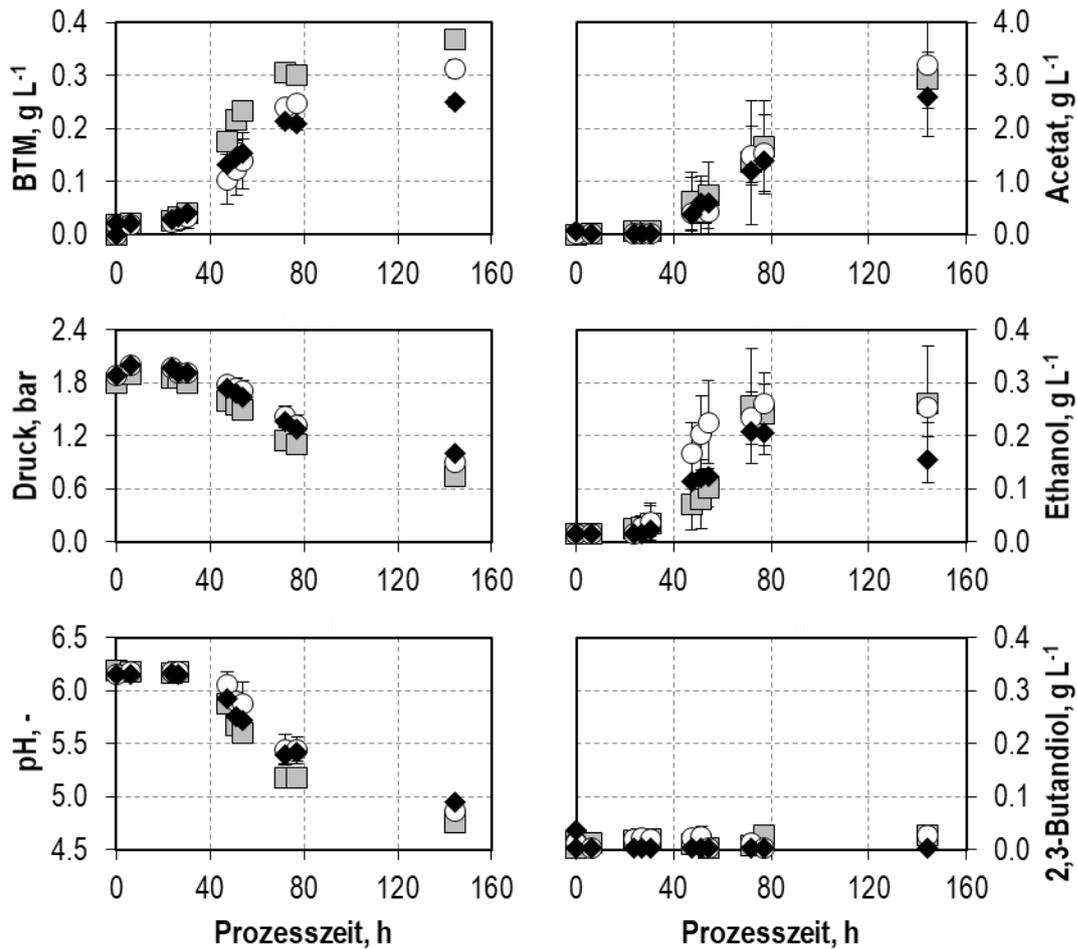
Oliveira, Luis<sup>+</sup>; Rückel, Anton<sup>+</sup>; Nordgauer, Lisa; Schlumprecht, Patric; Hutter, Elina; Weuster-Botz, Dirk (2022): Comparison of syngas-fermenting *Clostridia* in stirred-tank bioreactors and the effects of varying syngas impurities. In *Microorganisms* 10 (4). doi:10.3390/microorganisms10040681. (+ geteilte Erstautorschaft)

#### **6.1.1.1. Voruntersuchungen zur Gaszusammensetzung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum***

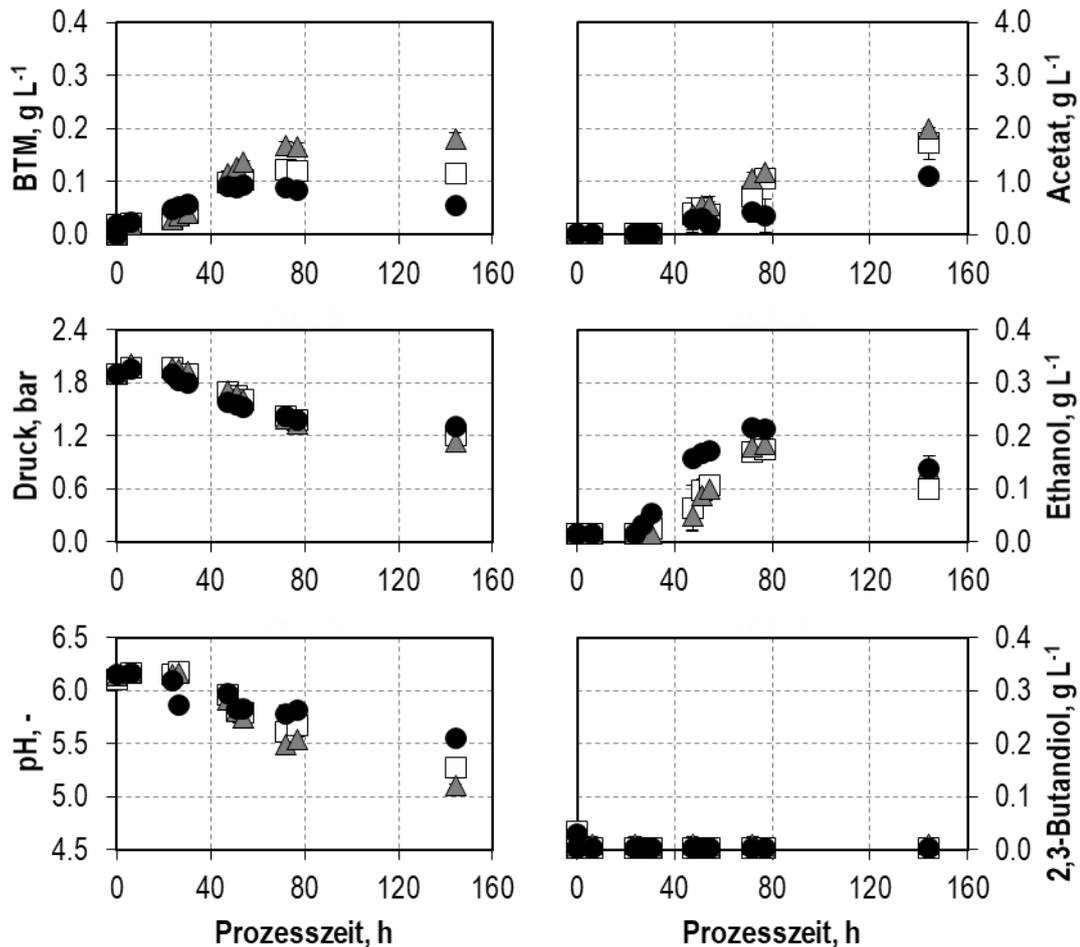
In den ersten Prozessen mit *C. autoethanogenum* wurde abweichend zum beschriebenen Vorgehen in Kapitel 4.4.1 stets eine einstufige Vorkultur mit 5 g L<sup>-1</sup> Xylose für 48 h bei 37 °C und 100 min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Vorkulturen wurden ansonsten nach dem identischen Vorgehen wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben geerntet.

Die Gaszusammensetzung wurde in Voruntersuchungen in autotrophen geschüttelten Anaerobflaschen untersucht. Dabei wurde der Einfluss von CO als wesentlichste Komponente für den Stoffwechsel der acetogenen Mikroorganismen variiert, während die Anteile von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> identisch waren. Hierzu wurden jeweils im Triplikat Flaschen mit Gasmischungen von jeweils 20 % CO<sub>2</sub>, 20 % H<sub>2</sub> und verschiedenen CO-Anteilen zwischen 10 % CO und 60 % CO bei einem initialen Absolutdruck von 2,0 bar eingesetzt, wobei die Differenz immer mit Stickstoff (0 % N<sub>2</sub> bis 50 % N<sub>2</sub>) aufgefüllt wurde. Dabei wurden die gewählten CO-Anteile an einem realistischen Bereich für den CO-Anteil in biogenen Synthesegasen orientiert (Kapitel 3.2.1). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 dargestellt.

Die Gasmischung mit 60 % CO zeigte das schnellste Anfangswachstum und erreichte die höchste maximale Biotrockenmassekonzentration der gezeigten Prozesse. Die Bildung von Acetat sowie entsprechend der pH-Abfall waren im Vergleich zu Prozessen mit geringerem CO-Anteil von 50 % CO und 40 % CO kaum verändert. Allerdings war die Ethanolbildung mit 40 % CO im Mittel geringer als mit 60 % CO und 50 % CO, wobei dieser Unterschied durch die großen Standardabweichungen innerhalb der Triplikate relativiert wird. Höhere CO-Anteile in den Anaerobflaschen senkten die maximale Biotrockenmassekonzentration weiter und führten zu geringeren finalen Ethanolkonzentrationen. 2,3-Butandiol wurde in allen Satzprozessen in geschüttelten Anaerobflaschen nahezu nicht gebildet.



**Abbildung 6-1** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* in geschüttelten Anaerobflaschen bei  $T = 37\text{ °C}$  und  $n = 100\text{ min}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs,initial}} = 2\text{ bar}$  und  $\text{pH}_{\text{initial}} = 6,1$  mit 20 %  $\text{H}_2$ , 20 %  $\text{CO}_2$  und variiertem  $\text{CO}$ -Anteil von 60 %  $\text{CO}$  (hellgraues Quadrat □), 50 %  $\text{CO}$  (weißer Kreis ○), 40 %  $\text{CO}$  (schwarze Raute ◆). Die Differenz wurde stets mit Stickstoff zwischen 0 %  $\text{N}_2$  und 50 %  $\text{N}_2$  aufgefüllt. Alle Satzprozesse wurden im Triplikot durchgeführt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert des Triplikats mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



**Abbildung 6-2** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* in geschüttelten Anaerobflaschen bei  $T = 37\text{ °C}$  und  $n = 100\text{ min}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs,initial}} = 2\text{ bar}$  und  $\text{pH}_{\text{initial}} 6,1$  mit 20 %  $\text{H}_2$ , 20 %  $\text{CO}_2$  und variiertem CO-Anteil von 30 % CO (dunkelgraues Dreieck ▲), 20 % CO (weißes Quadrat □), 10 % CO (schwarzer Kreis ●). Die Differenz wurde stets mit Stickstoff zwischen 0 %  $\text{N}_2$  und 50 %  $\text{N}_2$  aufgefüllt. Alle Satzprozesse wurden im Triplikot durchgeführt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert des Triplikats mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen sowie die spezifischen Wachstumsraten der Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* in geschüttelten Anaerobflaschen mit variiertem CO-Anteil sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die höchste spezifische Wachstumsrate wurde mit dem höchsten untersuchten CO-Anteil erhalten. Mit sinkendem CO-Anteil sank auch die spezifische Wachstumsrate, wobei zwischen 30 % CO und 50 % CO kaum Abnahme der Wachstumsrate beobachtet wurde. Bei einem CO-Anteil von 10 % CO wurde die spezifische Wachstumsrate bereits um 44 % reduziert.

**Tabelle 6-1** Spezifische Wachstumsrate von *C. autoethanogenum* in geschüttelten Anaerobflaschen in Abhängigkeit des CO-Anteils in der Synthesegasmischung bei  $T = 37\text{ °C}$  und  $n = 100\text{ min}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs,initial}} = 2\text{ bar}$  und  $\text{pH}_{\text{initial}} 6,0$ . Alle Satzprozesse wurden im Triplikat durchgeführt.

Gasmischung	$c_{x,\text{max}}$ , $\text{g L}^{-1}$	$\mu_{\text{max}}$ , $\text{h}^{-1}$
60 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub>	$0,33 \pm 0,05$	$0,059 \pm 0,006$
50 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub> , 10 % N <sub>2</sub>	$0,31 \pm 0,02$	$0,045 \pm 0,005$
40 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub> , 20 % N <sub>2</sub>	$0,25 \pm 0,01$	$0,046 \pm 0,006$
30 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub> , 30 % N <sub>2</sub>	$0,18 \pm 0,01$	$0,043 \pm 0,002$
20 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub> , 40 % N <sub>2</sub>	$0,11 \pm 0,01$	$0,038 \pm 0,007$
10 % CO, 20 % CO <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub> , 50 % N <sub>2</sub>	$0,05 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,001$

### Diskussion

In den Voruntersuchungen zum Einfluss des CO-Anteils auf Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* konnte eine hohe Toleranz gegenüber hohen CO-Anteilen festgestellt werden ähnlich wie bei *C. carboxidivorans* (Doll 2018). Anders als andere acetogene Mikroorganismen zeigt *C. autoethanogenum* keine ausgeprägte CO-Überschussinhibition bis zu CO-Anteilen von 60 % CO (Mayer 2018; Kantzow und Weuster-Botz 2016). Auch das Wachstum von *C. autoethanogenum* mit 100 % CO (ohne H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) war möglich, führte jedoch zu einer gesenkten spezifischen Wachstumsrate von  $0,024\text{ h}^{-1} \pm 0,003\text{ h}^{-1}$  und einer reduzierten maximalen BTM von  $0,25\text{ g L}^{-1} \pm 0,016\text{ g L}^{-1}$  (Daten nicht gezeigt).

Auch für andere acetogene Mikroorganismen wie *C. carboxidivorans* wurde eine hohe Toleranz gegenüber CO mit einem Optimum zwischen 40 % CO und 80 % CO beschrieben (Doll 2018; Abubackar et al. 2012; Hurst und Lewis 2010). Bei den in dieser Arbeit untersuchten CO-Anteilen lagen die besten Ergebnisse von Wachstumsrate, maximaler BTM und maximaler Ethanolkonzentration beim höchsten untersuchten Anteil von 60 % CO. Höhere Anteile wurden nicht detailliert untersucht, da diese in biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe nicht realistisch erreichbar sind (Kapitel 3.2.1).

Die Gaszusammensetzung eines Synthesegases aus Reingasen mit Anteilen von 60 % CO, 20 % CO<sub>2</sub> und 20 % H<sub>2</sub> stellt somit eine für biogene Synthesegase realistische Zusammensetzung dar und lieferte das beste Wachstums- und Produktbildungsverhalten von *C. autoethanogenum* der untersuchten Zusammensetzungen. Daher wurde diese Gaszusammensetzung in den folgenden Prozessen verwendet und in den Referenzsatzprozess im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor übertragen.

### 6.1.1.2. pH in Satzprozessen mit *C. autoethanogenum*

In den ersten Prozessen mit variiertem pH mit *C. autoethanogenum* wurde abweichend zum beschriebenen Vorgehen in Kapitel 4.4.1 stets eine einstufige Vorkultur mit  $5 \text{ g L}^{-1}$  Xylose für 48 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $100 \text{ min}^{-1}$  inkubiert. Die Vorkulturen wurden ansonsten nach dem identischen Protokoll wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben geerntet.

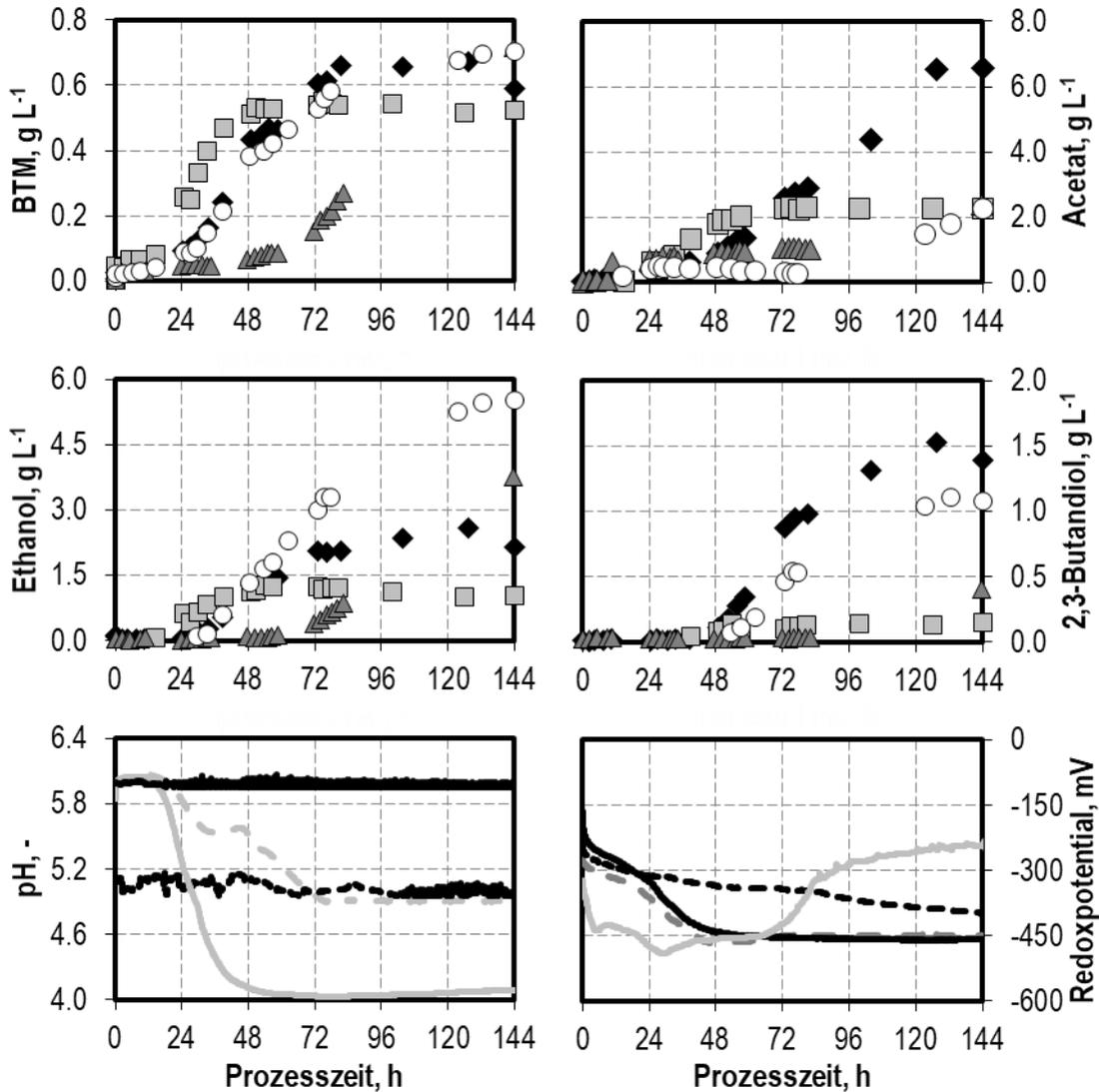
Der pH während eines Prozesses ist ein bedeutender Einflussfaktor auf Wachstum und Produktbildung verschiedener acetogener Clostridien. Daher wurden zunächst verschiedene Satzprozesse im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit verschiedenen pH-Prozessführungsstrategien durchgeführt. Diese waren ein pH-unkontrollierter Prozess, jeweils ein pH-geregelter Prozess mit pH 6,0 und pH 5,0 (pH-Regelung mit 3 M NaOH und 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) sowie ein Satzprozess mit einem zunächst unregulierten pH, welcher infolge des Absinkens durch die Essigsäureproduktion nach dem Erreichen von pH 5,0 konstant einseitig mit 3 M NaOH auf pH 5,0 geregelt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-3 gezeigt.

Das zunächst schnellste Wachstum von *C. autoethanogenum* wurde im Prozess ohne pH-Regelung mit dem Anfangs-pH 6,0 beobachtet, welches jedoch nach 48 h zum Erliegen kam, nachdem der pH bereits auf pH 4,2 gesunken war. Im Anschluss daran blieben alle Produktkonzentrationen sowie die Biotrockenmassekonzentration bis zum Prozessende konstant. Nach 70 h begann daraufhin ein Anstieg des Redoxpotentials, welcher in allen pH-geregelten Prozessen nicht beobachtet wurde.

Im Gegensatz dazu stieg die Biomassekonzentration in Prozessen mit geregelterm pH 6,0 weiter an und erreichte eine höhere maximale Biotrockenmassekonzentration. Auch alle Produktkonzentrationen stiegen deutlich länger an und erreichten höhere Maximalwerte als im pH-ungeregelten Prozess. Am deutlichsten fiel dieser Unterschied für 2,3-Butandiol aus, welches im pH-ungeregelten Prozess nahezu nicht gebildet wurde. Allerdings lag das Alkohol-zu-Säure-Verhältnis mit  $0,54 \text{ g g}^{-1}$  am Prozessende bei pH 6,0 sehr niedrig im Vergleich zu den übrigen Satzprozessen.

Die pH-Regelung auf pH 5,0 hingegen führte zu einer deutlichen Verlangsamung des initialen Wachstums von *C. autoethanogenum* und erst nach 72 h einem deutlichen Anstieg der Biotrockenmassekonzentration. Die am Prozessende nach 144 h erreichte Biotrockenmassekonzentration lag jedoch ebenso hoch wie im Satzprozess mit pH-Regelung auf pH 6,0. Gleichzeitig wurden bei pH 5,0 jedoch eine um 45 % höhere finale Ethanolkonzentration erreicht als im Prozess mit pH 6,0. Zudem wurde bei pH 5,0 eine sehr viel geringere Acetatproduktion beobachtet als bei pH 6,0, welche trotz der ebenfalls

geringeren Produktion von 2,3-Butandiol in einem deutlich höheren Alkohol-zu-Säure-Verhältnis von 1,82 g g<sup>-1</sup> resultierte.



**Abbildung 6-3** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab ohne pH-Regelung (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , schwarze Linie), bei pH 6,0 (hellgraue Quadrate  $\square$ , hellgraue Linie), bei pH 5,0 (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , dunkelgrau gestrichelte Linie) und mit natürlichem pH-Abfall durch Essigsäureproduktion bis pH 5,0 (weiße Kreise  $\circ$ , schwarze gepunktete Linie) bei  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH wurde geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $F_{\text{gas}} = 5,0\text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013\text{ mbar}$   $n = 1200\text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1\text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600\text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200\text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200\text{ mbar}$ .

Der Satzprozess, bei dem der pH vom initialen pH 6,0 durch Essigsäurebildung natürlich auf pH 5,0 absank und anschließend auf pH 5,0 geregelt wurde, zeigt ein ebenso gutes Wachstum und eine ebenso hohe maximale Biotrockenmassekonzentration wie der Prozess mit geregelterm pH 6,0. Zudem erreichte dieser Satzprozess die höchste Ethanolkonzentration am Prozessende von 5,52 g L<sup>-1</sup> Ethanol. Dabei wurden insgesamt weniger

2,3-Butandiol und Acetat gebildet als im Prozess mit pH 6,0. Das resultierende Alkohol-zu-Säure-Verhältnis lag im Prozess mit natürlichem pH-Abfall mit  $2,89 \text{ g g}^{-1}$  am höchsten für die untersuchten pH-Führungsstrategien.

Das Redoxpotential begann in allen Satzprozessen zwischen -200 mV und -300 mV. Im Anschluss sank das Redoxpotential durch das Reduktionsmittel Cystein-Hydrochlorid weiter ab. In den Satzprozessen ohne pH-Regelung, mit pH 6,0 und natürlichem pH-Abfall mit anschließender Regelung auf pH 5,0 sank das Redoxpotential bis -450 mV ab. Im Satzprozess mit pH 5,0 hingegen sank das Redoxpotential langsamer und erreichte am Minimum -396 mV nach 144 h. Im Prozess ohne pH-Regelung kam es im Gegensatz zu den anderen gezeigten Prozessen zu einem Anstieg des Redoxpotentials nach ca. 72 h, sodass nach 144 h das Redoxpotential auf -242 mV anstieg.

### Diskussion

Der pH in Gasfermentationsprozessen hat auf verschiedene Mikroorganismen einen großen Einfluss (Abubackar et al. 2016; Abubackar et al. 2012; Ganigué et al. 2016). Für *C. carboxidivorans* führte im Satzprozess ein unregelmäßiger pH vom initialen pH 6,0 aus mit dem natürlichen pH-Abfall durch die Essigsäurebildung zu einem zweiphasigen Prozess aus Acidogenese bei hohem pH und anschließender Umsetzung der gebildeten Säuren in Alkohole im Rahmen der Solventogenese (Fernández-Naveira et al. 2017; Doll et al. 2018; Doll 2018). Dieses zweistufige Verhalten konnte für *C. autoethanogenum* nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in *C. autoethanogenum* die Umsetzung von Acetat in Ethanol eine untergeordnete Rolle spielt, obwohl *C. autoethanogenum* genauso wie *C. carboxidivorans* über die Gene für diese Umsetzung verfügt (Humphreys et al. 2015). Mit *C. autoethanogenum* führte ein unregelmäßiger pH zu einem starken Absinken des pH bis pH 4,0 und anschließend keiner Aktivität der Mikroorganismen mehr, sondern einem Anstieg des Redoxpotentials, welches auf ein Absterben der Mikroorganismen hindeutet. Auf diese Weise wurden niedrige Produktkonzentrationen insbesondere von 2,3-Butandiol erreicht. Daher ist eine pH-Regelung für Prozesse mit *C. autoethanogenum* notwendig für eine effiziente Alkoholproduktion.

Für *C. carboxidivorans* wurde bei niedrigem pH unter dem pH-Optimum für Wachstum bei pH 6,0 (Ganigué et al. 2016) eine Steigerung der Ethanolproduktion bei Verringerung der Acetatakkumulation auf Kosten der Kettenverlängerung von C2-Produkten (Acetat und Ethanol) zu C4-Produkten (Butyrat und 1-Butanol) und C6-Produkten (Hexanoat und 1-Hexanol) festgestellt. Ein ähnlicher Einfluss wurde in dieser Arbeit auch für *C. autoethanogenum* beobachtet. Während ein erniedrigter pH 5,0 das Wachstum hemmte,

wurde die Ethanolbildung gesteigert, sowie die Acetatakkumulation reduziert. Allerdings wurde auch die Bildung des technisch relevanten mehrwertigen Alkohols 2,3-Butandiol verringert. In der Literatur sind in Satzprozessen im Rührkesselreaktor bereits mit *C. autoethanogenum* Steigerungen der Alkoholproduktivität bei Reduktion der Akkumulation von Essigsäure beschrieben, wobei hierbei eine Abfolge zyklischer pH-Verschiebungen eingesetzt wurde (Abubackar et al. 2016; Abubackar et al. 2015a).

In dieser Arbeit wurde zudem im Satzprozess eine einfache pH-Führungsstrategie untersucht, bei der vom initialen pH 6,0 aus keine pH-Regelung stattfand bis durch die Essigsäurebildung pH 5,0 erreicht wurde, woraufhin pH 5,0 von da an geregelt wurde. Dieser Prozess lieferte die höchsten Ethanolkonzentrationen bei relativ geringer Acetatakkumulation. Allerdings wurde auch die 2,3-Butandiolproduktion verringert. Dieser Prozess bietet dennoch aufgrund des hohen Alkohol-zu-Säureverhältnisses eine vielversprechende Ausgangsbasis, da die Alkohole die wirtschaftlich relevanteren Produkte darstellen und ein hohes solches Verhältnis notwendig für einen effizienten Abtrennungsprozess der Alkohole ist (Daniell et al. 2012; Ezeji et al. 2004).

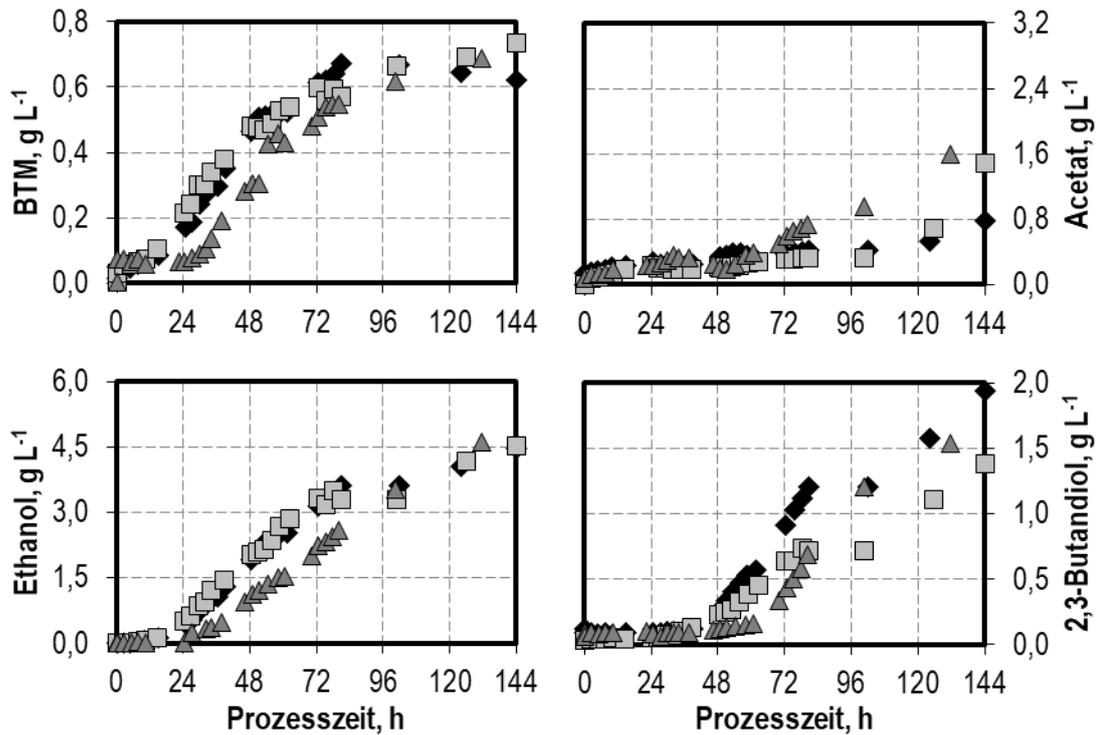
### **6.1.1.3. Erhöhung der Reproduzierbarkeit autotropher Satzprozesse**

In den gezeigten vorangegangenen Satzprozessen wurde die Vorkultur stets in einer einstufigen Vorkultur vorbereitet und über 48 h bei 37 °C und 100 min<sup>-1</sup> mit 5 g L<sup>-1</sup> Xylose inkubiert. Dabei kam es zu einer teilweise schlecht reproduzierbaren Vorkultur. Es wurden normalerweise 4 bis 6 Vorkulturflaschen vorbereitet, von denen teilweise nur 1 bis 2 Flaschen bis zur Zellernte ausreichend Biomasse gebildet hatten. Daher wurde zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit eine zweistufige Vorkultur wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben erstellt. Somit wurde ermöglicht, dass nur noch 4 Vorkulturflaschen benötigt wurden. Von diesen konnten üblicherweise alle 4 bis zur Zellernte ausreichend Biomasse zur Inokulation des Bioreaktors bilden. Alle folgenden Satzprozesse wurden stets mit einer zweistufigen Vorkultur wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben hergestellt. Diese Satzprozesse wurden zudem bei geregelter pH 6,0 (siehe Kapitel 6.1.1.2) durchgeführt. Der Prozess wurde unter den identischen Bedingungen zweimal reproduziert und somit insgesamt dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse der Prozesse mit angepasster Vorkultur sind in Abbildung 6-4 dargestellt.

Durch die Anpassung der Vorkulturherstellung konnte bei geregelter pH 6,0 eine fast doppelt so hohe maximale Ethanolkonzentration wie im Satzprozess mit der vorherigen Vorkulturmethode erzielt werden. Auch die Bildung von 2,3-Butandiol wurde um etwa ein

Viertel gesteigert. Zudem wurde die Akkumulation von Acetat deutlich auf unter  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  Acetat gesenkt.

Im Vergleich zum Satzprozess mit natürlichem pH-Absinken bis pH 5,0 und anschließender pH-Regelung (Abbildung 6-3) wurde mit der angepassten Vorkultur bei geregelterm pH 6,0 zwar eine um 18 % niedrigere maximale Ethanolkonzentration erreicht. Allerdings wurde eine um 81 % höhere maximale 2,3-Butandiolkonzentration und eine um bis zu 66 % verringerte Acetatakkumulation mit der angepassten Vorkulturherstellung ermöglicht. Somit wurde durch die Anpassung der Vorkultur zu einer zweistufigen heterotrophen Vorkultur eine Steigerung des Alkohol-zu-Säureverhältnisses auf bis zu  $8,19 \text{ g g}^{-1}$  (Steigerung um Faktor 2,8 im Vergleich zum besten Prozess mit einstufiger Vorkultur) erreicht.



**Abbildung 6-4** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab in drei unabhängigen Referenzsatzprozessen (schwarze Raute  $\blacklozenge$ , hellgraue Quadrate  $\square$ , dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ), Gaszusammensetzung  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ .

### Diskussion

Das Erreichen hoher Alkoholkonzentrationen sowie eines hohen Alkohol-zu-Säure-Verhältnisses ist von großer Bedeutung für die Umsetzung eines technisch relevanten, wirtschaftlichen Produktionsprozesses. Zum einen sind hohe Alkoholkonzentrationen notwendig, da nur dann typische Prozesse wie Rektifikation eingesetzt werden können (Ezeji et al. 2004). Außerdem soll der Anteil im Aufarbeitungsprozess störender Säuren niedrig sein. Zum anderen ist ein hoher Kohlenstofffluss in die wertvolleren Alkohole im Vergleich zu den weniger werthaltigen Säuren notwendig, da die Alkohole als Kraftstoffe oder Kraftstoffzusätze technisch relevantere Produkte darstellen (Daniell et al. 2012; Dürre 2007).

Trotz der etwas geringeren Ethanolproduktion im Prozess mit der angepassten Vorkultur wurde durch die stärkere 2,3-Butandiolproduktion und die niedrigere Acetatakkumulation insgesamt das höchste Alkohol-zu-Säure-Verhältnis erreicht. Somit stellt die angepasste Vorkultur in einem Satzprozess mit geregelterm pH 6,0 die vielversprechendste Prozessführungsvariante dar. Eine Kombination der Ergebnisse zum pH-Abfall aus Kapitel 6.1.1.2 mit der angepassten Vorkultur führte nicht zu einer weiteren Verbesserung (Daten nicht gezeigt). Da aufgrund der verringerten Essigsäurebildung mit der angepassten Vorkultur das pH-Absinken über die Prozesszeit von 144 h sehr langsam ist, wurde dadurch auch keine höhere Ethanolproduktion erzielt als bei pH 6,0. Daher wird für alle folgenden Satzprozesse immer der Prozess mit der angepassten, zweistufigen Vorkultur und geregelterm pH 6,0 als Referenzsatzprozess für *C. autoethanogenum* verwendet.

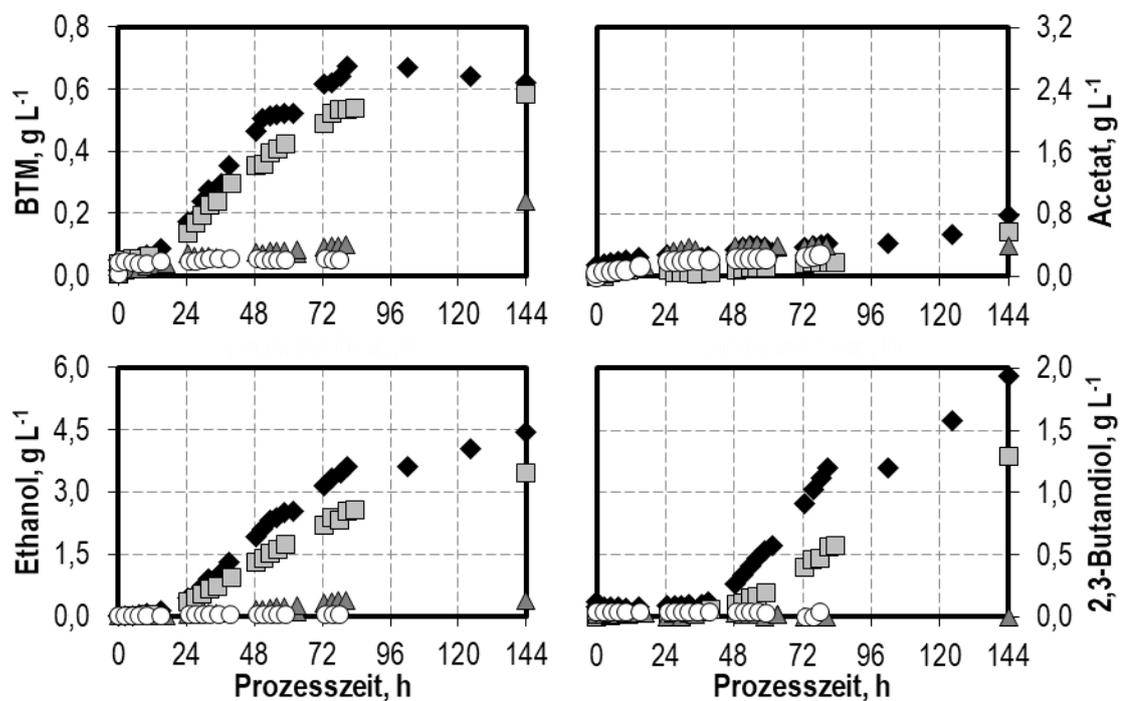
#### **6.1.2. Ammoniak als Spurenverunreinigung**

In diesem Kapitel wird der Einfluss definierter Konzentrationen der Spurenverunreinigung  $\text{NH}_3$  auf autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe definierter Konzentrationen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 dargestellt.

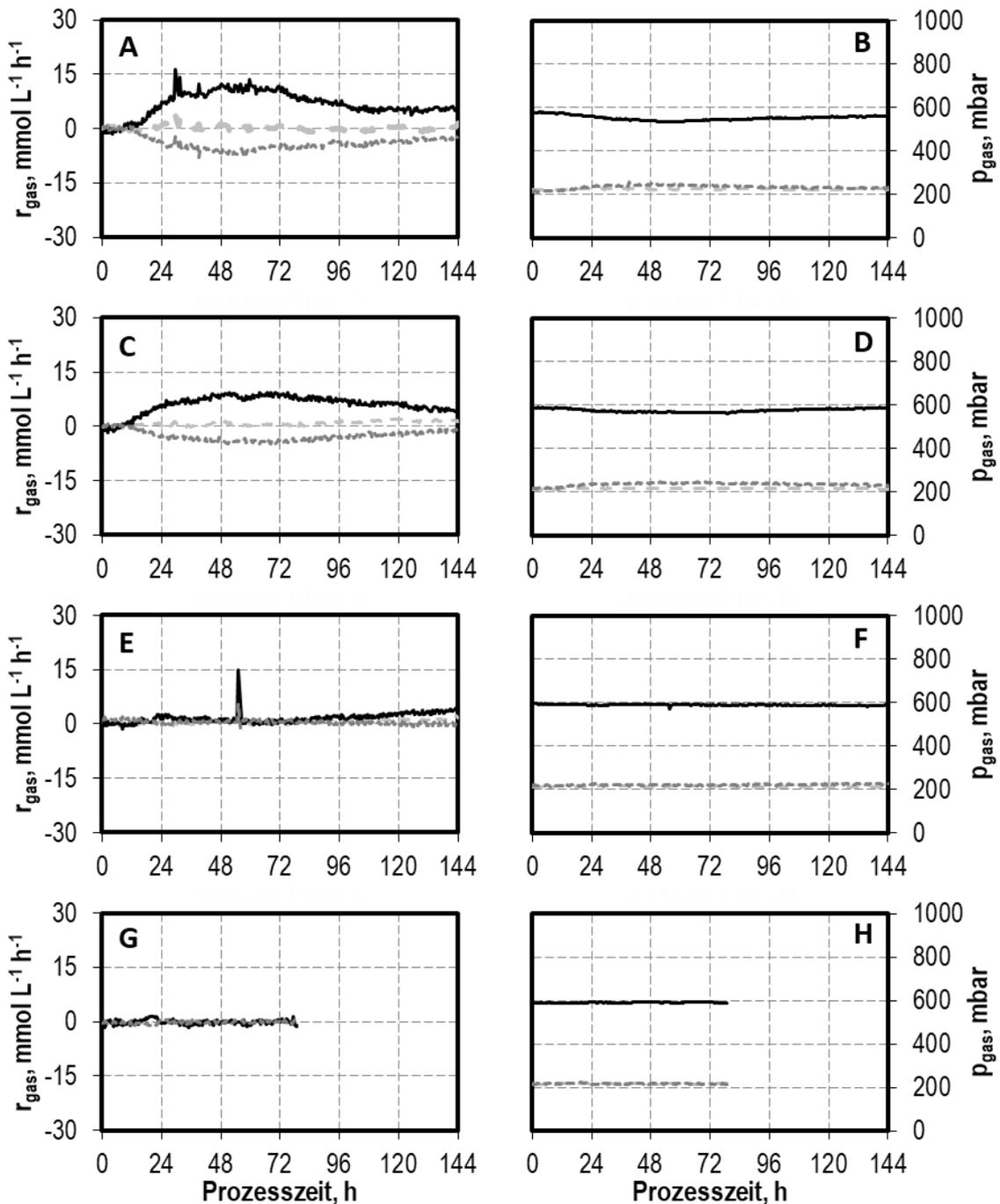
Die Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  führte zu einer Verringerung der maximalen Biotrockenmassekonzentration von *C. autoethanogenum* um 13 % im Vergleich zum Referenzsatzprozess. Die Zugabe von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  reduzierte die maximale Biotrockenmassekonzentration um 62 % und bewirkte eine Verzögerung des Wachstums um 72 h im Vergleich zum Referenzsatzprozess. Die Zugabe von höheren Konzentrationen von

5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl führte zu keinem quantifizierbaren Wachstum nach bis zu 78 h Prozesszeit.

Ebenso wie das Biomassewachstum wurde auch die Produktion durch Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl reduziert um 28 % für Acetat, 22 % für Ethanol und 34 % für 2,3-Butandiol. Die Zugabe höherer Konzentrationen von NH<sub>4</sub>Cl führte lediglich zu einer Produktion von 0,40 g L<sup>-1</sup> Acetat (mit 3,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl) und 0,26 g L<sup>-1</sup> Acetat (mit 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl) und beinahe keiner Alkoholproduktion von lediglich maximal 0,39 g L<sup>-1</sup> Ethanol mit Zugabe von 3,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl.



**Abbildung 6-5** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) und mit variiert Zugabe definierter Konzentrationen von + 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (hellgraue Quadrate  $\square$ ), + 3,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) und + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (weiße Kreise  $\circ$ ) bei T = 37 °C, pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO2</sub> = 200 mbar und p<sub>H2</sub> = 200 mbar.



**Abbildung 6-6** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (C und D), + 3,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (E und F) und + 5,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl (G und H) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar, p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

Die ermittelten Gasaufnahmeleistungen der Prozesse mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Zugaben (Abbildung 6-6) zeigen eine Verringerung der maximalen  $\text{CO}$ -Aufnahme durch die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Die Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  senkte die maximale  $\text{CO}$ -Aufnahmerate um 21 %, die Zugabe von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  um 65 % und die Zugabe von  $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  führte zu keiner messbaren Aufnahme von  $\text{CO}$ . Die Gaspartialdrücke aller Gaskomponenten sind am Reaktorausgang durch die Aufnahme der Mikroorganismen kaum gegenüber den Eingangspartialdrücken verringert, sodass eine Limitierung durch den Gas-Flüssig-Stofftransport nicht angenommen werden muss.

Die Kohlenstoffbilanzwiederfindungen (Tabelle 6-2) lagen für die gezeigten Prozesse zwischen 82,0 % und 95,0 %. Die teilweise unvollständig geschlossenen Kohlenstoffbilanzen resultieren aus unvollständig umgesetztem Kohlenstoff aus dem Medium (Hefeextrakt und Cystein) und der nicht quantifizierten Verdunstung von Alkoholen.

**Tabelle 6-2** Gesamtmengen von aufgenommenem  $\text{CO}$ , gebildetem  $\text{CO}_2$ , Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse, sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	+ $1,0 \text{ g L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{Cl}$	+ $3,0 \text{ g L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{Cl}$	+ $5,0 \text{ g L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{Cl}$
C im Medium, mmol C	9,94	9,94	9,94	9,94
$\text{CO}$ -Aufnahme, mmol C	923,46	747,26	119,39	<50
$\text{CO}_2$ -Bildung, mmol C	612,2	420,01	87,06	<20
$\text{CO}:\text{CO}_2$ -Verhältnis, -	1,51	1,78	1,37	-
C in Produkten, mmol C	233,62	182,64	28,26	7,87
C in Biomasse, mmol C	19,63	18,45	7,57	1,61
C-Bilanz (Wiederfindung), %	92,72%	82,03%	95,02%	-

Die ermittelten maximalen spezifischen Wachstumsraten sind in Tabelle 6-3 dargestellt. Dabei zeigt sich ein Absinken mit zunehmender  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration. Auch die maximalen Alkoholbildungsleistungen sinken mit steigender Ammoniumkonzentration. Lediglich die maximale Acetatbildungsleistung stieg in den Satzprozessen mit  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  und  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  an.

**Tabelle 6-3** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsrate der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 3,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+ 5,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl
$\mu_{\text{max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,065	0,057	0,016	0,003
$Q_{\text{Acetat,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,005	0,013	0,017	0,006
$q_{\text{Acetat,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,063	0,022	0,428	0,142
$Q_{\text{Ethanol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,066	0,043	0,006	0,009
$q_{\text{Ethanol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,249	0,184	0,105	0,188
$Q_{\text{2,3-Butandiol,max}}$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,024	0,017	0,000	0,000
$q_{\text{2,3-Butandiol,max}}$ , h <sup>-1</sup>	0,044	0,032	0,000	0,000

### Diskussion

Anders als für den anderen acetogenen Mikroorganismus *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.1.2) wurde für *C. autoethanogenum* in den gezeigten Untersuchungen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Spurenverunreinigung  $\text{NH}_3$  in Form der Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  festgestellt. Während *C. carboxidivorans* mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen von 5,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gesteigertes Wachstum und Alkoholproduktion zeigte, wurden mit *C. autoethanogenum* bereits mit der Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verringertes Wachstum und verringerte Produktion beobachtet. Dieses verringerte Wachstum bei Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurde ebenfalls für die acetogenen Mikroorganismen *C. ljungdahlii* und *C. ragsdalei* beobachtet (Oliveira et al. 2022), welche eine nahe genetische Verwandtschaft zu *C. autoethanogenum* aufweisen (Groher und Weuster-Botz 2016).

Die ermittelte Konzentration mit verringertem Wachstum und Alkoholproduktion von 1,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in der Flüssigphase entspricht einem Gasphasenanteil von 1521 ppm unter der Annahme vollständiger Absorption des Ammoniaks und keiner Desorption oder Aufnahme durch die Mikroorganismen bei der Begasungsrate 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> über eine Prozesszeit von 144 h. Für die Nutzbarkeit eines biogenen Synthesegases ist daher für Synthesegase mit kleineren  $\text{NH}_3$ -Gehalten keine starke Inhibierung der Mikroorganismen zu erwarten.

Die als kritisch ermittelte Konzentration 3,0 g L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  entspricht einem Gasphasenanteil von 4 562 ppm unter den gleichen Annahmen, sodass für ein biogenes Synthesegas mit der typischen Konzentration von bis zu 4 500 ppm  $\text{NH}_3$  (Kremling 2018; Jeremiáš et al. 2014) von einer Inhibierung ausgegangen werden müsste. Daher wäre für ein solches biogenes Synthesegas eine Synthesegasreinigung notwendig. Allerdings ist zu berücksichtigen,

sichtigen, dass in einem realen Synthesegasfermentationsprozess die Spurenverunreinigungen langsam akkumulieren würden, während diese in den gezeigten Untersuchungen bereits zu Beginn vorlagen.

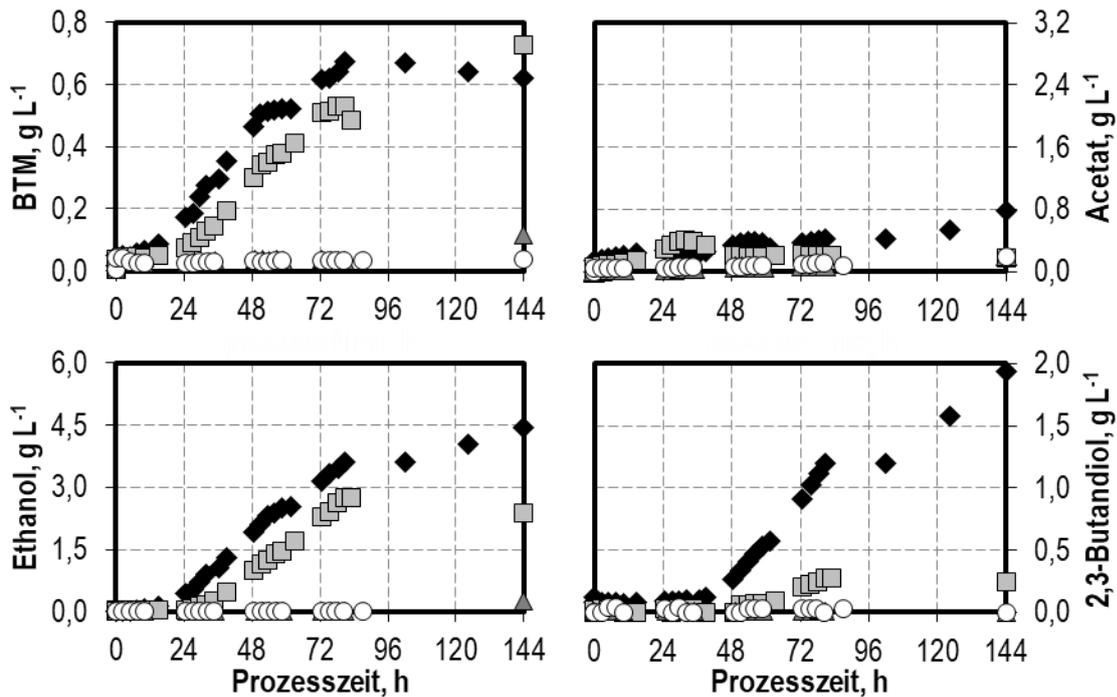
Im Grundmedium (Kapitel 4.2) im Referenzsatzprozess werden  $3,3 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  initial im Medium vorgelegt. Diese Konzentration könnte für Prozesse mit biogenem Synthesegas mit hohem Ammoniakgehalt reduziert werden, um negative Effekte auf Wachstum und Alkoholbildung durch akkumulierendes  $\text{NH}_3$  zu vermeiden. Für *C. ragsdalei* konnte gezeigt werden, dass eine Halbierung der initialen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration keinen negativen Effekt auf Wachstum und Produktbildung hatten (Saxena und Tanner 2012). Daher könnte auch für andere acetogene Clostridien eine initiale Reduktion der Ammoniumkonzentration voraussichtlich ohne schwerwiegende Einbußen durchgeführt werden.

### 6.1.3. Schwefelwasserstoff als Spurenverunreinigung

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen des Einflusses von Schwefelwasserstoff auf *C. autoethanogenum* in Satzprozessen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor durch die Zugabe definierter Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{S}$  aus der *in situ* Erzeugung mit Thioacetamid (Kapitel 4.6) sind in Abbildung 6-7 und Abbildung 6-8 gezeigt.

Die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (in Form von  $0,22 \text{ g}^{-1}$  Thioacetamid) führte zu einer Reduktion der initialen Wachstumsrate im Vergleich zum Referenzsatzprozess bei einer trotzdem um 9 % höheren maximalen Biotrockenmassekonzentration nach 144 h Prozesszeit. Die Zugabe höherer Konzentrationen von  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  führte zu nahezu keinem Wachstum während der gesamten Prozesszeit von 144 h.

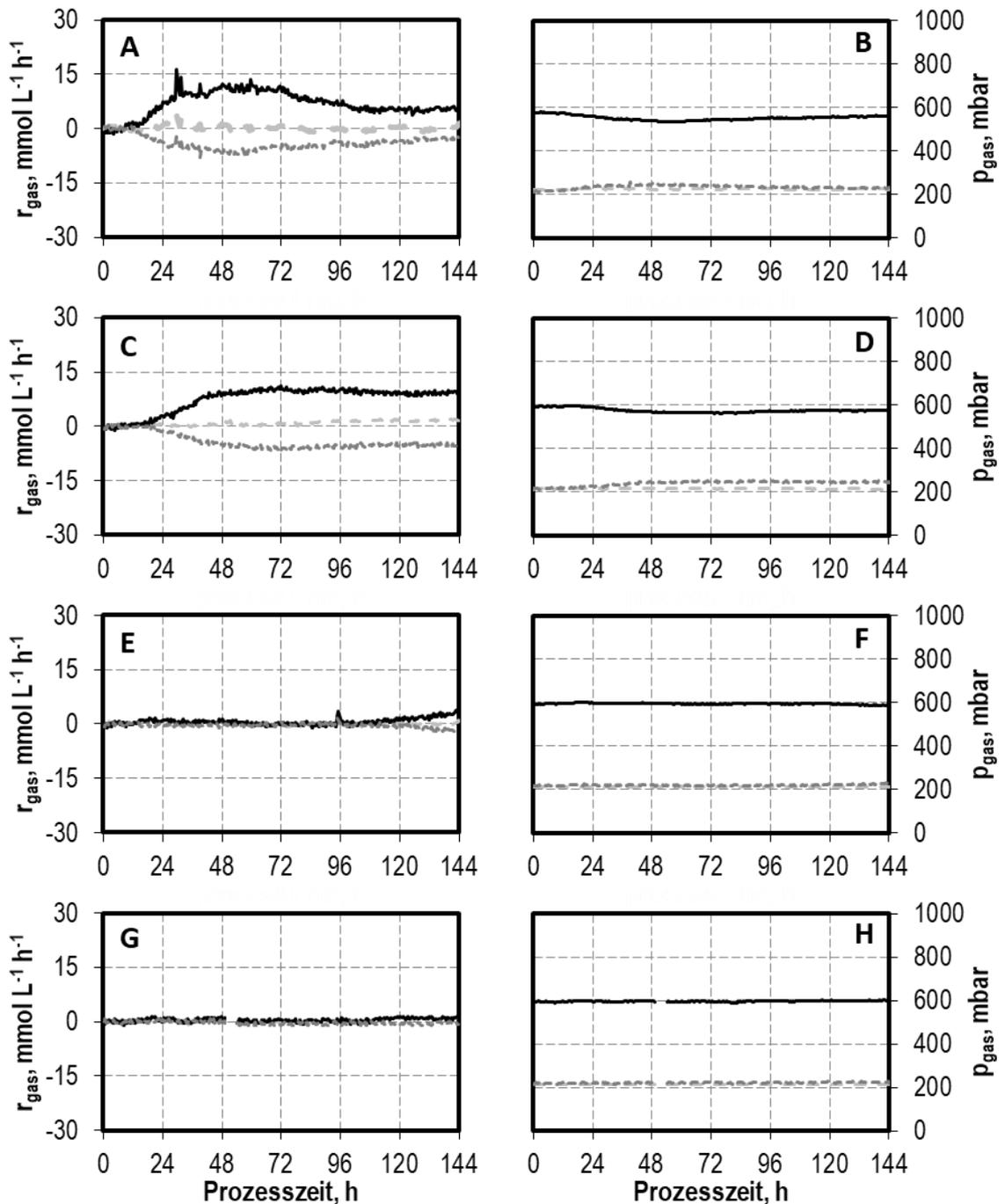
Die Produktbildung von *C. autoethanogenum* wurde ebenfalls durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  gesenkt und führte bereits bei  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  zu einer Reduktion der maximalen Acetatkonzentration um 76 %, der Ethanolkonzentration um 38 % und der 2,3-Butandiolkonzentration um 88%. Die Zugabe höherer Konzentrationen von  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  führte zu einer vollständigen Inhibierung der Produktbildung und es wurden mit Ausnahme von  $0,19 \text{ g L}^{-1}$  Acetat bei Zugabe von  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  keine weiteren Produkte gebildet.



**Abbildung 6-7** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) und mit Zugabe definierter Konzentrationen von + 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (hellgraue Quadrate  $\square$ ), + 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) und + 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (weiße Kreise  $\circ$ ) bei T = 37 °C, pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar und p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

Die maximale CO-Aufnahmerate wurde durch die Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S um 14 % im Vergleich zum Referenzsatzprozess reduziert. Dafür blieb die CO-Aufnahmerate bis Prozessende nahezu konstant bei 10 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, während die CO-Aufnahmerate im Referenzsatzprozess am Prozessende nach 144 h bereits auf 5 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> abgesunken war. Im Prozess mit 0,3 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S konnte bis nach 110 h Prozesszeit keine Gasaufnahme beobachtet werden. Im Anschluss daran wurde allerdings eine leichte Zunahme der CO-Aufnahmerate auf bis zu 3,7 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> beobachtet. Im Prozess mit Zugabe von 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S wurde auch bis zum Prozessende nach 144 h keine Gasaufnahme jenseits des Messrauschens beobachtet.

Die Kohlenstoffbilanzwiederfindung für die Prozesse mit H<sub>2</sub>S-Zugaben lagen zwischen 71,1 % und 92,7 % (Tabelle 6-4). Die teilweise unvollständig geschlossenen Kohlenstoffbilanzen resultieren aus unvollständig umgesetztem Kohlenstoff aus dem Medium (Hefeextrakt, Cystein und Thioacetamid) der nicht quantifizierten Verdunstung von Alkoholen. Im Prozess mit 0,3 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S ist durch die geringe CO-Aufnahmerate und CO<sub>2</sub>-Bildungsrate und somit das niedrige Signal-zu-Rauschen-Verhältnis die schlechteste Kohlenstoffwiederfindung bestimmt worden.



**Abbildung 6-8** Gasaufnahme- und Gaspartialdruckverläufe der Synthesegaskomponenten  $\text{CO}$  (schwarze durchgezogene Linie),  $\text{CO}_2$  (dunkelgrau gepunktete Linie) und  $\text{H}_2$  (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen +  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (C und D), +  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (E und F) und +  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (G und H) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ .

**Tabelle 6-4** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse, sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>S-Konzentrationen in Form von Thioacetamid.

	Referenz- satzprozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,3 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
C im Medium, mmol C	9,94	12,60	17,93	23,25
CO-Aufnahme, mmol C	923,46	937,34	91,24	<50
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	612,2	634,29	57,48	<20
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,51	1,48	1,59	-
C in Produkten, mmol C	233,62	107,4	16,38	2,85
C in Biomasse, mmol C	19,63	23,08	3,7	1,23
C-Bilanz (Wiederfindung), %	92,72%	80,51%	71,05%	-

Die spezifischen Wachstumsraten und Produktbildungsrate für die verschiedenen Zugaben von H<sub>2</sub>S sind in Tabelle 6-5 dargestellt. Die maximale spezifische Wachstumsrate von *C. autoethanogenum* wurde durch die Zugaben von H<sub>2</sub>S gesenkt. Nur im Satzprozess mit Zugabe von 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S wurde die maximale Acetat- und Ethanolbildungsrate im Vergleich zum Referenzsatzprozess leicht gesteigert.

**Tabelle 6-5** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsrate der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>S-Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,3 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S
μ <sub>max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,065	0,054	0,033	0,002
Q <sub>Acetat,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,005	0,016	0,002	0,002
q <sub>Acetat,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,063	0,428	0,037	0,049
Q <sub>Ethanol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,066	0,071	0,006	0,000
q <sub>Ethanol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,249	0,277	0,109	0,001
Q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,024	0,010	0,000	0,000
q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,044	0,027	0,000	0,001

### Diskussion

Die Untersuchungen zum Einfluss von H<sub>2</sub>S auf Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* zeigten deutliche negative Einflüsse von H<sub>2</sub>S auf Wachstum und Alkoholproduktion. Für *C. carboxidivorans* konnte in dieser Arbeit eine Erhöhung von Wachstum und Produkt-

bildung mit bis zu  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  ermittelt werden (Kapitel 5.1.3). Für den acetogenen Mikroorganismus *C. ragsdalei* konnten mit bis zu  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  noch Steigerungen von Wachstum und Alkoholproduktion beobachtet werden (Oliveira et al. 2022).

Die ermittelte Konzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ , bei der moderate negative Effekte auf Wachstum und Produktbildung von *C. autoethanogenum* festgestellt wurden, entspräche der Menge, die bei einem Gasphasenanteil von 45 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  unter der Annahme vollständiger Absorption und keiner Desorption oder Aufnahme durch die Mikroorganismen nach einer Prozesszeit von 144 h und einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  akkumulieren würde. Die kritische Konzentration von  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  entspräche unter den gleichen Annahmen einem Anteil von 135 ppm  $\text{H}_2\text{S}$ . Somit wäre ein typisches biogenes Synthesegas aus der Flugstromvergasung biogener Reststoffe mit bis zu 200 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  (Kremling 2018) kritisch für einen Gasfermentationsprozess mit *C. autoethanogenum* und eine Synthesegasreinigung für  $\text{H}_2\text{S}$ -Anteile unter 135 ppm wäre notwendig.

#### 6.1.4. Nitrat als Spurenverunreinigung

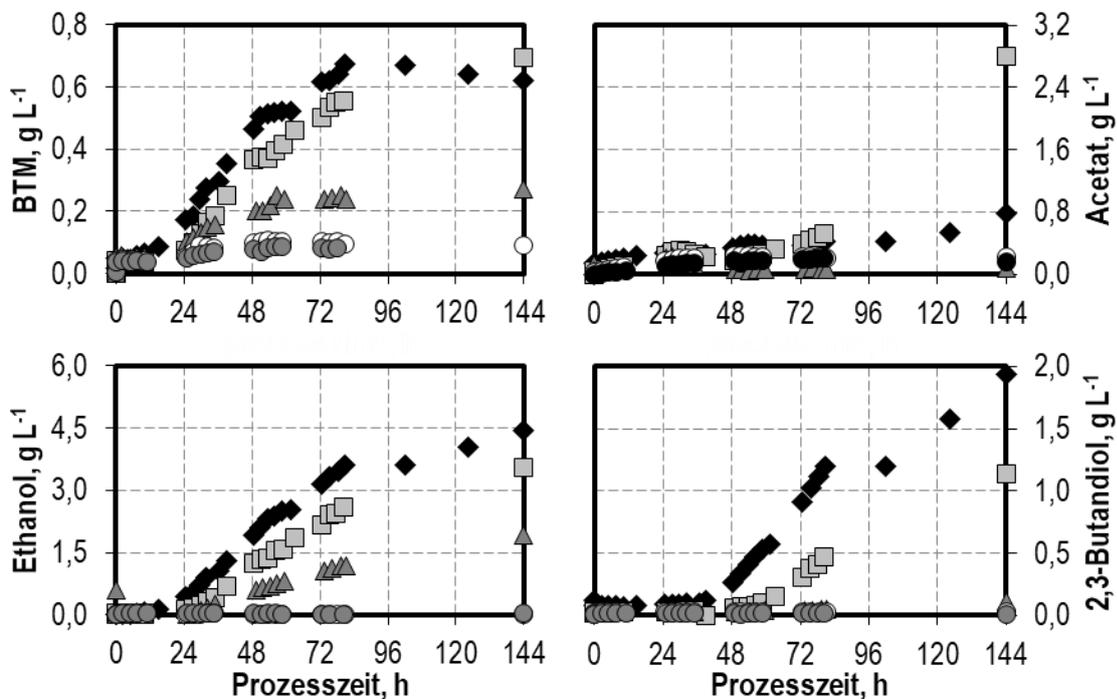
Der Einfluss von Nitrat auf Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor wurde durch Zugaben definierter Konzentrationen von  $\text{NaNO}_3$  untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-9 und Abbildung 6-10 dargestellt.

Durch die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  wurde die initiale Wachstumsrate geringfügig gesenkt, wobei trotzdem die nahezu gleiche maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde. Die Zugabe von  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  hingegen senkte die maximale Biotrockenmassekonzentration deutlich um 60 % im Vergleich zum Referenzsatzprozess. Die Zugabe von  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  und  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  senkte die maximal erreichte Biomassekonzentration um 87 % auf  $0,09 \text{ g L}^{-1}$ .

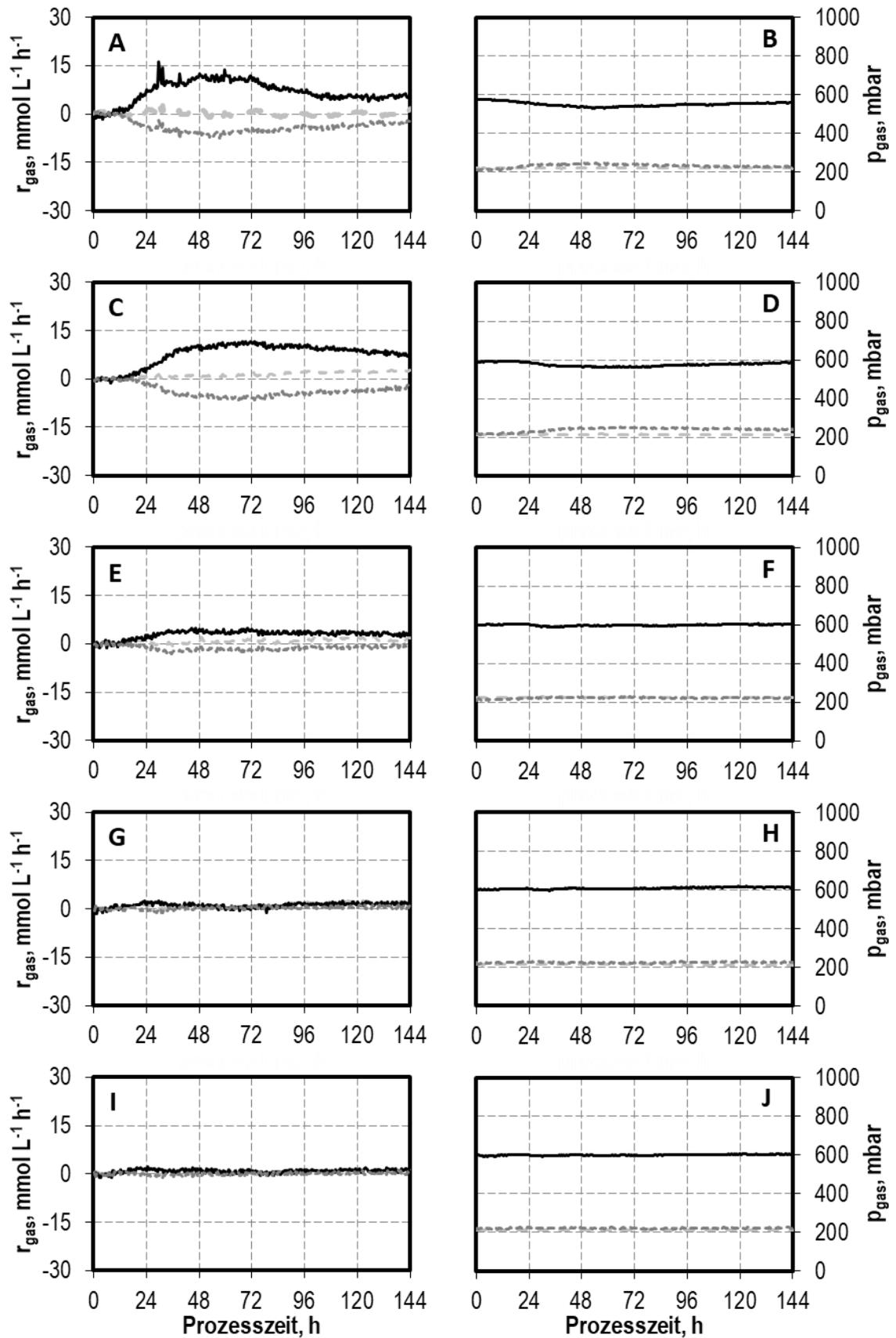
Die Produktbildung wurde bereits durch die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  negativ beeinflusst, indem die maximale Ethanolkonzentration um 20 % und die 2,3-Butandiolkonzentration um 41 % reduziert wurden. Gleichzeitig stieg die maximale Acetatkonzentration um den Faktor 3,5 an. Für die Zugabe von  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  wurden die Produktkonzentrationen noch stärker gesenkt, sodass um 57 % weniger Ethanol und keine quantifizierbaren Mengen von Acetat oder 2,3-Butandiol produziert wurden. Die Zugabe höherer Konzentrationen von  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  und  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  führte zu keiner Bildung von Produkten.

Die maximal erreichte CO-Aufnahmerate war durch die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  bei  $11 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  genauso hoch wie im Referenzsatzprozess. Ebenso wie die Produktbildung wurde die Gasaufnahme durch die Zugaben höherer Konzentrationen von  $\text{NaNO}_3$  inhibiert, sodass mit  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  um 60 % weniger maximale CO-Aufnahmerate und mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  und  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  gar keine quantifizierbare Gasaufnahme außerhalb des Messrauschens beobachtet wurden.

Die Kohlenstoffbilanzwiederfindung in den gezeigten Prozessen lag zwischen 86,1 % und 92,7 % (Tabelle 6-6). Die teilweise unvollständig geschlossenen Kohlenstoffbilanzen resultieren aus unvollständig umgesetztem Kohlenstoff aus dem Medium (Hefeextrakt und Cystein) und der nicht quantifizierten Verdunstung von Alkoholen.



**Abbildung 6-9** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute ◆) und mit Zugabe variiert definierter Konzentrationen von  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (hellgraue Quadrate ◻),  $+ 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (dunkelgraue Dreiecke ▲),  $+ 0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (weiße Kreise ○), sowie von  $+ 1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (dunkelgraue Kreise ●) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ .



**Abbildung 6-10** Gasenaufnahmeraten und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten  $\text{CO}$  (schwarze durchgezogene Linie),  $\text{CO}_2$  (dunkelgrau gepunktete Linie) und  $\text{H}_2$  (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich beagerten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter

Spurenverunreinigungen + 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (C und D), + 0,2 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (E und F) und + 0,5 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (G und H) und + 1,0 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (I und J) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar, p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

**Tabelle 6-6** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener NaNO<sub>3</sub>-Konzentrationen.

	Referenz- satzpro- zess	+ 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 0,2 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
C im Medium, mmol C	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94
CO-Aufnahme, mmol C	923,46	936,56	302,10	<50	<50
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	612,2	536,38	177,77	<20	<20
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,51	1,75	1,70	-	-
C in Produkten, mmol C	233,62	256,26	83,23	4,63	4,81
C in Biomasse, mmol C	19,63	22,03	8,64	2,86	3,24
C-Bilanz (Wiederfindung), %	92,72%	86,07%	86,41%	-	-

Die spezifischen Wachstumsraten sowie Produktbildungsrate der Prozesse mit Zugabe von Nitrat sind in Tabelle 6-7 dargestellt. Für die spezifische Wachstumsrate zeigte sich eine deutliche Abnahme mit zunehmender NaNO<sub>3</sub>-Konzentration. Die Acetatbildungsrate wurde im Satzprozess mit 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> deutlich gegenüber dem Referenzsatzprozess gesteigert. Die Alkoholbildungsrate hingegen wurden mit zunehmender Nitratkonzentration deutlich verringert.

**Tabelle 6-7** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsrate der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener NaNO<sub>3</sub>-Konzentrationen.

	Referenz- satzprozess	0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	0,2 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	0,5 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	1,0 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
μ <sub>max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,065	0,059	0,038	0,028	0,018
Q <sub>Acetat,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,005	0,150	0,004	0,008	0,005
q <sub>Acetat,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,063	0,226	0,085	0,170	0,107
Q <sub>Ethanol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,066	0,053	0,024	0,000	0,000
q <sub>Ethanol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,249	0,204	0,110	0,000	0,000
Q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,024	0,018	0,002	0,000	0,000
q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,044	0,032	0,007	0,000	0,000

### Diskussion

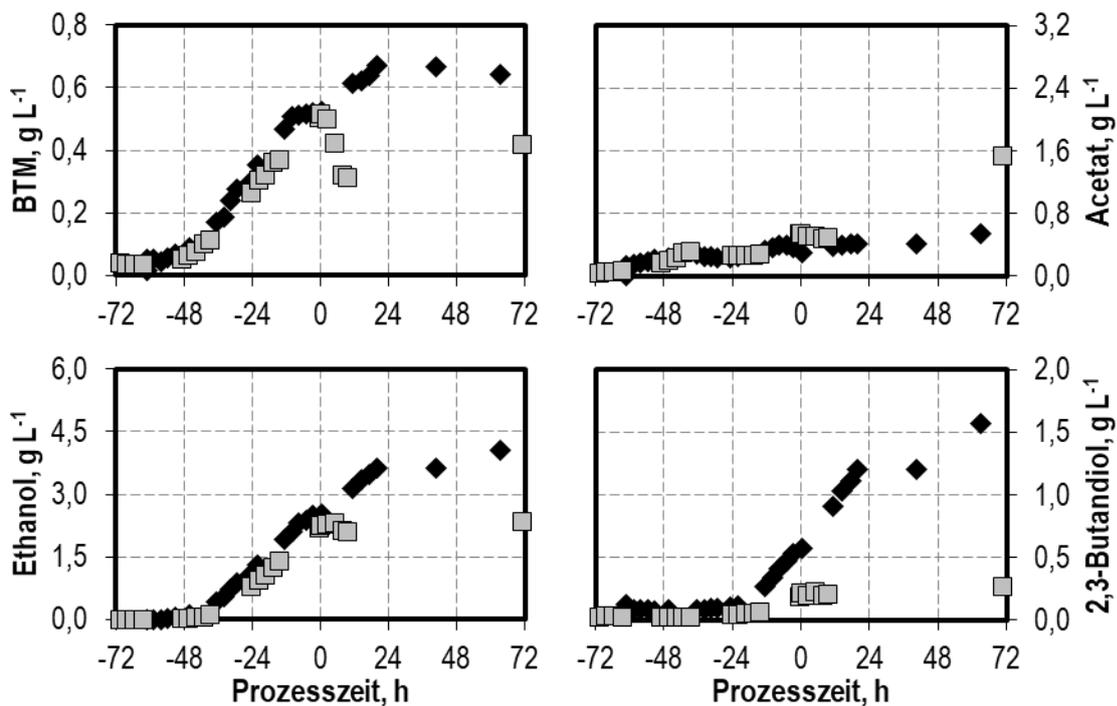
Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von  $\text{NaNO}_3$  auf Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor zeigten eine deutliche Abnahme von Wachstum und Produktbildung bei Konzentrationen ab  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Ebenso wie bei *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.1.4) führte die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  zu einer Steigerung der Säureproduktion auf Kosten der Alkoholproduktion. Allerdings wurde anders als bei *C. carboxidivorans* keine ausgeprägte initiale Verzögerungsphase beobachtet, in welcher lediglich Nitratreduktion stattfand (Kapitel 5.1.4). Stattdessen fand auch bei der Zugabe von bis zu  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  von Anfang an Wachstum von *C. autoethanogenum* statt.

Im Vergleich dazu wurde in Satzprozessen in geschüttelten Anaerobflaschen mit *C. ljungdahlii* mit Zugabe von  $15 \text{ mM}$  Nitrat (entspricht  $1,3 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ) mit  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als Substratgas eine Steigerung der spezifischen Wachstumsrate um  $75 \%$  und eine Erhöhung des Alkohol-zu-Säure-Verhältnisses beobachtet (Emerson et al. 2019). Allerdings merken die Autoren an, dass dieser Effekt mit  $\text{CO}$  als Substratgas nicht beobachtet wurde (Emerson et al. 2019).

Nitrat kann beim Lösen von Stickoxiden in wässrigen Medien entstehen und kann damit für die Gasfermentation mit biogenen Synthesegasen eine große Rolle spielen (Kapitel 5.1.4). Die ermittelten kritischen Konzentrationen von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  entspräche einem  $\text{NO}_x$ -Anteil von  $49 \text{ ppm NO}_x$ , wenn der gesamte Stickstoff aus dem  $\text{NO}_x$  zu Nitrat umgesetzt würde, unter der Annahme vollständiger Absorption im wässrigen Medium und keiner Desorption oder Aufnahme durch die Mikroorganismen über die gesamte Prozesszeit von  $144 \text{ h}$  bei einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Entsprechend würde unter den gleichen Annahmen eine Konzentration von  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  in einem Gasphasenanteil von  $98 \text{ ppm}$  resultieren. Daher wäre für einen Synthesegasfermentationsprozess mit *C. autoethanogenum* mit biogenem Synthesegas mit einem typischen  $\text{NO}_x$ -Anteil von bis zu  $200 \text{ ppm}$  (Kremling 2018) eine Gasreinigung im Hinblick auf  $\text{NO}_x$  erforderlich.

### 6.1.5. Nitrit als Spurenverunreinigung

Die Untersuchungen zum Einfluss von Nitrit auf Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor wurden durch die definierte Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  durchgeführt. Dabei erfolgte die Zugabe in der Wachstumsphase nachdem bereits eine Biotrockenmassekonzentration von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  vorlag. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-11 und Abbildung 6-12 dargestellt. Die Zeitachsen sind dabei so dargestellt, dass die Zugabe des  $\text{NaNO}_2$  eine Prozesszeit von 0 h markiert.

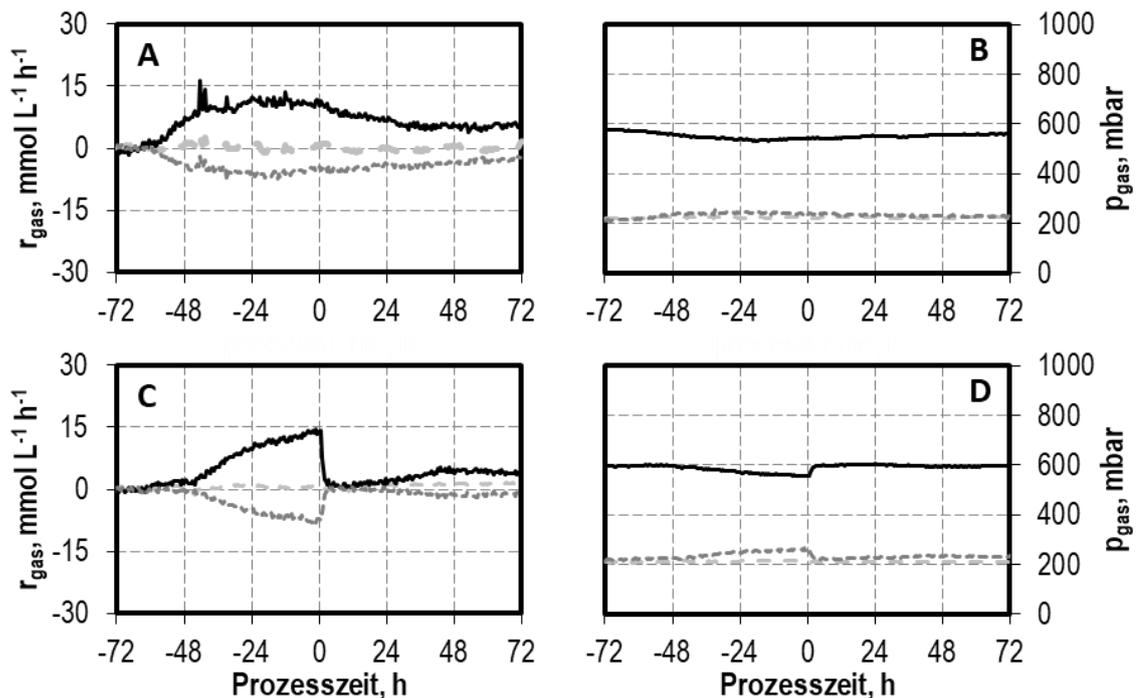


**Abbildung 6-11** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) und mit der Zugabe der definierten Konzentration von  $+0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  (hellgraue Quadrate  $\square$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Prozesszeit 0 h zeigt den Zugabezeitpunkt der  $\text{NaNO}_2$ -Lösung.

Nach der Zugabe von  $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  72 h nach Prozessbeginn kam es in den folgenden 9,5 h zu einem raschen Absinken der Biotrockenmassekonzentration um 40 %. Im Anschluss daran kam es zu einem langsamen und leichten Anstieg der Biotrockenmassekonzentration, welche jedoch nicht mehr den vorherigen Wert vor der Nitritzugabe erreichte. Die Konzentrationen von Ethanol und 2,3-Butandiol blieben von da an kon-

stant bis zum Prozessende. Die Acetatkonzentration hingegen stieg, nachdem die Biomassekonzentration wieder anstieg, ebenfalls an und erreichte um Faktor 2,8 höhere maximale Acetatkonzentrationen als im Referenzsatzprozess.

Unmittelbar im Anschluss an die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  fiel die  $\text{CO}$ -Aufnahmerate auf  $0 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ab. Als das Wachstum wieder aufgenommen wurde, stieg die  $\text{CO}$ -Aufnahmerate wieder auf maximal  $4,2 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  an.



**Abbildung 6-12** Gasenaufnahmeraten und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten  $\text{CO}$  (schwarze durchgezogene Linie),  $\text{CO}_2$  (dunkelgrau gepunktete Linie) und  $\text{H}_2$  (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen  $+ 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  (C und D) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Prozesszeit  $0 \text{ h}$  zeigt den Zugabezeitpunkt der  $\text{NaNO}_2$ -Lösung.

### Diskussion

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit mit *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.1.5) konnte mit *C. autoethanogenum* nach der Zugabe von  $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  ein sofortiges Absinken der Biotrockenmassekonzentration festgestellt werden. Allerdings konnte *C. autoethanogenum* nach einer Adaptionsphase erneut das Wachstum aufnehmen und dabei  $\text{CO}$  fixieren und Produkte bilden. Für den anaeroben Mikroorganismus *Moorella thermoacetica* wurde bei Konzentrationen von bis zu  $0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$

(5 mmol L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) Wachstum beobachtet sowie die Nutzung des Nitrits als alternativen terminalen Elektronenakzeptor festgestellt (Seifritz et al. 2003). *C. autoethanogenum* besitzt in seinem Genom die Gene für eine Nitritreduktase (Humphreys et al. 2015), welche auch zur Verwertung von Nitrat in der mehrstufigen Reduktion zu Ammonium (Kapitel 3.1.2) benötigt wird (Emerson et al. 2019). Daher wäre eine Adaption an das im Medium vorliegende Nitrit sowie dessen Abbau durch den Mikroorganismus möglich.

Nitrit kann sich beim Lösen von Stickoxiden im wässrigen Medium bilden (Kapitel 5.1.4) (Joshi et al. 1985). Freies HNO<sub>2</sub> ist jedoch instabil und dissoziiert unter der Bildung von Nitrat (Park und Lee 1988; Joshi et al. 1985). Dabei entspricht die kritische Konzentration von 0,01 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> einem Gasphasenanteil von 4 ppm, wenn der gesamte Stickstoff aus NO<sub>x</sub> in Nitrit umgesetzt würde, unter der Annahme vollständiger Absorption im wässrigen Medium und keiner Aufnahme durch die Mikroorganismen nach 144 h bei einer Begasungsrate von 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Daher ist die Reinigung eines biogenen Synthesegases mit typischen NO<sub>x</sub>-Anteilen von bis zu 200 ppm (Kremling 2018) von Stickoxiden trotz der höheren Toleranz im Vergleich zu *C. carboxidivorans* auch für *C. autoethanogenum* notwendig.

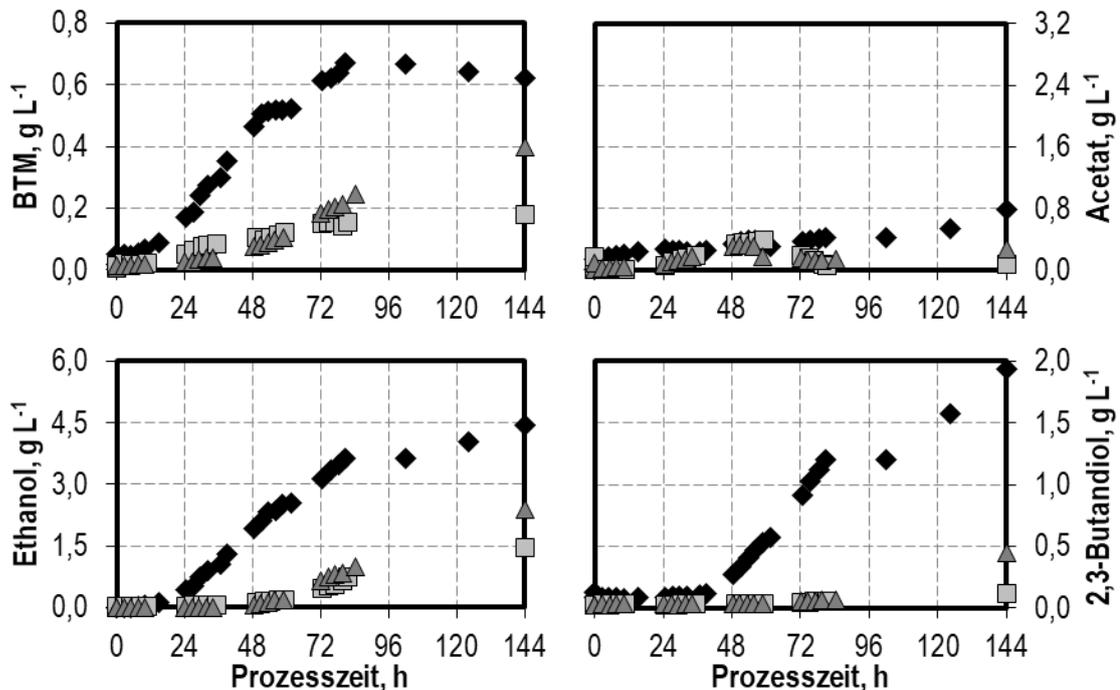
### 6.1.6. Kombinationen von Spurenverunreinigungen

Aufbauend auf den Ergebnissen zu den einzelnen Einflüssen von Spurenverunreinigungen auf *C. autoethanogenum* wurden auch Untersuchungen zu ausgewählten Kombinationen von Spurenverunreinigungen durchgeführt. Dabei wurden Konzentrationen ausgewählt, die einzeln nur eine relativ geringe Verringerung von Wachstum und Alkoholproduktion zeigten. Hierzu wurde die Kombination von 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Prozess mit der Kombination der jeweils halben Konzentrationen dieser Kombination mit 0,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,05 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,05 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> durchgeführt. Die Ergebnisse der Satzprozesse sind in Abbildung 6-13 und Abbildung 6-14 gezeigt.

Die Konzentrationen 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> hatten alle individuell nur leichte Verringerungen der maximalen Wachstumsrate (um maximal 17 % bei Zugabe von 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, siehe Kapitel 6.1.2) und keine wesentliche Verringerung der maximalen Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zum Referenzsatzprozess zur Folge. In der Kombination dieser drei Spurenverunreinigungen kam es zu einem deutlich geringeren Wachstum und einer deutlich verringerten maximalen Biomassekonzentration von 0,18 g L<sup>-1</sup> nach 144 h Prozesszeit (Verringerung um 72 %) im Vergleich zum Referenzsatzprozess. Ebenfalls wurde durch Zugabe dieser Kombination die maximale

Acetatkonzentration um 66 %, die maximale Ethanolkonzentration um 67 % und die maximale 2,3-Butandiolkonzentration sogar um 94 % gesenkt.

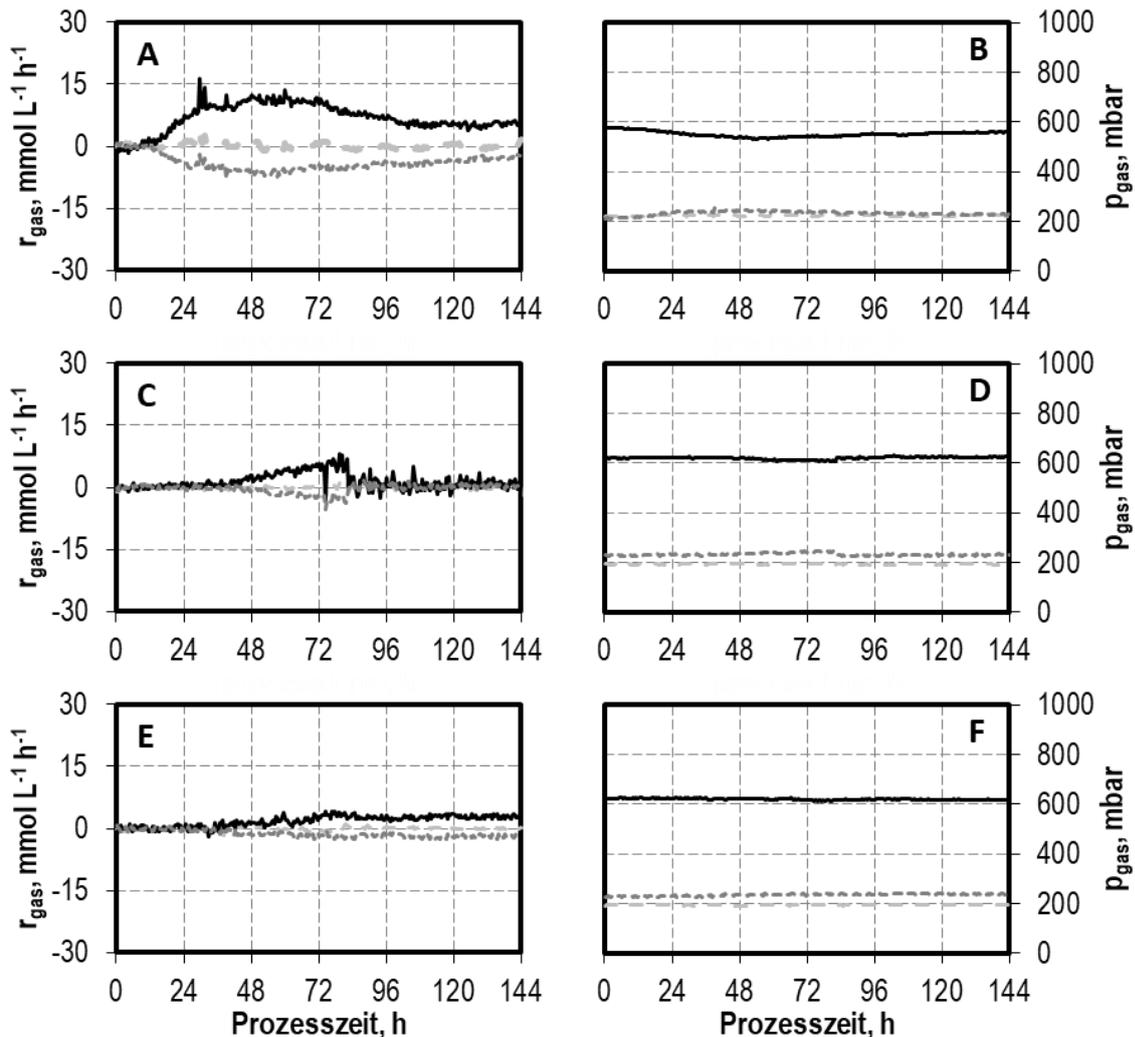
Da die erste untersuchte Kombination von Spurenverunreinigungen bereits einen erheblichen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung von *C. autoethanogenum* zeigte, wurde in der Folge die Kombination der jeweils halbierten Konzentrationen  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls eine deutliche Verzögerung des Wachstums sowie der Produktbildung. Trotzdem wurde eine höhere maximale Biomassekonzentration sowie eine höhere maximale Ethanolkonzentration beobachtet als im Satzprozess mit doppelten Spurenverunreinigungskonzentrationen. Die Verringerung betrug jedoch 35 % für BTM, 66 % für Acetat, 46 % für Ethanol und 77 % für 2,3-Butandiol im Vergleich zum Referenzsatzprozess.



**Abbildung 6-13** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute ◆) und mit Zugabe definierter Kombinationen von Konzentrationen von  $+ 1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $+ 0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (hellgraue Quadrate □) und  $+ 0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $+ 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $+ 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (dunkelgraue Dreiecke ▲) bei  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$  und  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ .

Auch die maximalen CO-Aufnahme- und CO<sub>2</sub>-Bildungsraten wurden durch die Zugabe der Kombinationen gesenkt. Die Kombination von  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  führte zu einer Abnahme der maximalen CO-Aufnahmerate um 29 %. Im Satzprozess mit der Kombination von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und

0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> wurde die maximale CO-Aufnahme noch stärker um 68 % verringert. Zusätzlich kam es nach 82 h zu einem plötzlichen Absinken der CO-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Bildung in diesem Prozess. Analog war auch die jeweils insgesamt aufgenommene Menge von CO durch die Zugaben der Kombinationen von Spurenverunreinigungen um 72 % für 0,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,05 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,05 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> und um 77 % mit 1,0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und 0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> reduziert (Tabelle 6-8).



**Abbildung 6-14** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen + 1,0 NH<sub>4</sub>Cl, +0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und +0,1 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (C und D) und +0,5 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, +0,05 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und +0,05 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (E und F) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH 6,0 (geregelt mit 3 M NaOH und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 200 mbar, p<sub>H<sub>2</sub></sub> = 200 mbar.

Die Kohlenstoffbilanzwiederfindung (Tabelle 6-8) lag zwischen 92,7 % und 100,9 %. Die Kohlenstoffbilanzen sind teilweise aufgrund von nicht quantifizierten Effekten durch unvollständig verwerteten Kohlenstoff im Medium (Hefeextrakt und Cystein) sowie durch Verdunstungseffekte der gebildeten Alkohole nicht vollständig geschlossen.

**Tabelle 6-8** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener Kombinationen definierter Spurenverunreinigungen NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>S und NaNO<sub>3</sub>.

	Referenz- satzprozess	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,05 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,05 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
C im Medium, mmol C	9,94	11,28	12,61
CO-Aufnahme, mmol C	923,46	211,45	259,60
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	612,2	94,55	188,21
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,51	2,24	1,38
C in Produkten, mmol C	233,62	117,67	67,39
C in Biomasse, mmol C	19,63	12,57	5,62
C-Bilanz (Wiederfindung), %	92,72%	100,92%	95,96%

Ebenso wie die maximal erreichten Konzentrationen wurden durch die Zugaben von Kombinationen der Spurenverunreinigungen NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>S und NaNO<sub>3</sub> auch die maximalen Raten von Wachstum und Produktbildung deutlich reduziert (Tabelle 6-9). Während die maximalen Wachstumsraten um 25 % und 29 % gesenkt wurden, waren insbesondere die volumetrischen Ethanolbildungsraten um 45 % und 68 % gesunken.

**Tabelle 6-9** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zugabe verschiedener Kombinationen definierter Spurenverunreinigungen NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>S und NaNO<sub>3</sub>.

	Referenz- satzprozess	+ 0,5 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,05 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,05 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>	+ 1,0 g L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 g L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> S + 0,1 g L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub>
μ <sub>max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,065	0,049	0,046
Q <sub>Acetat,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,005	0,009	0,001
q <sub>Acetat,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,063	0,321	0,002
Q <sub>Ethanol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,066	0,036	0,021
q <sub>Ethanol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,249	0,197	0,144
Q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,024	0,034	0,001
q <sub>2,3-Butandiol,max</sub> , h <sup>-1</sup>	0,044	0,084	0,022

### Diskussion

Die Zugabe definierter Kombinationen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NaNO}_3$  zu autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* führte zu deutlichen Verringerungen von Wachstum und Produktbildung. Im Vergleich zu den individuellen Zugaben der identischen Spurenverunreinigungskonzentrationen ergab sich eine deutlich stärkere Inhibierung. Während in Satzprozessen mit den einzelnen Konzentrationen  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  jeweils nur geringfügige Einflüsse auf Wachstum und Produktbildung beobachtet wurden, waren in der Kombination sowohl Wachstum als auch Produktbildung stark inhibiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen mit *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.1.6), in welchen ebenfalls eine deutlich stärkere Inhibierung durch die Kombination mehrerer Spurenverunreinigungen festgestellt wurde.

Auffällig ist im Prozess mit  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  das plötzliche Absinken der  $\text{CO}$ -Aufnahmerate nach 82 h. In Prozessen mit *C. ljungdahlii* mit  $\text{NaNO}_3$  wurde von Klask et al. (2020) stochastische Inhibierungsereignisse beobachtet, welche von den Autoren auf die Bildung von Nitrit durch die Reduktion des Nitrats (Kapitel 3.1.2, Abbildung 3-3) zurückgeführt wurden. Auch *C. autoethanogenum* reagiert bereits auf geringe Mengen von  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  Nitrit mit spontaner Abnahme der  $\text{CO}$ -Aufnahme bei deutlich höheren Biomassekonzentrationen als im Satzprozess mit der Kombination von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (Kapitel 6.1.5, Abbildung 6-12). In Prozessen mit Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (Kapitel 6.1.4) wurde dieser Effekt durch die Umsetzung von Nitrat jedoch nicht beobachtet. Möglicherweise könnte der generell höhere Stress der Mikroorganismen im Satzprozess mit  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  den inhibierenden Effekt verstärkt haben.

Während für die einzelnen Spurenverunreinigungskomponenten in den vorangegangenen Untersuchungen zur Definition von Konzentrationslimits der Anteile in einem Synthesegas von 1901 ppm  $\text{NH}_3$ , 135 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  und 49 ppm  $\text{NO}_x$  führen würden, müssten diese Grenzwerte für gleichzeitig vorhandene Verunreinigungen angepasst werden. Die Gelöstkonzentrationen von  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  und  $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  entsprächen 317 ppm  $\text{NH}_3$ , 23 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  und 25 ppm  $\text{NO}_x$  unter der Annahme vollständiger Absorption im Reaktionsmedium und weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen über eine Prozesszeit von 144 h bei einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

Somit wäre bei der Verwendung von *C. autoethanogenum* eine Reinigung eines Synthesegases in Bezug auf diese Spurenverunreinigungen notwendig. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass diese Berechnungen nicht berücksichtigen, dass in einem

realen Synthesegasfermentationsprozess die gesamte Spurenverunreinigungskonzentration nicht unmittelbar zu Beginn des Prozesses vorläge, sondern langsam im Bioreaktor akkumulieren würde. Dadurch könnte sowohl eine Adaption der Mikroorganismen an die Verunreinigung erfolgen als auch die über die lange Prozesszeit erfolgende Desorption der Spurenverunreinigung die tatsächliche Gelöstkonzentration senken.

## 6.2. Vergleich der autotrophen Alkoholproduktion von *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*

Die Ergebnisse der autotrophen Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mikroorganismenstämmen im Hinblick auf ihr Wachstums- und Produktbildungsverhalten im Referenzsatzprozess sowie bei Inhibierungsstudien mit definierten Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NO}_x$ ).

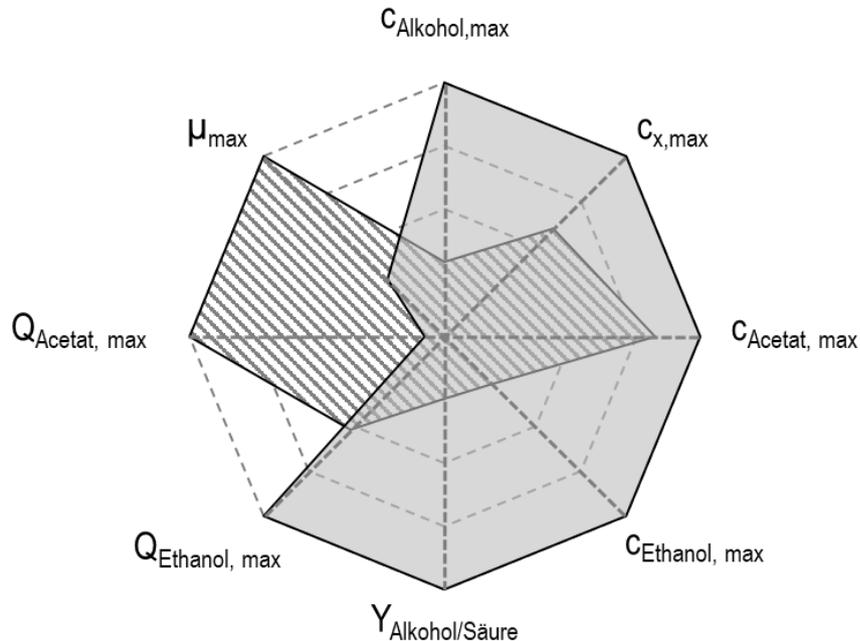
Die Voruntersuchungen zum Einfluss des CO-Anteils auf *C. autoethanogenum* in geschüttelten Anaerobflaschen zeigte, dass ebenso wie mit *C. carboxidivorans* eine starke Bevorzugung hoher CO-Anteile vorliegt, wobei 60 % CO die in dieser Arbeit höchste Wachstumsrate und Ethanolproduktion zeigte (Kapitel 6.1.1). Für *C. carboxidivorans* wurde das Optimum zwischen 40 % CO und 80 % CO berichtet (Doll 2018). Zudem wurde für die beiden acetogenen Mikroorganismen eine starke Bevorzugung von CO gegenüber  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  festgestellt, wobei in allen Satzprozessen mit hohem CO-Anteil von 30 % und höher keine gleichzeitige Verwertung von CO mit  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  beobachtet wurde.

Bei Untersuchungen mit Reingasen im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor zeigte sich, dass für *C. autoethanogenum* im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* keine quantitative Wiederaufnahme von Acetat und Umsetzung zu Ethanol stattfand (Kapitel 6.1.1). Daher ist eine pH-Regelung zum Erreichen hoher Alkoholkonzentrationen mit *C. autoethanogenum* notwendig. Im Gegensatz dazu zeigt *C. carboxidivorans* die höchste Alkoholproduktion mit unreguliertem pH, wobei bei sinkendem pH bereits gebildetes Acetat wiederaufgenommen und in Alkohole umgesetzt wird.

Die somit etablierten autotrophen Referenzsatzprozesse mit dem jeweils besten Wachstum und der besten Alkoholproduktion wurden im Hinblick auf maximale Produktkonzentrationen, Wachstums- und Produktbildungsraten und Alkohol-zu-Säure-Verhältnis verglichen und sind in Abbildung 6-15 gegenübergestellt.

Der Vergleich der autotrophen Referenzsatzprozesse mit *C. autoethanogenum* und *C. carboxidivorans* zeigt deutliche Unterschiede der beiden Mikroorganismenstämmen. *C. carboxidivorans* ist insbesondere durch seine sehr viel höhere spezifische Wachstumsrate charakterisiert, wobei auch die maximale volumetrische Acetatbildungsrate deutlich höher ist als bei *C. autoethanogenum*. *C. autoethanogenum* hingegen weist höhere maximale Konzentrationen von Biomasse, sowie aller Produkte und dabei auch ein

höheres Alkohol-zu-Säure-Verhältnis sowie eine höhere maximale volumetrische Ethanolbildungsrate auf.



**Abbildung 6-15** Vergleich der autotrophen Referenzsatzprozesse mit *C. carboxidivorans* (schraffierte Fläche) und *C. autoethanogenum* (hellgraue Fläche) in Bezug auf die maximalen Konzentrationen von Gesamtalkohol, Biomasse, Acetat und Ethanol, dem Alkohol-zu-Säure-Verhältnis und der maximalen spezifischen Wachstumsrate sowie der maximalen volumetrischen Bildungsrate von Acetat und Ethanol.

### Diskussion

Für die technische Umsetzung eines Synthesegasfermentationsprozesses sind eine hohe Alkoholproduktivität, eine hohe Alkoholkonzentration und ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis von größter Bedeutung. Da die Wertschöpfung des Prozesses insgesamt gering ist, müssen die Produktbildungsrate hoch sein (Vees et al. 2020). Da zusätzlich die Alkohole das wertvollere Produkt darstellen aufgrund ihrer Einsatzmöglichkeiten als Kraftstoffe und Kraftstoffzusätze beziehungsweise als Lösemittel oder Ausgangsstoffe für chemisch-katalytische Weiterverarbeitung zu wertvolleren Stoffen (Köpke et al. 2011a; Dürre 2007; Liu et al. 2016). Hohe Alkoholkonzentrationen und ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis sind darüber hinaus notwendig für einen wirtschaftlichen Produktabtrennungsprozess über etablierte thermische Trennverfahren wie Rek-

tifikation oder Adsorption (Ezeji et al. 2004). Somit ist im autotrophen Referenzsatzprozess *C. autoethanogenum* ein vielversprechender acetogener Mikroorganismus. Zusätzlich ist für einen industriellen Prozess ein hoher Gasumsatz notwendig. Für *C. autoethanogenum* ist in der Literatur eine bessere Verwertung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> berichtet als für *C. carboxidivorans*, welcher im Vergleich zu CO sehr schlecht CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> verwerten kann (Doll 2018; Mock et al. 2015). *C. carboxidivorans* ist im Referenzsatzprozess lediglich aufgrund seines schnelleren Wachstums und des daraus resultierenden schnelleren Erreichens der maximalen Alkoholkonzentrationen relevant, da dadurch die Prozesszeiten kürzer gehalten werden könnten. In industriellen Synthesegasfermentationsprozessen würden Prozesse aufgrund der geringen Wertschöpfung immer kontinuierlich geführt (Vees et al. 2020). Dabei könnte wiederum ein im Fließgleichgewicht hohe Biomasse- und Ethanolkonzentration wichtiger sein als die spezifische Wachstumsrate.

#### Toleranz gegenüber den Spurenverunreinigungen NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und NO<sub>x</sub>

Bei der Toleranz der beiden Mikroorganismen gegenüber den typischen Spurenverunreinigungs-komponenten aus biogenen Synthesegasen (NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, NO<sub>x</sub>) ergaben sich deutliche Unterschiede, welche mit ihren kritischen Konzentrationen in der Flüssigphase und den zugehörigen Gasphasenanteilen unter der Annahme vollständiger Absorption und weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen über die gesamte Prozesszeit von 144 h bei 0,083 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> in Tabelle 6-10 zusammengefasst sind.

**Tabelle 6-10** Zusammenfassung der kritischen Konzentrationen definierter Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen und der zugehörigen Gasphasenanteile von NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, NO<sub>x</sub> als Nitrit und Nitrat für *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*. Gezeigt sind Konzentrationen, die zu Verbesserungen von Wachstum und Alkoholproduktion führten oder ähnlich hohes Wachstum und Alkoholproduktion zeigten, sowie Konzentrationen, die stark inhibierend wirkten.

		<i>C. carboxidivorans</i>		<i>C. autoethanogenum</i>	
		positiv oder ähnlich	stark inhibierend	positiv oder ähnlich	stark inhibierend
<b>NH<sub>3</sub></b>	C <sub>krit</sub> , g L <sup>-1</sup>	5,0	10,0	1,0	3,0
	X <sub>krit</sub> , ppm	3 168	6 336	634	1 901
<b>H<sub>2</sub>S</b>	C <sub>krit</sub> , g L <sup>-1</sup>	1,0	2,0	0,1	0,3
	X <sub>krit</sub> , ppm	451	902	45	135
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>)</b>	C <sub>krit</sub> , g L <sup>-1</sup>	0,1	1,0	0,1	0,2
	X <sub>krit</sub> , ppm	49	491	49	98
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>)</b>	C <sub>krit</sub> , g L <sup>-1</sup>	-	0,01	-	0,01
	X <sub>krit</sub> , ppm	-	4	-	4

*C. carboxidivorans* zeigte bei Konzentrationen von bis zu  $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  eine Steigerung der maximalen Biomasse- und Alkoholkonzentrationen, während erst Konzentrationen ab  $10,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  zu einer Inhibierung von Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* führten. *C. autoethanogenum* zeigte im Gegensatz dazu nur bis zu Konzentrationen von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  annähernd identisch gutes Wachstum und Produktbildung. Bereits die Zugabe von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  reduzierte Wachstum und Produktbildung von *C. autoethanogenum* deutlich. Diese tolerierbaren Konzentrationen entsprechen in einem biogenen Synthesegas Anteilen von 3 168 ppm  $\text{NH}_3$  für *C. carboxidivorans* und 634 ppm  $\text{NH}_3$  für *C. autoethanogenum*.

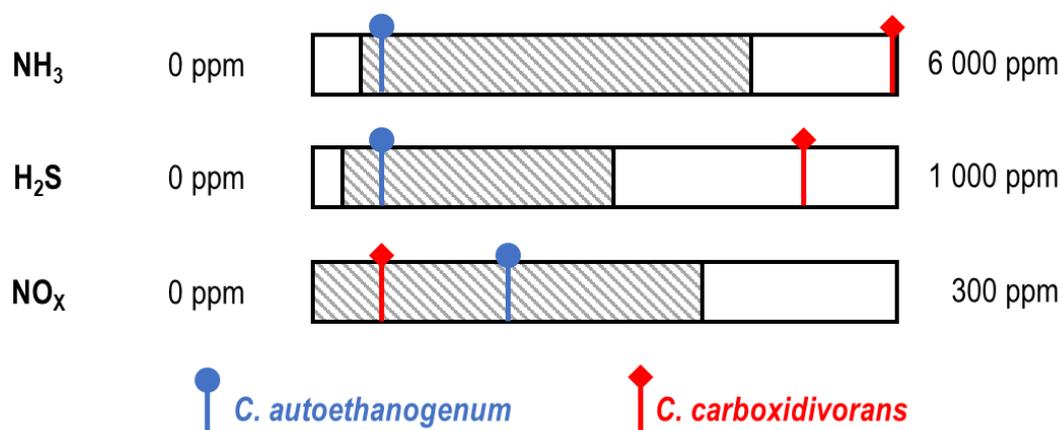
Für Zugaben definierter  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentrationen ergaben sich für *C. carboxidivorans* für bis zu  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  Steigerungen der maximal erreichten Biomasse- und Alkoholkonzentrationen und erst ab  $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  eine ausgeprägte Inhibierung von Wachstum und Alkoholproduktion über mehr als 120 h. Für *C. autoethanogenum* hingegen waren Konzentrationen bis  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  ohne deutliche Abnahmen von Wachstum und Produktbildung tolerierbar, während  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  Verringerungen von Wachstum und Produktbildung zur Folge hatten. Die tolerierbaren Konzentrationen entsprechen für die Gasanteile eines biogenen Synthesegases 451 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  für *C. carboxidivorans* und 45 ppm  $\text{H}_2\text{S}$  für *C. autoethanogenum*.

Für die Untersuchungen mit Nitrat zeigten sich für *C. carboxidivorans* bereits bei  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  eine starke initiale Verzögerungsphase, trotz der die maximale Biomassekonzentration auf Kosten gesunkener maximaler Alkoholkonzentrationen erhöht wurde. Zugaben von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  zeigten eine deutliche Inhibierung von Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans*. Für *C. autoethanogenum* wurde durch die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  das Wachstum und die Ethanolbildung leicht verringert, wobei die Acetatproduktion gesteigert wurde. Die Zugabe von  $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  hingegen führte zu einer deutlichen Inhibierung von Wachstum und Produktbildung. Die ermittelten tolerierbaren Konzentrationen entsprechen für *C. carboxidivorans* 49 ppm  $\text{NO}_x$  und für *C. autoethanogenum* 98 ppm unter der Annahme vollständiger Absorption und Umsetzung des Stickstoffs in Nitrat sowie weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen über die gesamte Prozesszeit von 144 h.

$\text{NaNO}_2$  zeigte für beide untersuchten Mikroorganismen bereits bei Zugabe von  $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_2$  einen sofortigen Abfall der  $\text{CO}$ -Aufnahme- und  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate sowie zunächst kein weiteres Wachstum oder Produktbildung. Während bei *C. carboxidivorans* infolge der Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  bis zum Prozessende keine Veränderung der Konzentrationen von Biomasse und Produkten sowie keine weitere Gasaufnahme

mehr beobachtet werden konnten, wurde bei *C. autoethanogenum* ein Einbruch der Biomassekonzentration beobachtet. Im weiteren Verlauf konnte *C. autoethanogenum* sich adaptieren, woraufhin die Biotrockenmassekonzentration von *C. autoethanogenum* sowie die CO-Aufnahme und die Acetatkonzentration wieder anstiegen. Trotz der möglichen Adaption und damit der etwas höheren Toleranz von *C. autoethanogenum* gegenüber Nitrit, stellt dieses eine kritische Komponente bereits bei niedrigen Konzentrationen dar. Die ermittelten tolerierbaren Konzentrationen entsprechen jeweils für die beiden Mikroorganismen 4 ppm  $\text{NO}_x$  unter der Annahme vollständiger Absorption und Umsetzung des Stickstoffs in Nitrit sowie weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen über die gesamte Prozesszeit von 144 h.

Die ermittelten inhibierenden Konzentrationen der Spurenverunreinigungen (Tabelle 6-10) sind in Abbildung 6-16 im Verhältnis zu typischen Größenordnungen der jeweiligen Spurenverunreinigungen in biogenen Synthesegasen dargestellt.

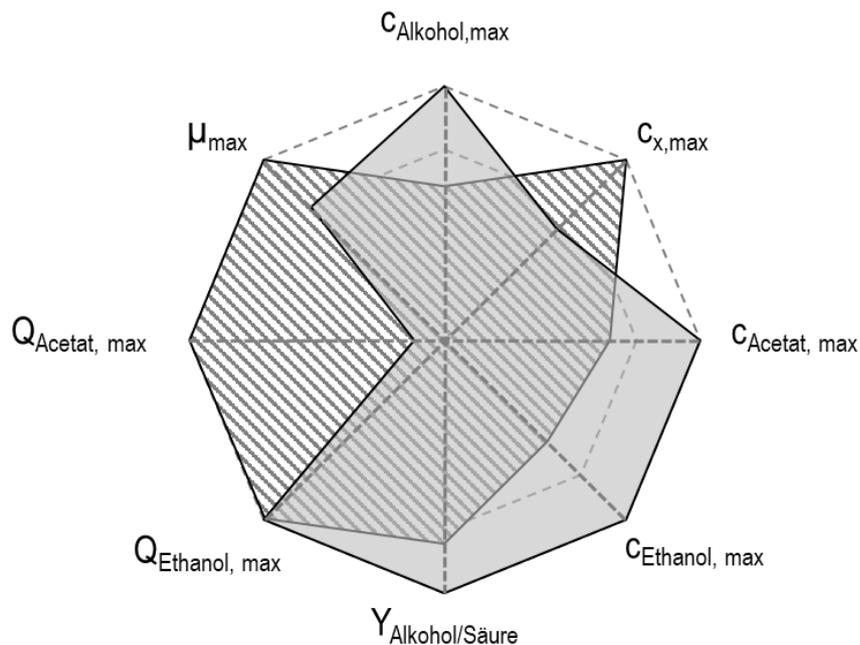


**Abbildung 6-16** Zusammenfassung der ermittelten kritischen Konzentrationen der Spurenverunreinigungen  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$  (unter der Annahme vollständiger Umsetzung des  $\text{NO}_x$  Stickstoffs in Nitrat) für *C. carboxidivorans* (blauer Kreis) und *C. autoethanogenum* (rote Raute) im Vergleich zu Bereichen typischer Konzentrationen der Spurenverunreinigungen in biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe (Kremling 2018) (grau schraffiert).

Der Vergleich der beiden Mikroorganismen zwischen den jeweils besten in dieser Arbeit erreichten autotrophen Satzprozessen im Hinblick auf Ethanolproduktion ist in Abbildung 6-17 dargestellt. Für *C. carboxidivorans* stellt der Satzprozess mit  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  den Prozess mit der besten Alkoholproduktivität dar, während für *C. autoethanogenum* der autotrophe Referenzsatzprozess den besten Prozess darstellt.

Der Vergleich der besten Satzprozesse relativiert den Unterschied zwischen *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* im jeweiligen Referenzsatzprozess (Abbildung 6-15). Durch die Zugabe des  $\text{H}_2\text{S}$  wurde die maximale Biotrockenmassekonzentration

so stark gesteigert, dass sie den höchsten Wert mit *C. autoethanogenum* übertraf. Zudem wurde die maximale volumetrische Ethanolbildungsrate auf das gleiche Niveau wie im Referenzsatzprozess mit *C. autoethanogenum* gesteigert. Trotzdem blieben die maximalen Konzentrationen der Alkohole sowie das Alkohol-zu-Säure-Verhältnis im Referenzsatzprozess mit *C. autoethanogenum* höher als im Satzprozess mit *C. carboxidivorans* mit Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ .



**Abbildung 6-17** Vergleich der autotrophen Satzprozesse mit der jeweils besten Prozessleistung im Hinblick auf hohes Wachstum und hohe Alkoholproduktion mit *C. carboxidivorans* mit Zugabe von  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (schraffierte Fläche) und mit *C. autoethanogenum* im Referenzsatzprozess ohne Zugabe von Spurenverunreinigungen (hellgraue Fläche). Gezeigt sind die maximalen Konzentrationen von Gesamtalkohol, Biomasse, Acetat und Ethanol, dem Alkohol-zu-Säure-Verhältnis und der maximalen spezifischen Wachstumsrate sowie der maximalen volumetrischen Bildungsrate von Acetat und Ethanol.

Aufgrund der höheren Alkoholkonzentrationen bleibt *C. autoethanogenum* ein wirtschaftlich interessanter Mikroorganismus für die Etablierung industrieller Synthesegasfermentationsprozesse. Trotzdem stellt *C. carboxidivorans* durch seine wesentlich höhere spezifische Wachstumsrate, die Fähigkeit gebildete Säuren wieder zu Alkoholen abzubauen und die wesentlich höhere Toleranz gegenüber den bedeutenden Spurenverunreinigungen ebenfalls einen industriell interessanten Mikroorganismus dar. Da auch die Synthesegasreinigung einen wichtigen Kostenfaktor für den Gesamtprozess darstellen kann, ist insbesondere die hohe Toleranz von *C. carboxidivorans* gegenüber  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}_2\text{S}$  von großer Bedeutung. Von den Hauptspurenverunreinigungs-komponenten in biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe müssten im besten Fall lediglich

HCN und NO<sub>x</sub> im Herstellungsprozess reduziert beziehungsweise im Anschluss an die Vergasung selektiv entfernt werden.

### 6.3. Satzprozess mit *Clostridium autoethanogenum* mit biogenem Synthesegas<sup>4</sup>

Für die Realgasfermentationen mit *C. autoethanogenum* kam das identische biogene Synthesegas zur Verwendung wie mit *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.2). Die detaillierte Auflistung der Synthesegaskomponenten im biogenen Synthesegas aus der Flugstromvergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) ist in Tabelle 5-9 (Kapitel 5.2) zusammengefasst. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Referenzsatzprozessen mit artifiziellem Synthesegas sind mit einem Satzprozess mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion durch den Rohrreaktor mit Palladiumkatalysator gegenübergestellt (Abbildung 6-18, Abbildung 6-19). Eine Reproduktion des Satzprozesses mit biogenem Synthesegas war mit dem verfügbaren Synthesegas aus der Vergasungskampagne nicht möglich.

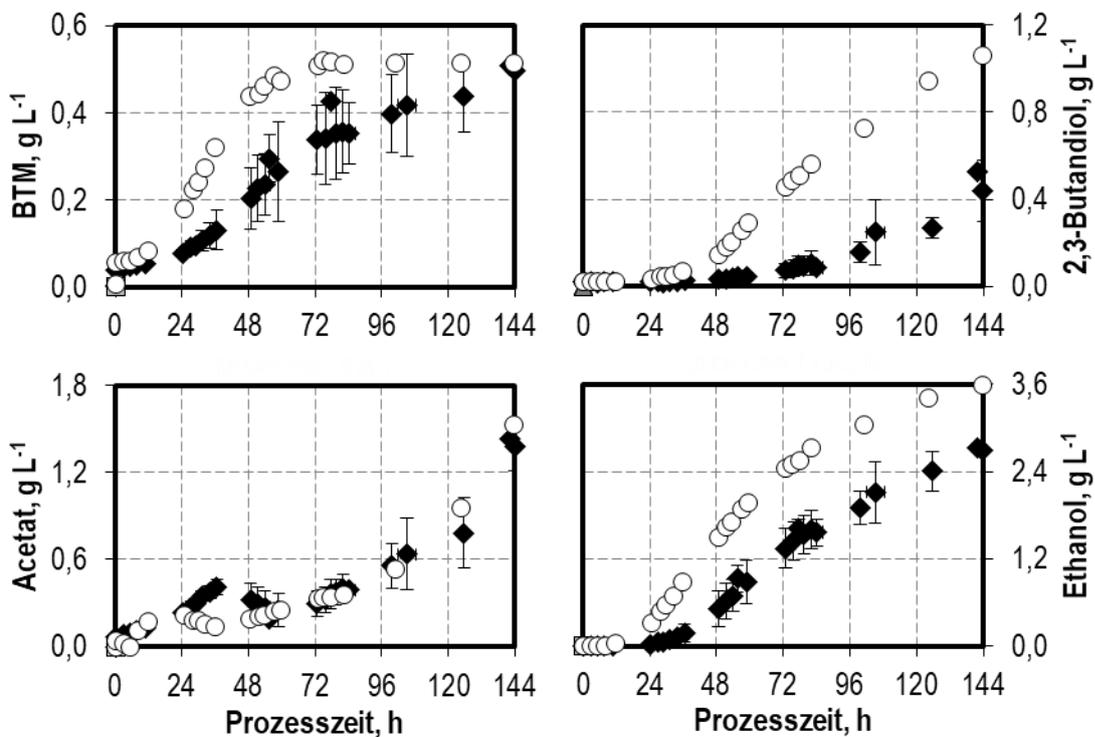
Trotz der vergleichbaren Zusammensetzung des biogenen Synthesegases zum artifiziellem Synthesegas (Tabelle 5-9) wurde im Satzprozess mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion eine höhere spezifische Wachstumsrate und höhere Endkonzentrationen von Ethanol und 2,3-Butandiol erreicht. Die Endkonzentration von Ethanol nach 144 h stieg um 31 % auf 3,60 g L<sup>-1</sup> im Vergleich zu den Referenzsatzprozessen, welche 2,74 g L<sup>-1</sup> Ethanol erreichten. Die 2,3-Butandiolkonzentration stieg gleichzeitig um 104 % von 0,52 g L<sup>-1</sup> auf 1,06 g L<sup>-1</sup> nach 144 h. Der Verlauf der Acetatkonzentration und auch die maximale Biotrockenmassekonzentration hingegen waren identisch zu den Referenzsatzprozessen. Obwohl der Prozess mit biogenem Synthesegas nicht reproduziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhten Alkoholkonzentrationen signifikant sein dürften, da die Ergebnisse weit außerhalb der Standardabweichung der drei Referenzsatzprozesse liegen. Auch bei den Prozessen mit *C. carboxidivorans* waren die Standardabweichungen sowohl mit artifiziellem als auch mit biogenem Synthesegas deutlich kleiner als diese Abweichung, weshalb auch bei den Prozessen mit *C. autoethanogenum* mit biogenem Synthesegas mit einer vergleichbaren Standardabweichung gerechnet werden kann. Trotzdem muss der Prozess mit biogenem Synthesegas mit *C. autoethanogenum* im Rahmen einer neuen Vergasungskampagne wiederholt werden.

---

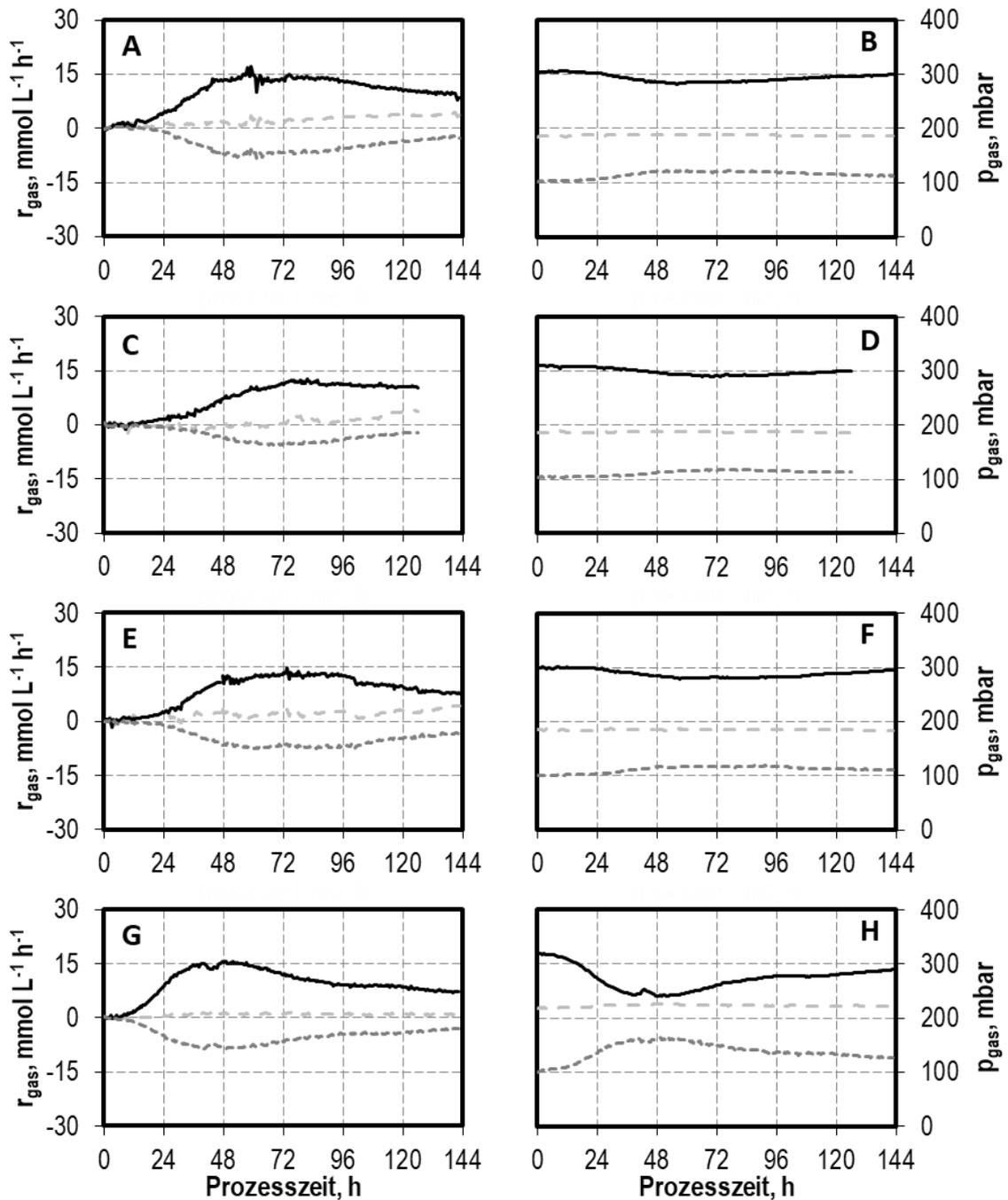
<sup>4</sup> Die Ergebnisse dieses Kapitels sind wissenschaftlich publiziert in:

Rückel, Anton; Oppelt, Anne; Leuter, Philipp; Johne, Philipp; Fendt, Sebastian; Weuster-Botz, Dirk (2022): Conversion of syngas from entrained flow gasification of biogenic residues with *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium autoethanogenum*. In *Fermentation* 8 (9), p. 465. doi:10.3390/fermentation8090465.

Die maximal erreichte CO-Aufnahmerate lag im Prozess mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion mit  $15,3 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  etwas höher als in den drei Referenzsatzprozessen mit artifiziellem Realgas mit im Durchschnitt  $14,0 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Dieser Unterschied spiegelt sich auch in der höheren gesamten Aufnahme von CO von  $814,05 \text{ mmol CO}$  mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion im Vergleich zu durchschnittlich  $621,21 \text{ mmol CO}$  im Referenzsatzprozess wider (Tabelle 6-11). Die Kohlenstoffbilanzwiederfindungen lagen bei  $89,4 \%$  und  $92,1 \%$ , wobei die geringere Wiederfindung und hohe Standardabweichung im Referenzsatzprozess auf einen Ausreißer der drei Referenzsatzprozesse zurückzuführen ist (Kohlenstoffbilanzwiederfindungen  $100,8 \%$ ,  $93,7 \%$  und  $73,9 \%$ ).



**Abbildung 6-18** Autotrophe Satzprozesse mit *C. autoethanogenum* mit artifiziellem Synthesegas mit  $p_{\text{CO}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 220 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{N}_2} = 380 \text{ mbar}$  (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) und biogenem Synthesegas aus der Flugstromvergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) mit Sauerstoffreduktion (weißer Kreis  $\circ$ ).  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Referenzsatzprozessen. Der Satzprozess mit biogenem Synthesegas wurde einmal durchgeführt.

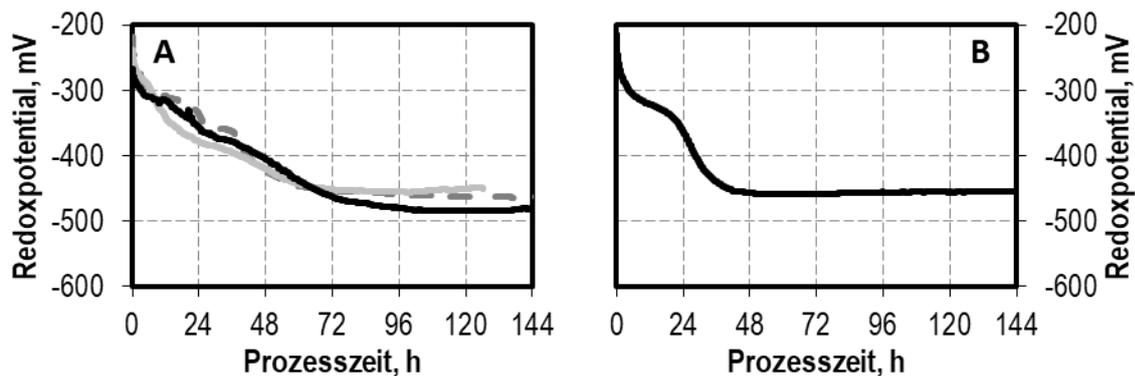


**Abbildung 6-19** Gasaufnahmeraten und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess mit artifiziellem Synthesegas ( $p_{\text{CO}} = 300 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 100 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 220 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{N}_2} = 380 \text{ mbar}$ ) (A bis F) und mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion (G und H) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ).

**Tabelle 6-11** Gesamtmengen von aufgenommenem CO, gebildetem CO<sub>2</sub>, Kohlenstoff in Medium, Produkten und Biomasse, sowie Kohlenstoffbilanzwiederfindung bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzprozess mit artifiziellem Synthesegas und mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion im Rohrreaktor mit Pd-Katalysator (Actisorb O3). Der Referenzsatzprozess mit artifiziellem Gas wurde dreimal durchgeführt. Die Werte zeigen Mittelwert und Standardabweichung der drei Prozesse. Der Prozess mit biogenem Synthesegas wurden einmal durchgeführt.

	Referenzsatzprozess	Biogenes Synthesegas mit O <sub>2</sub> -Reduktion
C im Medium, mmol C	9,94	9,94
CO-Aufnahme, mmol C	621,21 ± 66,74	814,05
CO <sub>2</sub> -Bildung, mmol C	390,35 ± 98,73	488,40
CO:CO <sub>2</sub> -Verhältnis, -	1,64 ± 0,32	1,67
C in Produkten, mmol C	164,2 ± 34,1	254,19
C in Biomasse, mmol C	14,6 ± 2,24	16,44
C-Bilanz (Wiederfindung), %	89,44 % ± 13,92 %	92,12 %

Die Redoxpotentialverläufe der Synthesegasfermentationsprozesse mit biogenem Synthesegas sind in Abbildung 6-20 dargestellt. Das Absinken des Redoxpotentials fand im Satzprozess mit biogenem Synthesegas schneller statt als in den Referenzsatzprozessen mit artifiziellem Synthesegas aus Reingasen. Aufgrund der Sauerstoffreduktion kam es nicht zu einem Anstieg des Redoxpotentials. Das zum Prozessende nach 144 h erreichte Redoxpotential lag für den Prozess mit biogenem Synthesegas ebenso wie in den Reingasprozessen bei -450 mV.



**Abbildung 6-20** Redoxpotentialverläufe bei autotrophen Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess mit artifiziellem Synthesegas (A) und in einem Prozess mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion (B). Referenzsatzprozesse wurden dreimal durchgeführt. Der Prozess mit biogenem Synthesegas mit *C. autoethanogenum* wurde einmal durchgeführt.

Wie bereits im hohen Anstieg der Biotrockenmassekonzentration und Produktkonzentrationen im Prozess mit biogenem Synthesegas und Sauerstoffreduktion zu erwarten

war, wurden die maximale spezifische Wachstumsrate (Verdopplung) sowie die maximalen volumetrischen Produktbildungsraten von Acetat (Erhöhung um 75 %), Ethanol (Erhöhung um 36 %) und 2,3-Butandiol (Erhöhung um 84 %) gesteigert (Tabelle 6-12).

**Tabelle 6-12** Spezifische Wachstumsraten, volumetrische und spezifische Produktbildungsraten der Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei Satzprozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzprozess mit artifiziellem Synthesegas und mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion im Rohrreaktor mit Pd-Katalysator (Actisorb O3). Der Referenzsatzprozess mit artifiziellem Gas wurde dreimal durchgeführt. Die Werte zeigen Mittelwert und Standardabweichung der drei Prozesse. Der Prozess mit biogenem Synthesegas wurde einmal durchgeführt.

	Referenzsatzprozess	Biogenes Synthesegas mit O <sub>2</sub> -Reduktion
$\mu_{\max}, \text{h}^{-1}$	0,042 ± 0,014	0,085
$Q_{\text{Acetat,max}}, \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,036 ± 0,023	0,075
$q_{\text{Acetat,max}}, \text{h}^{-1}$	0,082 ± 0,029	0,144
$Q_{\text{Ethanol,max}}, \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,036 ± 0,003	0,049
$q_{\text{Ethanol,max}}, \text{h}^{-1}$	0,160 ± 0,010	0,184
$Q_{\text{2,3-Butandiol,max}}, \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,006 ± 0,001	0,012
$q_{\text{2,3-Butandiol,max}}, \text{h}^{-1}$	0,013 ± 0,004	0,024

### Diskussion

Ebenso wie bereits für *C. carboxidivorans* ermöglichte die Reduktion des im biogenen Synthesegas enthaltenen Sauerstoffs mit einem Palladiumkatalysator auf 293 ppm O<sub>2</sub> einen erfolgreichen Gasfermentationsprozess mit *C. autoethanogenum*, welcher sogar zu besseren Ergebnissen bei Wachstum und Alkoholproduktion als die Prozesse mit Reingasen führte.

Im Vergleich zu Referenzsatzprozessen mit Reingasen mit der Gaszusammensetzung 60 % CO, 20 % CO<sub>2</sub>, 20 % H<sub>2</sub> (siehe Kapitel 6.1.1) wurde mit dem biogenen Synthesegas geringere maximale Biomasse- und Alkoholkonzentrationen aufgrund des geringeren CO-Anteils im biogenen Synthesegas erreicht. *C. autoethanogenum* besitzt genau wie *C. carboxidivorans* eine große Bevorzugung von höheren CO-Anteilen (Kapitel 6.1.1). Mit *C. autoethanogenum* wurden im Referenzsatzprozess mit 600 mbar CO höhere Biomasse- und Alkoholkonzentrationen von 0,67 g L<sup>-1</sup> BTM, 4,45 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 1,94 g L<sup>-1</sup> 2,3-Butandiol (Steigerung um 34 %, 178 % und 85 % im Vergleich zum gezeigten biogenen Synthesegas) erreicht (Kapitel 6.1.1).

Der eng verwandte acetogene Mikroorganismus *C. ljungdahlii* wurde bereits erfolgreich mit biogenen Synthesegasen in Satzprozessen kultiviert. Autotrophe Synthesegasfermentationsprozesse mit diesem Mikroorganismus lieferten jedoch höhere Essigsäure und niedrigere Ethanolkonzentrationen als die mit *C. autoethanogenum* erreichten Konzentrationen in dieser Arbeit. Mit einem Synthesegas aus der Vergasung von Buchenholz mit der Zusammensetzung von 28,5 % CO, 19,1 % CO<sub>2</sub>, 22,7 % H<sub>2</sub> und 9,9 % CH<sub>4</sub> lieferte 15,6 g L<sup>-1</sup> Acetat (Faktor 9,75 größer) und 1,6 g L<sup>-1</sup> Ethanol (Faktor 2,25 geringer) (Liakakou et al. 2021). Daher ist *C. autoethanogenum* ein vielversprechenderer Mikroorganismus, da hohe Alkoholkonzentrationen aufgrund der höheren Wertschöpfung im Vergleich zu organischen Säuren von großer Bedeutung für technische Prozesse sind (Daniell et al. 2012). Außerdem ist ein hohes Alkohol-zu-Säure-Verhältnis für einen erfolgreichen Produktreinigungsprozess beispielsweise über Rektifikation notwendig (Ezeji et al. 2004).

Für *C. autoethanogenum* gilt die gleiche Stöchiometrie der Produktbildungsreaktionen für die Ethanolproduktion aus CO oder CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> wie für *C. carboxidivorans* (Kapitel 5.2). Somit ergeben sich die gleichen Ansprüche an die Zusammensetzung eines ideal zusammengesetzten biogenen Synthesegases für einen hohen Gasumsatz in einer industriellen Blasensäulenreaktor für Synthesegasfermentationsprozesse (Kapitel 5.2). Da *C. autoethanogenum* im Gegensatz zu *C. carboxidivorans* für seine bessere Verwertung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als Substrat bekannt ist, stellt hierbei *C. autoethanogenum* einen besonders vielversprechenden Mikroorganismus für die Anwendung in diesen Prozessen zur Produktion hoher Mengen von Alkoholen mit hohem Gasumsatz dar (Mock et al. 2015; Veas et al. 2020).

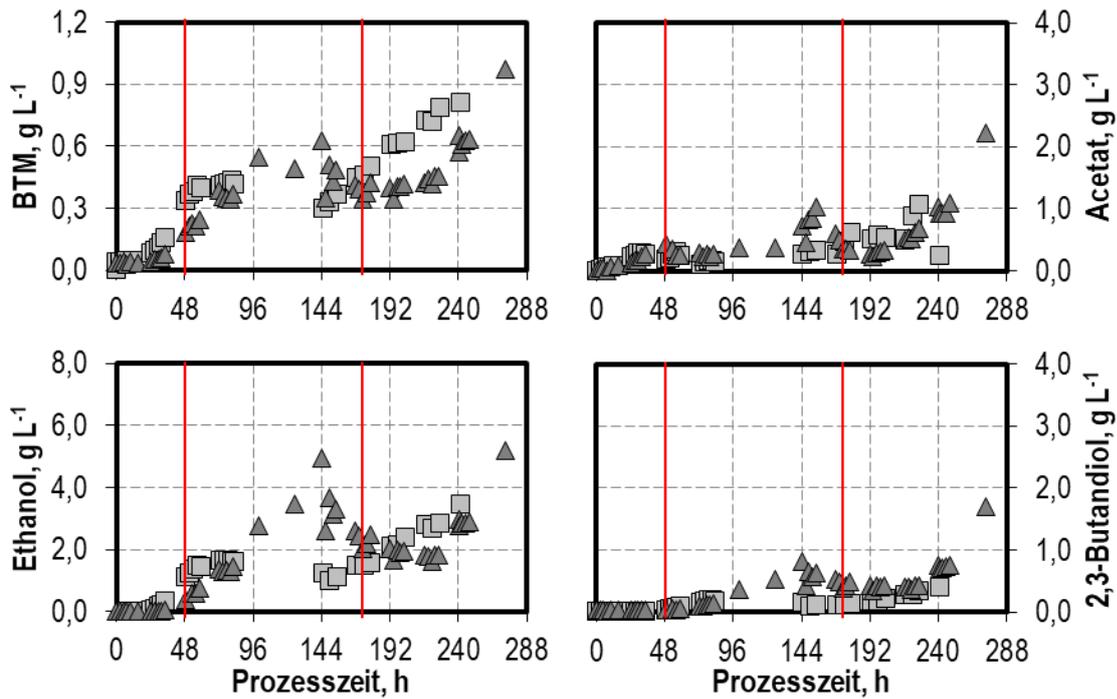
## 6.4. Kontinuierliche Prozesse mit *Clostridium autoethanogenum*

### 6.4.1. Kontinuierliche Prozesse ohne Zellrückhaltung (Chemostat)

Die Umsetzung kontinuierlicher Prozesse ist für Gasfermentationen im industriellen Maßstab aufgrund der geringen Wertschöpfung der Alkoholproduktion von großer Bedeutung. Für die Erarbeitung eines kontinuierlichen Prozesses mit *C. autoethanogenum* wurden zunächst Untersuchungen im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor ohne Zellrückhaltung, dem sogenannten Chemostat, durchgeführt. Hierzu musste zunächst eine geeignete Durchflussrate abgeschätzt werden. Da die formalkinetischen Parameter für *C. autoethanogenum* nicht bekannt sind, wurde anhand der maximalen Wachstumsrate aus dem Satzprozess von  $\mu_{\max} = 0,06 \text{ h}^{-1}$  (Kapitel 6.1.1) eine Durchflussrate von  $D = \frac{2}{3} \cdot \mu_{\max} = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ausgewählt. Der kontinuierliche Betrieb wurde jeweils nach einer initialen Satzphase von 48 h zum Biomasseaufbau gestartet. Dieser Prozess wurde zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse dieser kontinuierlichen Prozesse sind in Abbildung 6-21 und Abbildung 6-22 dargestellt.

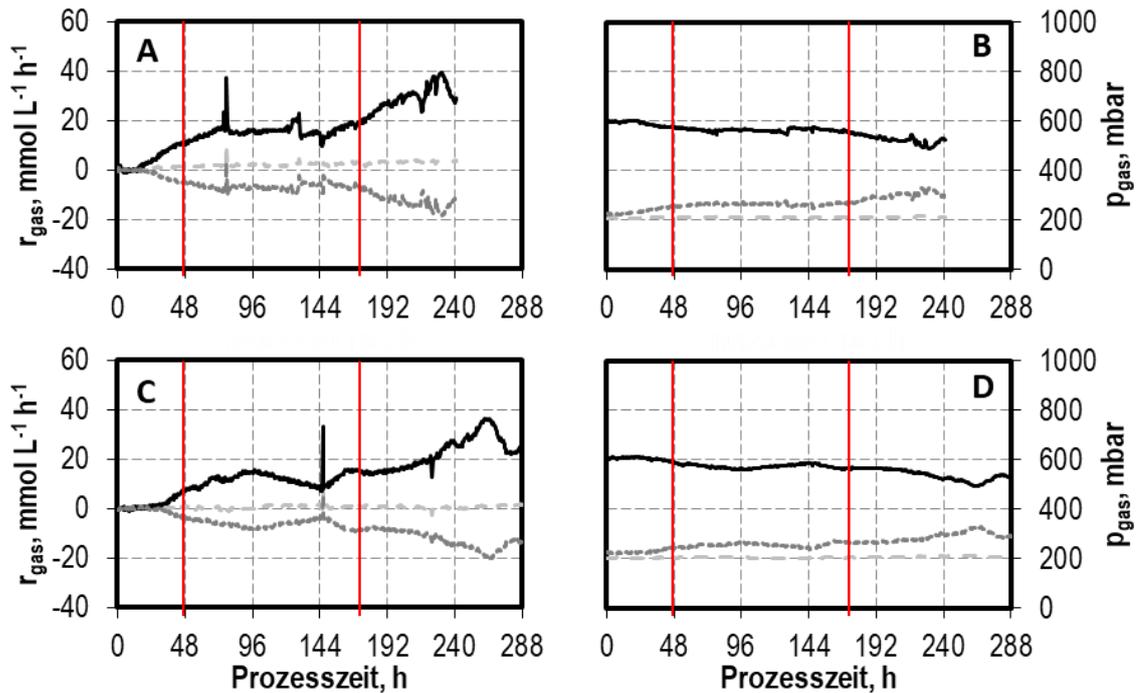
In den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  kam es zu mehreren kurzen Störungen der Frischmedienzufuhr aufgrund von Ausfällen der Zulaufpumpe. Da jedoch die Ablaufpumpe ungestört weiter lief, kam es über Nacht zu einer Abnahme des Reaktionsvolumens. Diese Differenz wurde jeweils am kommenden Morgen manuell wieder ausgeglichen. Die Ausfälle traten beim ersten Prozess (Abbildung 6-21 dunkelgraue Dreiecke, Abbildung 6-22 C und D) nach 78 h und 122 h und beim zweiten Prozess (Abbildung 6-21 hellgraue Quadrate, Abbildung 6-22 E und F) nach 146 h auf. Dadurch ergaben sich Anstiege der Biomassekonzentration und der CO-Aufnahmerate. Nachdem das Reaktionsvolumen wieder eingestellt wurde, liefen die beiden Prozesse weiter.

In keinem der beiden Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  wurde ein Fließgleichgewicht erreicht, obwohl die gesamte Prozesszeit mit 242 h bis 273 h deutlich länger als 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten ( $5 \tau = 125 \text{ h}$ ) waren. Zunächst blieben die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen annähernd konstant und erreichten insgesamt niedrigere Konzentrationen als im Referenzsatzprozess. Zum Prozessende hin stiegen die Konzentrationen jedoch weiter an und erreichten teilweise höhere maximale Konzentrationen insbesondere von BTM und Acetat.



**Abbildung 6-21** Kontinuierliche Prozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor in zwei Prozessen ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit einer Durchflussrate von  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , hellgraue Quadrate  $\square$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 125 \text{ h}$ ).

Die maximalen  $\text{CO}$ -Aufnahmeraten wurden in den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  gegenüber dem Referenzsatzprozess (Kapitel 6.1.1) um 47 % beziehungsweise 30 % erhöht und konnten für einen kurzen Zeitraum von ca. 48 h annähernd konstant gehalten werden. Nach 144 h kam es jedoch in beiden Prozessen zu einem erneuten Anstieg der  $\text{CO}$ -Aufnahmeraten bis zum Ende des Prozesses.



**Abbildung 6-22** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor in zwei kontinuierlichen Prozessen ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (A – B und C – D) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 125 \text{ h}$ ).

### Diskussion

Die kontinuierlichen Prozesse mit *C. autoethanogenum* ohne Zellrückhaltung zeigten im Vergleich zu Satzprozessen zunächst niedrigere Konzentrationen von Biomasse und Produkten. Dieses Verhalten ist typisch für kontinuierliche Bioprozesse, da konstant sowohl Biomasse als auch Produkte aus dem Bioreaktor entnommen werden (Weuster-Botz und Takors 2018). Die Raum-Zeit-Ausbeuten hingegen sind in kontinuierlichen Prozessen mit geeigneter Durchflussrate deutlich höher. Der acetogene Mikroorganismus *C. carboxidivorans* zeigte in kontinuierlichen Prozessen die Besonderheit höhere Konzentrationen im Fließgleichgewicht als in seinem jeweiligen Referenzsatzprozess zu erreichen (Doll et al. 2018). Dieser Effekt wurde auf mögliche Limitierungen durch Medienkomponenten wie Hefeextrakt oder Vitamine zurückgeführt, welche im kontinuierlichen Prozess kontinuierlich dem Reaktor zugeführt werden (Doll 2018). Außerdem

wurde auf mögliche Kommunikationsstoffe zwischen den Mikroorganismen (*Quorum sensing*) hingewiesen, welche im kontinuierlichen Prozess aus dem Reaktor ausge tragen werden (Doll 2018). Trotzdem wurde in kontinuierlichen Prozessen mit *C. carboxidivorans* mit halbiertes Durchflussrate kein Fließgleichgewicht erreicht, sondern ein oszillierendes Verhalten von Biotrockenmassekonzentration und Produktkonzentrationen beobachtet (Doll 2018).

In den beiden kontinuierlichen Prozessen mit *C. autoethanogenum* mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  konnte trotz einer Prozesszeit im kontinuierlichen Betrieb von mindestens 192 h ( $5 \tau = 125 \text{ h}$ ) keine konstante Konzentration von Biomasse und Produkten und CO-Aufnahmeraten über fünf hydraulische Verweilzeiten festgestellt werden. Stattdessen stiegen die Produktkonzentrationen bis zum Prozessende weiter an. Eine Abschätzung der Raum-Zeit-Ausbeuten war daher im kontinuierlichen Prozess im Chemostat mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  nicht möglich. Die nicht erreichten Fließgleichgewichte könnten auf Störungen der Zulaufpumpe zurückzuführen sein, welche in den Prozessen aufgetreten sind.

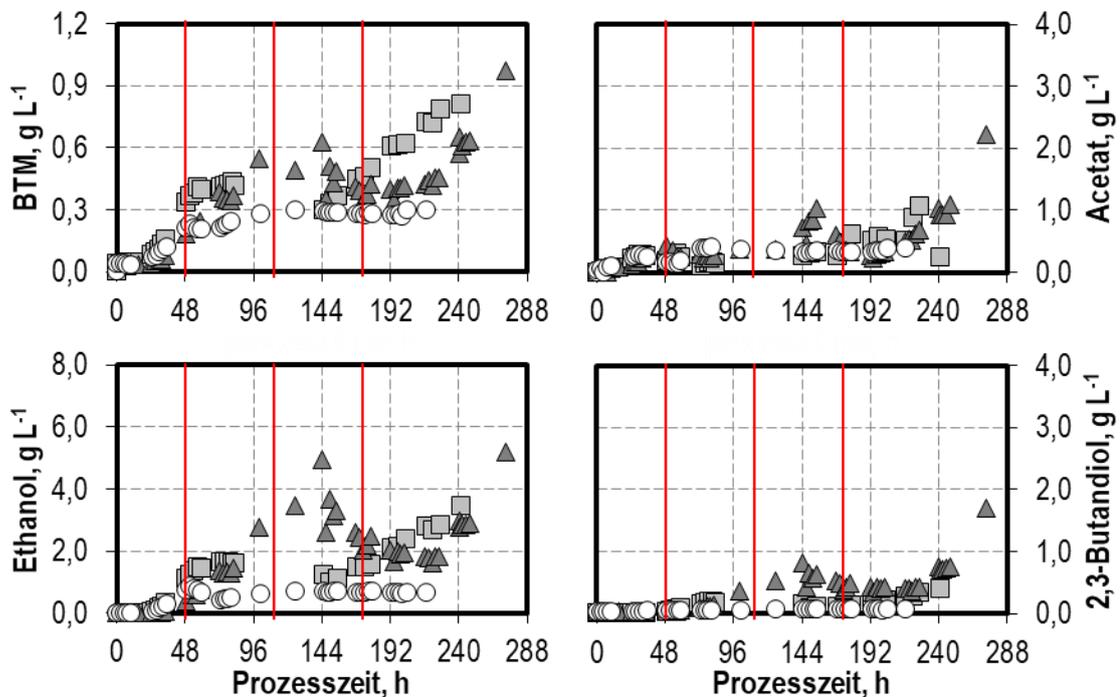
Auffällig sind in den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  die starken Anstiege der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen. Dieser Anstieg zu Konzentrationen, die höher liegen als die maximalen Werte des Referenzsatzprozesses, können in einem Chemostaten normalerweise nicht erreicht werden (Weuster-Botz und Takors 2018). Mögliche Erklärungen können eine limitierende Komponente im Frischmedium oder *Quorum sensing* sein (Doll 2018). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Doll (2018) wurde in den gezeigten kontinuierlichen Prozessen jedoch der Anstieg der Konzentrationen erst zu sehr späten Prozesszeiten beobachtet. Eine genetische Veränderung der Mikroorganismen zu höherem Wachstum und höherer Produktion ist aufgrund der geringen Generationszahl eher unwahrscheinlich. Eine mögliche Hypothese zur Erklärung des Anstiegs der Biomasse- und Produktkonzentrationen könnte Wandwachstum sein. Das Wachstum der Mikroorganismen an den Reaktorwänden könnte über die Prozesszeit hinweg auftreten und somit zusätzlich zur Biomasse in Suspension für Wachstum und Produktbildung zur Verfügung stehen (Hempel 2005). Diese Hypothese wurde im Folgenden dadurch überprüft, indem eine Erhöhung der Durchflussrate über die maximale Wachstumsrate des Satzprozesses angewendet wurde.

#### **6.4.2. Erhöhung der Durchflussrate**

Da in den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  nach langen Prozesszeiten kein Fließgleichgewicht erreicht wurde und es zu starken Anstiegen von Biomassewachstum

und Produktbildung kam, wurde ein kontinuierlicher Prozess mit verdoppelter Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Prozesses sind in Abbildung 6-23 und Abbildung 6-24 mit den beiden kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  gegenübergestellt.

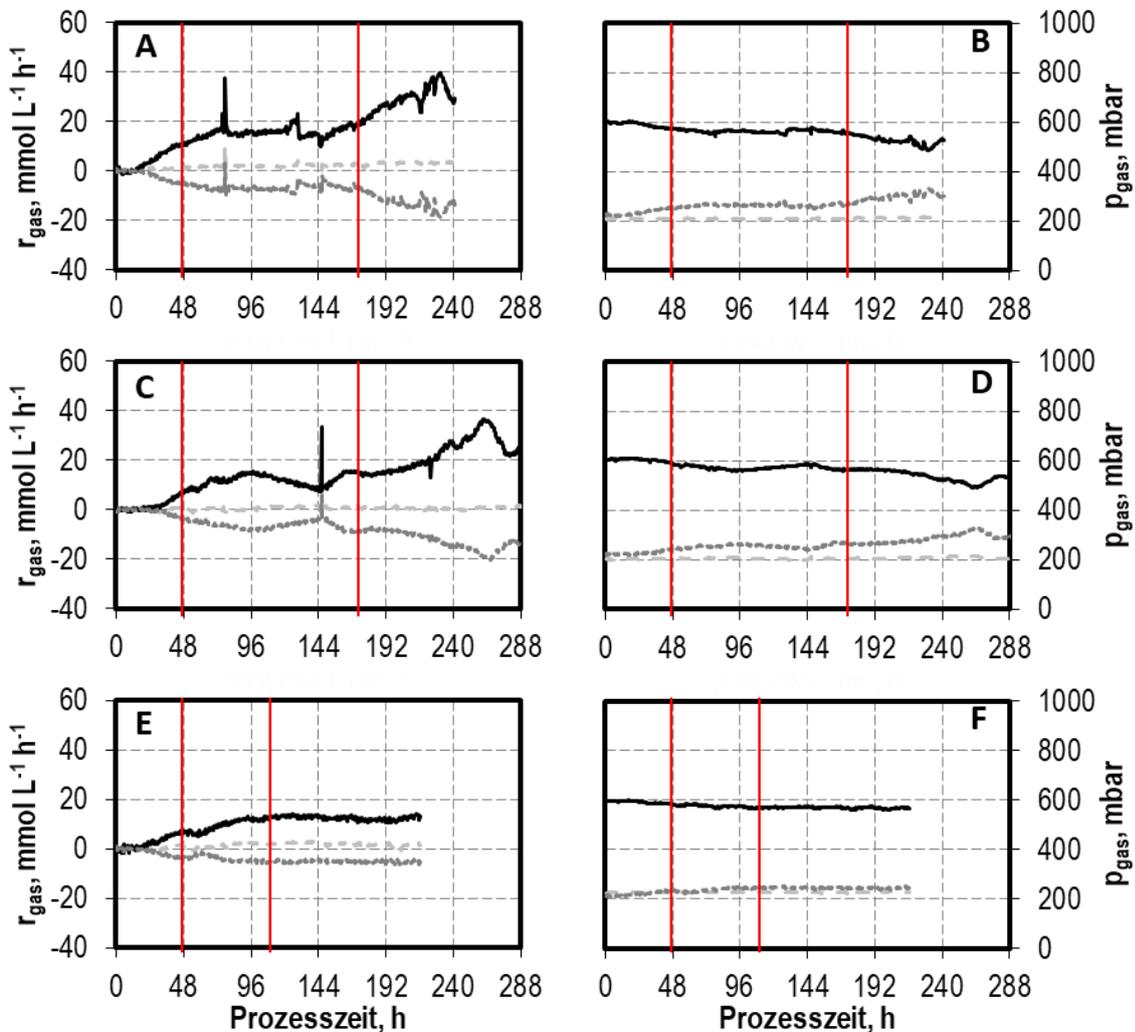
Im kontinuierlichen Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  wurde insgesamt eine niedrigere maximale Konzentration der Biomasse und aller Produkte erreicht. Allerdings stellte sich hier ein Fließgleichgewicht ein, welches für insgesamt 92 h (entspricht  $7,3 \tau$  bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ ) mehr als fünf hydraulische Verweilzeiten stabil gehalten werden konnte. Dabei wurden Fließgleichgewichtskonzentrationen von  $0,30 \text{ g L}^{-1}$  BTM,  $0,41 \text{ g L}^{-1}$  Acetat,  $0,73 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  2,3-Butandiol beobachtet.



**Abbildung 6-23** Kontinuierliche Prozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor in zwei Prozessen ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit einer Durchflussrate von  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ , hellgraue Quadrate  $\square$ ) und in einem Prozess mit einer Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (weiße Kreise  $\circ$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 62,5 \text{ h}$ ). Die dritte vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 125 \text{ h}$ ).

Der Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  erreichte eine niedrigere maximale  $\text{CO}$ -Aufnahmerate als die beiden Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ , welche jedoch um 19 % höher lag als im Referenz-

satzprozess. Außerdem wurde ebenso wie die Konzentrationen von Biomasse und Produkten auch die CO-Aufnahme- und CO<sub>2</sub>-Bildungsrate bis zum Prozessende konstant gehalten.



**Abbildung 6-24** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor in zwei kontinuierlichen Prozessen ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (A - D) und in einem kontinuierlichen Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (E und F) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 125 \text{ h}$ ) beziehungsweise mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 62,5 \text{ h}$ ).

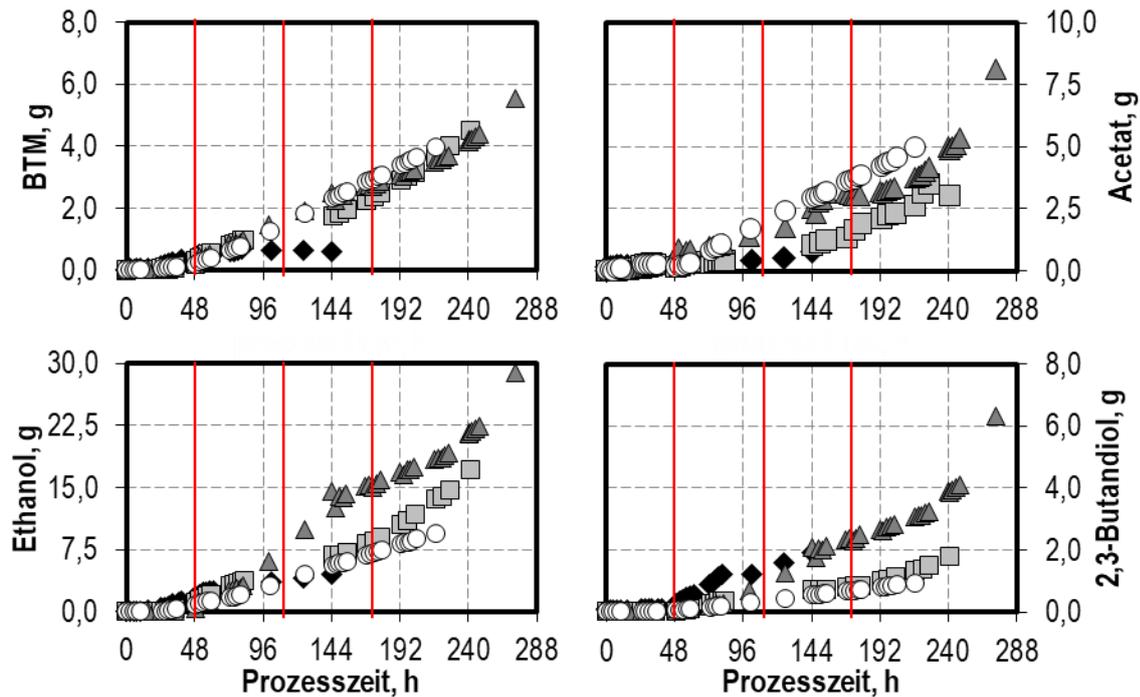
Da in den beiden Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  im Chemostat keine Fließgleichgewichte erreicht werden konnten, ist keine Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeuten möglich. Die

Erhöhung der Durchflussrate auf  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  führte im Vergleich zum Referenzsatzprozess zu einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten von Biotrockenmasse, Acetat und Ethanol um Faktor 3,3, Faktor 6,6 und Faktor 1,9 (Tabelle 6-13). Die Raum-Zeit-Ausbeute von 2,3-Butandiol wurde hingegen im Vergleich zum Referenzsatzprozess etwa halbiert.

**Tabelle 6-13** Raum-Zeit-Ausbeuten der kontinuierlichen Prozesse ohne Zellrückhaltung mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor für die Biomassekonzentration sowie die Produkte Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol für den Referenzsatzprozess und den kontinuierlichen Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ . Für die beiden kontinuierlichen Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ist eine Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeuten nicht möglich, da kein Fließgleichgewicht erreicht wurde.

	Referenzsatzprozess	Chemostat mit $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$	Chemostat mit $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$
$RZA_X, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,008	-	0,024
$RZA_{\text{Acetat}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,005	-	0,033
$RZA_{\text{Ethanol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,031	-	0,058
$RZA_{2,3\text{-Butandiol}}, \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,013	-	0,006

Aufgrund der nicht erreichten Fließgleichgewichte in den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ist kein Vergleich von Raum-Zeit-Ausbeuten mit dem kontinuierlichen Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  möglich. Um trotzdem einen Vergleich der Prozesse zu ermöglichen, können die kumulierten gebildeten Mengen von Biomasse und Produkten genutzt werden. Diese sind in Abbildung 6-25 dargestellt. Die integrale Menge der gebildeten Biomasse zeigt keinen deutlichen Unterschied zwischen den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  und  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ . Die gebildeten Mengen von Acetat waren am höchsten mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ , während die Mengen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  niedriger lagen. Die gebildeten Mengen von Ethanol war am höchsten für einen der kontinuierlichen Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ . Der andere Prozess mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  erreichte jedoch eine geringere kumuliert gebildete Menge von Ethanol und lag nach bis etwa 180 h in der gleichen Größenordnung wie der kontinuierliche Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ . Die kumulierten gebildeten Mengen von 2,3-Butandiol lagen in den kontinuierlichen Prozessen niedriger als im Satzprozess. Erst nach 144 h überstieg die kumulierte 2,3-Butandiolmenge eines der Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  die gebildete Menge des Satzprozesses.



**Abbildung 6-25** Kumulierte Gesamtmengen von Biotrockenmasse, Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei kontinuierlichen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor in zwei Prozessen ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit einer Durchflussrate von  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke ▲, hellgraue Quadrate ◻), in einem Prozess mit einer Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (weiße Kreise ○) im Vergleich zum Referenzsatzprozess (schwarze Raute ◆) bei  $T = 37 \text{ °C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 62,5 \text{ h}$ ). Die dritte vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $\tau = 125 \text{ h}$ ).

### Diskussion

Um die Hypothese von Wandwachstum als Ursache für den Anstieg der Biomasse- und Produktkonzentrationen in den kontinuierlichen Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  zu überprüfen (Kapitel 6.4.1), wurde ein kontinuierlicher Prozess mit der verdoppelten Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt. Kontinuierliche Prozesse bieten im Vergleich zu Satzprozessen den Vorteil höherer Raum-Zeit-Ausbeuten, führen allerdings zu niedrigeren Produktkonzentrationen (Weuster-Botz und Takors 2018). In diesem kontinuierlichen Prozess mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  wurden deutlich niedrigere Fließgleichgewichtskonzentrationen erreicht als die maximalen Konzentrationen im Referenzsatzprozess. Diese Konzentrationen lagen ebenfalls niedriger als in beiden Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ , in welchen jedoch kein Fließgleichgewicht erreicht wurde. Trotzdem wurde kein Auswaschen der Mikroorganismen aus dem Bioreaktor beobachtet.

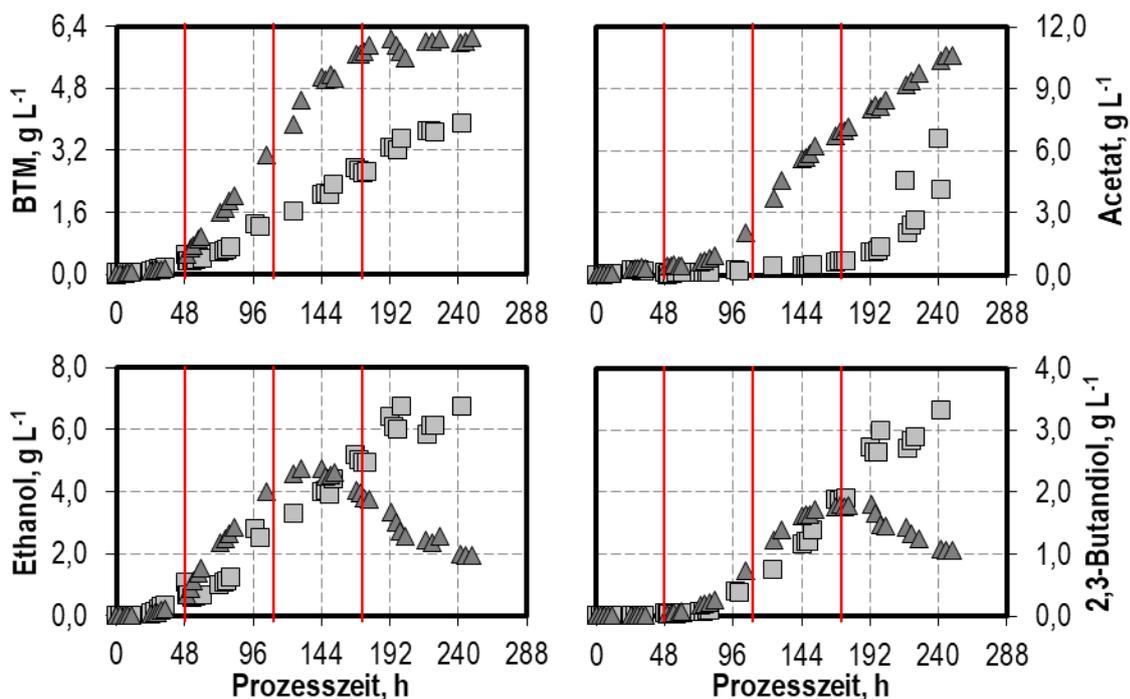
Kontinuierliche Prozesse können normalerweise nicht mit einer Durchflussrate größer als der maximalen Wachstumsrate durchgeführt werden, da die Mikroorganismen bei hohen Durchflussraten ( $D > \mu_{\max}$ ) aus dem Bioreaktor ausgewaschen werden (Weuster-Botz und Takors 2018). In in dieser Arbeit durchgeführten kontinuierlichen Prozess mit  $D = 4/3 \mu_{\max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$  wurden die Mikroorganismen nicht ausgewaschen. Es wurde stattdessen ein stabiles Fließgleichgewicht erreicht, welches für  $7,3 \tau$  stabil gehalten werden konnte. Ein kontinuierlicher Prozess mit  $D > \mu_{\max}$  ohne Auswaschen der Mikroorganismen ist nur möglich, wenn Mikroorganismen im Bioreaktor zurückgehalten werden. In einem als Chemostat betriebenen Reaktor kann dies beispielsweise durch Wandwachstum erfolgen (Hempel 2005; Weuster-Botz und Takors 2018). Im Prozess mit verdoppelter Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  wird zudem ein erhöhter Selektionsdruck auf die Mikroorganismen zum Wandwachstum ausgeübt, was das Wandwachstum fördern könnte. Somit stellt mögliches Wandwachstum eine Hypothese zur Erklärung der Konzentrationsanstiege im Chemostat mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  dar.

Um eine weitere Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten zu ermöglichen und trotzdem höhere Produktkonzentrationen zu erreichen, kann ein kontinuierlicher Prozess durchgeführt werden, in dem die Biomasse gezielt im Bioreaktor zurückgehalten wird. Dies kann beispielsweise über getauchte Membranen oder gezielte Biofilmbildung auf Trägermaterialien erfolgen (Mayer et al. 2018; Kantzow et al. 2015; Riegler et al. 2019a).

### 6.4.3. Kontinuierliche Prozesse im Membranbioreaktor

#### 6.4.3.1. Vollständige Zellrückhaltung

Im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung wurde zunächst ein Prozess mit der gleichen Durchflussrate wie im kontinuierlichen Prozess ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit  $D = 2/3 \mu_{\max} = 0,04 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt. Da im Membranbioreaktor im Gegensatz zum Chemostaten auch Durchflussraten höher als die maximale spezifische Wachstumsrate problemlos möglich sind, wurde daraufhin ein Prozess mit der doppelten Durchflussrate von  $D = 4/3 \mu_{\max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt. Die Daten der Ergebnisse dieser Prozesse sind in Abbildung 6-26 und Abbildung 6-27 gegenübergestellt.

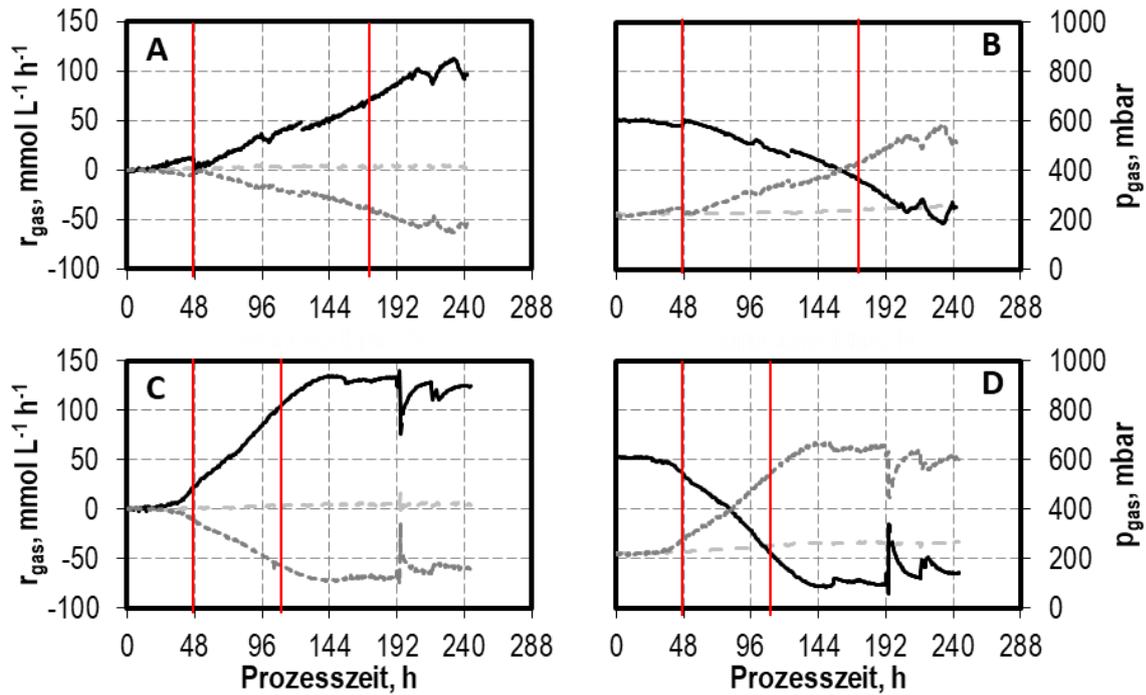


**Abbildung 6-26** Kontinuierliche Prozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) mit einer Durchflussrate von  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (hellgraue Quadrate  $\square$ ) und mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ). Die dritte vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 125 \text{ h}$ ).

Im Membranbioreaktor mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  wurden mit bis zu  $6,77 \text{ g L}^{-1}$  Ethanol und  $3,32 \text{ g L}^{-1}$  2,3-Butandiol im Vergleich zum Referenzsatzprozess sowie zu den Prozessen im Chemostat deutlich höhere Alkoholkonzentrationen erreicht. Allerdings war die notwendige Zeit zum Erreichen der maximalen Alkoholkonzentrationen mit 200 h beziehungsweise 240 h Prozesszeit sehr lang. Um eine schnellere Produktion der Biomasse und in der Folge eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute der Alkoholproduktion zu erreichen, wurden die folgenden Prozesse mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  im Membranbioreaktor durchgeführt.

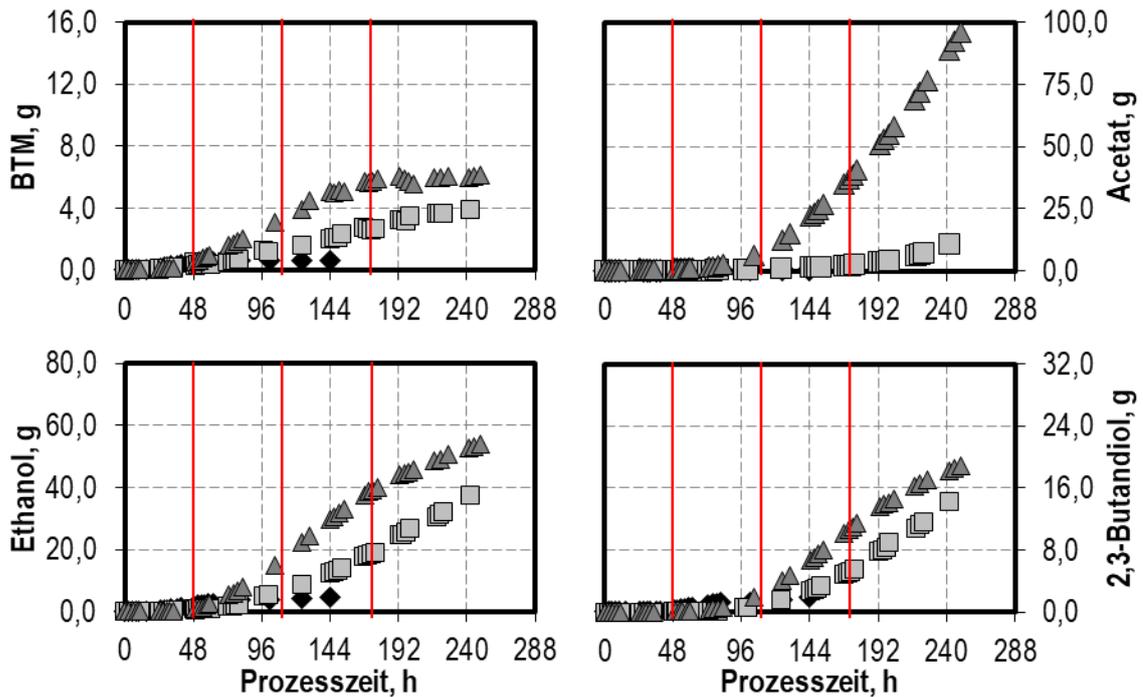
Die Zellrückhaltung bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ermöglichte eine deutlich höhere Biotrockenmassekonzentration von  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  BTM (Faktor 9,6) im Vergleich zum Chemostatprozess. Die 2,3-Butandiolkonzentrationen am Maximum wurden dabei von  $0,42 \text{ g L}^{-1}$  auf  $1,81 \text{ g L}^{-1}$  (Faktor 4,2) gesteigert. Im Vergleich zum Membranprozess mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  wurde wegen der halbierten hydraulischen Verweilzeit jedoch etwas geringere maximale Konzentrationen von Ethanol (19 % geringer) und 2,3-Butandiol (46 % geringer) erreicht.

Die maximale CO-Aufnahmerate wurde mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  auf maximal  $111,4 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  auf  $133,4 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  deutlich um Faktor 10,4 und Faktor 12,8 gegenüber dem Referenzsatzprozess (Kapitel 6.1.1) gesteigert. Der maximale CO-Umsatz wurde somit im kontinuierlichen Membranbioreaktor mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  auf über 91 % gesteigert im Vergleich zu Prozessen mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  im Chemostaten (maximaler CO-Umsatz 27 %) und im Membranbioreaktor (maximaler CO-Umsatz 74 %).



**Abbildung 6-27** Gasaufnahme- und Gaspartialdruckverläufe der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im kontinuierlichen Prozess mit vollständiger Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) bei  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (A und B) und bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (C und D) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ) beziehungsweise mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 125 \text{ h}$ ).

In einem kontinuierlichen Prozess mit totaler Zellrückhaltung steigt die Biomassekonzentration immer weiter bis es zu einer Limitierung durch Nährstoffe im Medium oder im Substratgas kommt. Mit der zunehmenden Biomassekonzentration steigen auch die Produktkonzentrationen. Somit kann kein Fließgleichgewicht wie im Chemostaten erreicht werden. Ein Vergleich von Raum-Zeit-Ausbeuten ist daher nicht möglich und es können stattdessen die gebildeten integralen Mengen der Produkte verglichen werden. Diese sind für die kontinuierlichen Prozesse im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  und  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  in Abbildung 6-28 dargestellt und mit dem Referenzsatzprozess verglichen. Die integralen gebildeten Mengen der Produkte zeigen, dass mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  insgesamt alle Produkte mehr gebildet wurden als im Prozess mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ . Bis zum Prozessende nach 240 h wurden mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  52 % mehr Biomasse, 40 % mehr Ethanol, 28 % mehr 2,3-Butandiol und um Faktor 8,1 mehr Acetat gebildet als mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 6-28** Kumulierte Gesamtmenen von Biotrockenmasse, Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei kontinuierlichen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor mit Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) mit einer Durchflussrate von  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  (hellgraue Quadrate  $\square$ ),  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) und im Vergleich zum Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ). Die dritte vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 125 \text{ h}$ ).

### Diskussion

Kontinuierliche Prozesse im Membranbioreaktor zur totalen Zellrückhaltung sind ein etabliertes Mittel die Raum-Zeit-Ausbeuten acetogener Clostridien zu steigern und sind für *C. acetivum* (Mayer et al. 2018; Mayer 2018) und *A. woodii* (Kantzow et al. 2015; Kantzow 2015) bereits erfolgreich umgesetzt worden.

Die Prozesse im Membranbioreaktor in dieser Arbeit lieferten im Vergleich zu kontinuierlichen Prozessen ohne Zellrückhaltung deutliche Steigerungen der erreichten Biomassekonzentrationen sowie der Produktkonzentrationen und  $\text{CO}$ -Aufnahmeraten. Allerdings wurden mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  sehr lange Prozesszeiten benötigt, um diese zu erreichen. Die Verdoppelung der Durchflussrate auf  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  bewirkte einen deutlich schnelleren Anstieg der Biotrockenmassekonzentration und des  $\text{CO}$ -Umsatzes auf bis zu 91 %. Während im Membranbioreaktor mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  die  $\text{CO}$ -Aufnahmerate ab

144 h und die Biotrockenmassekonzentration ab 169 h konstant blieben, waren die Konzentrationen der Produkte nicht konstant.

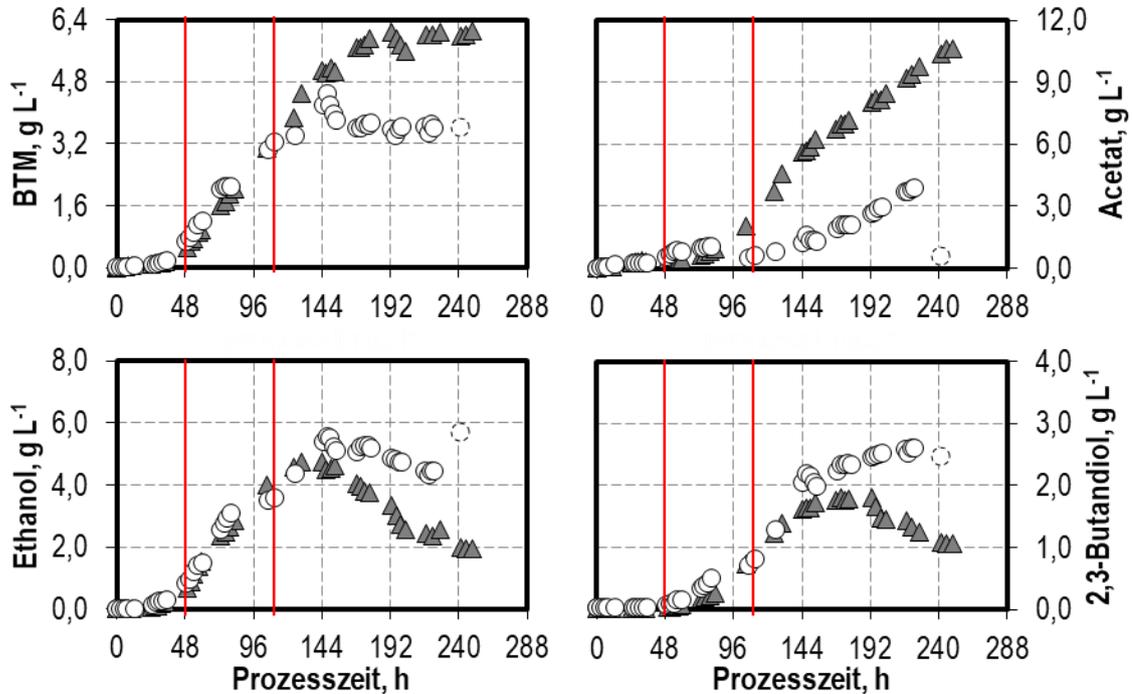
Im Prozess mit totaler Zellrückhaltung mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  trat nach einer Prozesszeit von 160 h eine starke Abnahme der Alkoholkonzentrationen bei gleichzeitiger Zunahme der Acetatkonzentration auf. Dieser Effekt ist für eine technische Nutzung kritisch, da die Alkohole wegen ihrer Eignung für Kraftstoffe und Kraftstoffzusätze wirtschaftlich relevantere Produkte als die Säuren darstellen (Dürre 2007; Bengelsdorf et al. 2018; Daniell et al. 2012). Diese Verschiebung des Produktspektrums hin zur Säureproduktion kann möglicherweise auf den hohen CO-Umsatz zurückgeführt werden. Im Prozessverlauf nimmt aufgrund des hohen CO-Umsatzes der CO-Anteil ab und stattdessen der  $\text{CO}_2$ -Anteil zu. Viele acetogene Mikroorganismen bevorzugen CO gegenüber  $\text{H}_2$  als Elektronenquelle (Hu et al. 2011). Die entsprechende Abnahme der CO-Gelöstkonzentration könnte zu einer CO-Limitierung und entsprechend einer Verschiebung des Metabolismus zur Säureproduktion führen. Eine Aufnahme von  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  konnte in diesem Prozess jedoch trotzdem nicht beobachtet werden.

Um dieses zu starke Ansteigen der Biomassekonzentration und anschließende Absinken der Alkoholkonzentrationen zu vermeiden, kann die Biomasseakkumulation durch die Einführung eines so genannten Verluststroms begrenzt werden (Ezeji et al. 2013). Dieser zusätzliche Verluststrom lässt einen Teil des Reaktorablaufs unfiltriert aus dem Reaktor, sodass kein unbegrenzter Anstieg wie im Membranbioreaktor mit totaler Zellrückhaltung mehr möglich ist und das Erreichen eines stationären Betriebspunktes ermöglicht werden könnte.

### 6.4.3.2. Teilweise Zellrückhaltung

Um aufbauend auf dem kontinuierlichen Membranbioreaktorprozess mit totaler Zellrückhaltung und einer Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  eine stabile, hohe Alkoholproduktion zu ermöglichen, wurde in der Folge ein kontinuierlicher Prozess im Membranbioreaktor mit teilweiser Zellrückhaltung durchgeführt. Bei diesem Prozess wurde zunächst bis 80 h Prozesszeit eine totale Zellrückhaltung durchgeführt, um eine schnelle Biomasseproduktion zu ermöglichen. Im Anschluss wurden 25 % des Ablaufvolumenstroms unfiltriert aus dem Reaktor entnommen, sodass sich ein Verluststrom (engl. *Bleed*) von  $D_{\text{Bleed}} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  bei einem Gesamtfluss von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ergab. Die Ergebnisse dieses Prozesses sind in Abbildung 6-29 und Abbildung 6-30 mit dem kontinuierlichen Membranbioreaktorprozess mit totaler Zellrückhaltung bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  gegenübergestellt. Der

letzte Messpunkt stellt einen Ausreißer dar, da es nach ca. 235 h zu einem Ausfall der Zu- und Ablaufpumpen kam und sich somit ein Satzprozess vorlag.

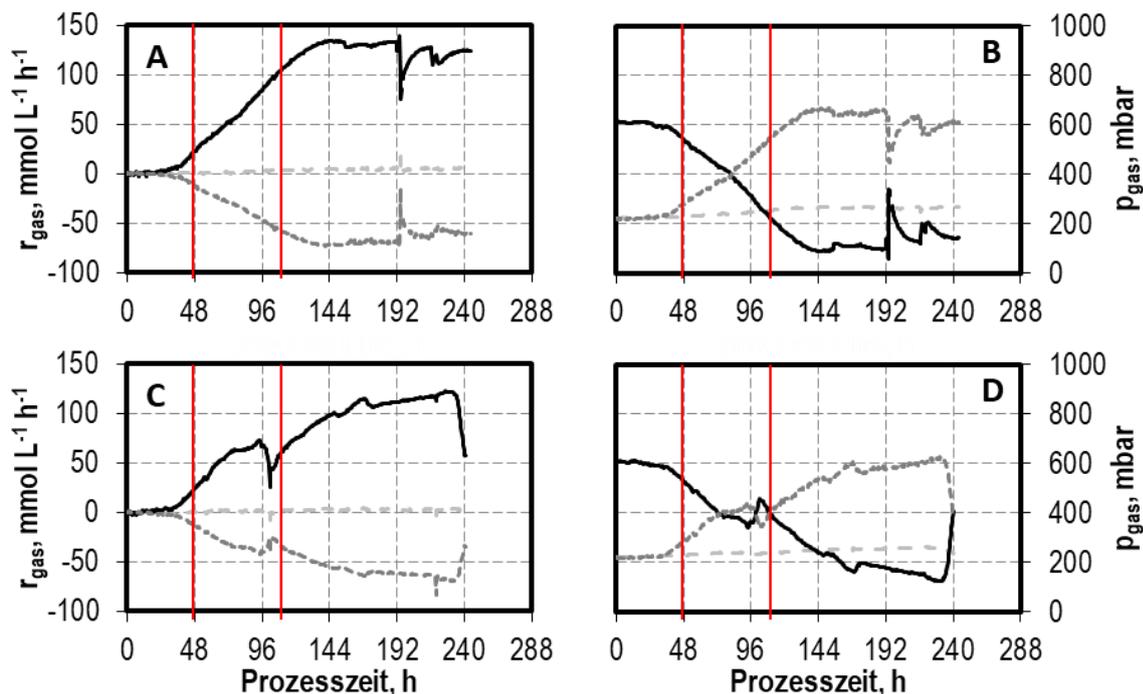


**Abbildung 6-29** Kontinuierliche Prozesse mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor mit teilweiser Zellrückhaltung (Membranbioreaktor mit Verluststrom) mit einer Gesamtdurchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  und Verluststrom  $D_{\text{Bleed}} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  (weiße Kreise O) im Vergleich zu vollständiger Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke Δ) bei  $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Der Beginn der teilweisen Zellrückhaltung erfolgte nach 80 h. Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ). Der letzte Messpunkt im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung stellt einen Ausreißer aufgrund eines Pumpenausfalls dar.

Die teilweise Zellrückhaltung ermöglichte nach 144 h Prozesszeit, dass die Biotrockenmassekonzentration nicht mehr weiter anstieg und bei rund 66 % der maximalen Biotrockenmassekonzentration des Prozesses mit totaler Zellrückhaltung bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  stabil blieb. Die Ethanolkonzentration blieb ab diesem Zeitpunkt annähernd konstant im Gegensatz zum Prozess mit totaler Zellrückhaltung. Auch die Acetatkonzentration stieg weniger stark an. Die 2,3-Butandiolkonzentration konnte durch die teilweise Zellrückhaltung ebenfalls bei hohen Konzentrationen konstant gehalten werden. Nach einer Prozesszeit von 235 h kam es im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung zu einem Ausfall der Pumpen, sodass der Prozess bis zum Prozessende nach 240 h als Satzprozess zu

Ende ging. Folglich ergaben sich für den letzten Messpunkt Abweichungen zum sonstigen Verlauf der Produktkonzentrationen Abbildung 6-29.

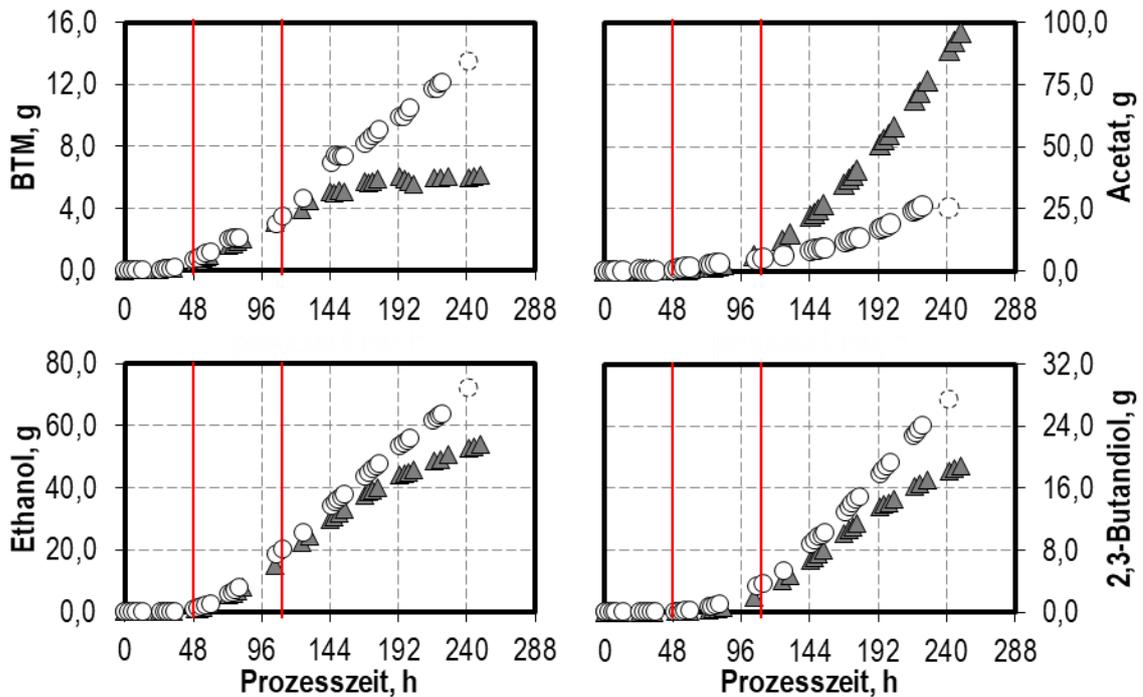
Die maximale CO-Aufnahmerate wurde im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung gegenüber der vollständigen Zellrückhaltung auf  $120,8 \text{ mmol CO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um 9 % gesenkt. Somit wurde am Maximum noch ein CO-Umsatz von 84 % im Vergleich zu 91 % bei totaler Zellrückhaltung erreicht. Durch den Ausfall der Pumpen kam es am Prozessende zu einem Abfall der CO-Aufnahmeraten.



**Abbildung 6-30** Gasaufnahme- und Gaspartialdrücke der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie), CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) und H<sub>2</sub> (hellgrau gestrichelte Linie) bei autotrophen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im kontinuierlichen Prozess mit vollständiger Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (A und B) und mit teilweiser Zellrückhaltung bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  mit  $D_{\text{Bleed}} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  (C und D) bei den Prozessbedingungen:  $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P \text{ V}^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $\text{pH} = 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Der Beginn der teilweisen Zellrückhaltung erfolgte nach 80 h. Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ).

Durch die Einführung des Verluststroms im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung konnte die Biomassekonzentration für 72 h (entspricht  $5,7 \tau$ ) stabil gehalten werden. Die erreichte Konzentration von 2,3-Butandiol erreichte ebenfalls annähernd konstante Werte für insgesamt 48 h. Die Produktkonzentrationen von Acetat und Ethanol waren jedoch

nicht konstant, sodass kein stabiles Fließgleichgewicht erreicht wurde. Daher können keine Raum-Zeit-Ausbeuten bestimmt werden. Der Vergleich der Prozesse mit vollständiger und teilweiser Zellrückhaltung erfolgte daher basierend auf den kumulierten gebildeten Produktmengen. Diese sind in Abbildung 6-31 gegenübergestellt.



**Abbildung 6-31** Kumulierte Gesamtmenen von Biotrockenmasse, Acetat, Ethanol und 2,3-Butandiol bei kontinuierlichen Prozessen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor mit teilweiser Zellrückhaltung mit einer Durchflussrate von  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (weiße Kreise  $\circ$ ) im Vergleich zu vollständiger Zellrückhaltung mit Gesamtdurchflussrate  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  bei einem Verluststrom  $D_{\text{Bleed}} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,0$  (geregelt mit  $3 \text{ M NaOH}$  und  $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 600 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{H}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Der Beginn der teilweisen Zellrückhaltung erfolgte nach  $48 \text{ h}$ . Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach  $48 \text{ h}$ . Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ). Der letzte Messpunkt im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung stellt einen Ausreißer aufgrund eines Pumpenausfalls dar.

Durch die teilweise Zellrückhaltung nahm die kumulierte Biomasse bis zum Prozessende zu. Im Gegensatz dazu blieb die gebildete Biomasse im Prozess mit totaler Zellrückhaltung ab  $190 \text{ h}$  konstant. Im Prozess mit totaler Zellrückhaltung nahm die Zunahme der Alkohole Ethanol und 2,3-Butandiol nach  $144 \text{ h}$  ab. Im Gegensatz dazu blieb im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung weiterhin die Alkoholbildung hoch. Die starke Zunahme der Acetatbildung wurde durch die teilweise Zellrückhaltung verhindert. Somit wurden am Prozessende nach  $240 \text{ h}$  im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung integrale Mengen von

127 % mehr Biotrockenmasse, 37 % mehr Ethanol, 51 % mehr 2,3-Butandiol und 71 % weniger Acetat gebildet als im Prozess mit vollständiger Zellrückhaltung.

### Diskussion

Die Weiterentwicklung des kontinuierlichen Membranbioreaktors zu einem Reaktorsystem mit teilweiser Zellrückhaltung ermöglichte, im Gegensatz zur vollständigen Zellrückhaltung, eine über einen längeren Zeitraum höhere Alkoholkonzentration zu erreichen. Zusätzlich konnte die Acetatakkumulation im Vergleich zu totaler Zellrückhaltung verringert werden.

Die Biotrockenmassekonzentration wurde durch die teilweise Zellrückhaltung konstant auf  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  für  $5,7 \tau$  gehalten. Trotzdem wurden keine konstanten Produktkonzentrationen für Acetat und Ethanol und somit kein stabiles Fließgleichgewicht erreicht. Somit können keine Raum-Zeit-Ausbeuten ermittelt werden. Der Vergleich der integralen Mengen von Biomasse und Produkten zeigte jedoch, dass die teilweise Zellrückhaltung eine deutlich höhere Alkoholproduktion bei geringerer Acetatakkumulation im Vergleich zum Prozess mit totaler Zellrückhaltung ermöglichte.

Somit konnte mit dem kontinuierlichen Betrieb als Membranbioreaktor mit teilweiser Zellrückhaltung bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ein vielversprechendes Reaktorsystem für industrielle Gasfermentationsprozesse geschaffen werden. Technische Synthesegasfermentationsprozesse sollten aufgrund der geringen Wertschöpfung des Gesamtprozesses kontinuierlich geführt werden (Vees et al. 2020). Dabei stellt die vollständige Zellrückhaltung mit einer getauchten Membran einen etablierten Prozess dar, da diese mit der Membranoberfläche skalierbar bis zum großen Kubikmetermaßstab sind (Lin et al. 2011).

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthesegasfermentation stellt eine vielversprechende Technologie zur Produktion technisch bedeutender Alkohole aus Synthesegasen (Mischungen von CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) dar. Synthesegase können als industrielle Abgase oder bei der Vergasung biogener Reststoffe entstehen. Acetogene Mikroorganismen sind in der Lage diese Synthesegase als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und daraus Acetat und Ethanol zu produzieren (Ragsdale und Pierce 2008). Ethanol ist hierbei das wirtschaftlich bedeutendere Produkt, da es als Biokraftstoff Anwendung findet (Bengelsdorf et al. 2018).

Der acetogene Mikroorganismus *C. carboxidivorans* zeichnet sich besonders durch die Bildung der längerkettigen Alkohole 1-Butanol und 1-Hexanol aus (Fernández-Naveira et al. 2017). Diese besitzen als Kraftstoffe und Lösemittel große technische Relevanz (Ezeji et al. 2004; Dürre 2007). *C. autoethanogenum* hingegen produziert den zweiwertigen Alkohol 2,3-Butandiol (Köpke et al. 2011b). Dieser stellt eine bedeutende Plattformchemikalie unter anderem für die Produktion von 1,3-Butadien dar (Liu et al. 2016). Beide Mikroorganismen haben ein hohes Potential zur Produktion hoher Alkoholkonzentrationen bei niedriger Acetatakkumulation gezeigt (Abubackar et al. 2015a; Doll et al. 2018).

Neben den Hauptkomponenten enthalten Synthesegase aus der Vergasung biogener Reststoffe Spurenverunreinigungen wie NH<sub>3</sub>, HCN, NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>S, COS, CS<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> und Teere (Kaltschmitt et al. 2016). Die Kenntnis der Effekte von Spurenverunreinigungen auf acetogene Mikroorganismen ist von großer Bedeutung, was sich am Beispiel des gescheiterten Synthesegasfermentationsprozesses der Firma INEOS zeigt (Liew et al. 2016). Bisher gab es wenige Untersuchungen zu Spurenverunreinigungen, die zudem durch unterschiedliche verwendete Mikroorganismen und Reaktorsysteme schwierig vergleichbar sind (Benevenuti et al. 2021). Quantitative Gasreinigungskriterien für ein biogenes Synthesegas wurden dabei nicht beschrieben. Daher war Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Einflüsse definierter Konzentrationen der Spurenverunreinigungen NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und den löslichen Stickoxidspezies (NO<sub>x</sub>) Nitrat und Nitrit auf Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* in vollständig kontrollierten, kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren. Die Untersuchungsergebnisse erlauben die Definition quantitativer Synthesegasreinigungskriterien. Die Validierung der gewonnen Erkenntnisse erfolgt durch die Umsetzung realer Synthesegase aus der Vergasung biogener Reststoffe mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum*.

In Satzprozessen mit acetogenen Clostridien werden nur geringe Zelldichten erreicht. Daher würden für Massenprozesse wie die Alkoholproduktion große Reaktionsvolumina

benötigt („Ökonomie des Maßstabs“, engl. „*economy of scale*“) (Takors et al. 2018; Benalcázar et al. 2017). Kontinuierliche Prozesse mit getauchten Mikrofiltrationsmembranen zur Zellrückhaltung können durch die Verweilzeitentkopplung von Biomasse und Reaktionsmedium effiziente Gasfermentationsprozesse ermöglichen (Kantzow et al. 2015, Mayer et al. 2018). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung kontinuierlicher Gasfermentationsprozesse in Membranbioreaktoren mit *C. autoethanogenum* zur Erhöhung der Alkoholproduktivität.

Um das Ziel der quantitativen Definition von Synthesegasreinigungskriterien zu erreichen, wurden autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* mit Reingasen in vollständig kontrollierten kontinuierlich begasten Rührkesselreaktoren mit definierten Spurenverunreinigungen ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NO}_x$ ) durchgeführt. Die definierten Konzentrationen der Spurenverunreinigungen wurden dem Bioreaktor über wässrige Lösungen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Thioacetamid (zur *in situ* Erzeugung von  $\text{H}_2\text{S}$ ),  $\text{NaNO}_3$  und  $\text{NaNO}_2$  zugegeben. Die Ergebnisse wurden mit dem Referenzsatzprozess mit Reingasen ohne Spurenverunreinigungen verglichen.

*C. carboxidivorans* zeigte dabei eine hohe Toleranz gegenüber den Spurenverunreinigungen  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}_2\text{S}$ , da dieser Mikroorganismus bei Konzentrationen von bis zu  $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  oder  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  Steigerungen der maximalen Ethanolkonzentration um bis zu 115 % beziehungsweise 178 % zeigte. Erst Konzentrationen von  $10,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  oder  $2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  resultierten in deutlichen Inhibierungen von Wachstum und Alkoholproduktion. Im Gegensatz dazu zeigte *C. autoethanogenum* eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diesen beiden Spurenverunreinigungen, da nur bei Zugaben von bis zu  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  oder  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  ähnliches Wachstum und ähnlich hohe finale Ethanolkonzentrationen resultierten. Bereits die Zugaben von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  oder  $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  bewirkten eine deutliche Reduzierung von Wachstum und Produktbildung von *C. autoethanogenum*.

Die Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  bewirkte für *C. carboxidivorans* bereits eine starke initiale Verzögerung des Wachstums von 32 h. Im Anschluss wurde neben einem verstärkten Biomassewachstum auch eine Verschiebung des Produktspektrums zur Säurebildung beobachtet, welches das Alkohol-zu-Säure-Verhältnis auf  $0,76 \text{ g g}^{-1}$  im Vergleich zum Referenzsatzprozess um Faktor 2,6 deutlich senkte. Für *C. autoethanogenum* wurde mit der Zugabe von  $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  hingegen nur eine geringe Inhibierung von

Wachstum und Produktbildung beobachtet. Die Zugabe von  $0,2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  führte jedoch zu deutlichen Inhibierungseffekten von Wachstum und Produktbildung mit *C. autoethanogenum*.

Die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  erfolgte stets erst nachdem in einem Satzprozess ohne Zugabe von Spurenverunreinigungen bereits eine Biotrockenmassekonzentration von  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  (*C. carboxidivorans*) oder  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (*C. autoethanogenum*) erreicht war. Für beide Mikroorganismen wurde bereits durch die Zugabe von  $0,01 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  eine sofortige Einstellung der CO-Aufnahme beobachtet. Während im Satzprozess mit *C. carboxidivorans* jedoch bis zum Prozessende nach 144 h die Biomassekonzentration konstant blieb, wurde mit *C. autoethanogenum* ein schnelles Absinken der Biotrockenmassekonzentration um 38 % innerhalb von 10 h beobachtet. Im Anschluss daran konnte jedoch mit *C. autoethanogenum* ein erneuter Anstieg von Biomasse- und Acetatkonzentration sowie der CO-Aufnahmerate beobachtet werden. Für *C. carboxidivorans* wurde bis zum Prozessende nach 144 h keine metabolische Aktivität nach der Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  mehr quantifiziert.

Die erhaltenen kritischen Konzentrationen für Wachstum und Produktbildung der beiden Mikroorganismen wurden daraufhin in die entsprechenden Gasphasenanteile in einem biogenen Synthesegas unter der Annahme vollständiger Absorption in der wässrigen Phase und weder Desorption noch Aufnahme durch die Mikroorganismen für eine Prozesszeit von 144 h bei einer Begasungsrate von  $0,083 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  umgerechnet (Abbildung 7-1 A). Somit konnten quantitative Gasreinigungsziele für die Reinigung eines biogenen Synthesegases aus der Vergasung biogener Reststoffe ermittelt werden. Im Vergleich zu typischen Größenordnungen der Spurenverunreinigungen in biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe zeigt sich dabei, dass für *C. carboxidivorans* für die Komponenten  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}_2\text{S}$  keine Gasreinigung notwendig wäre. Die Konzentration von  $\text{NO}_x$  hingegen sollte für einen technischen Synthesegasfermentationsprozess entweder bei der Vergasung gemindert werden oder das Synthesegas selektiv von  $\text{NO}_x$  gereinigt werden. Für *C. autoethanogenum* wäre aufgrund der geringeren ermittelten Toleranz eine Reduktion im Vergasungsprozess oder eine spätere Gasreinigung für die drei Komponenten  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NO}_x$  notwendig (Abbildung 7-1 A).

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnten erstmals quantitative Gasreinigungskriterien für drei der mengenmäßig bedeutendsten Spurenverunreinigungen biogener Synthesegase gewonnen werden. Zudem wurde erstmals der Vergleich zweier acetogener Mikroorganismen unter vergleichbaren Bedingungen mit definierten Spurenverunreinigungskonzentrationen verschiedener Spurenverunreinigungskomponenten

gezeigt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für Gasfermentationen mit biogenen Synthesegasen.

Des Weiteren wurden Synthesegasfermentationen mit biogenem Synthesegas durchgeführt. Dabei wurden autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* mit einem Synthesegas aus der Flugstromvergasung von torrefiziertem Holz (TorrCoal) nach anschließender Vorreinigung und Abfüllung in Druckgasflaschen durchgeführt. Das biogene Synthesegas wurde vom Projektpartner (Lehrstuhl für Energiesysteme der TUM) bereitgestellt. Da das Synthesegas bedingt durch den Flaschenabfüllungsprozess einen Sauerstoffanteil von 2 459 ppm aufwies, wurde der Sauerstoff im Synthesegas für Satzprozesse mit biogenem Synthesegas zusätzlich in einen Rohrreaktor mit Palladium-Katalysator auf 293 ppm O<sub>2</sub> reduziert. Dabei wurde der im Synthesegas enthaltene Wasserstoff genutzt, um mit dem Sauerstoff am Palladium-Katalysator zu Wasser abzureagieren. Anschließend wurde die entstandene Feuchtigkeit an eine Schüttung von Silicagel im Rohrreaktor gebunden.

Zunächst wurden zwei unabhängige Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor mit biogenem Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits 2 459 ppm O<sub>2</sub> in realem Synthesegas stark inhibierend auf Wachstum und Produktbildung wirkten. Trotz des niedrigen Redoxpotentials im Bioreaktor und der Regelung mit Cystein als Reduktionsmittel auf unter -200 mV wurde die Alkoholproduktion vollständig inhibiert (Abbildung 7-1 B).

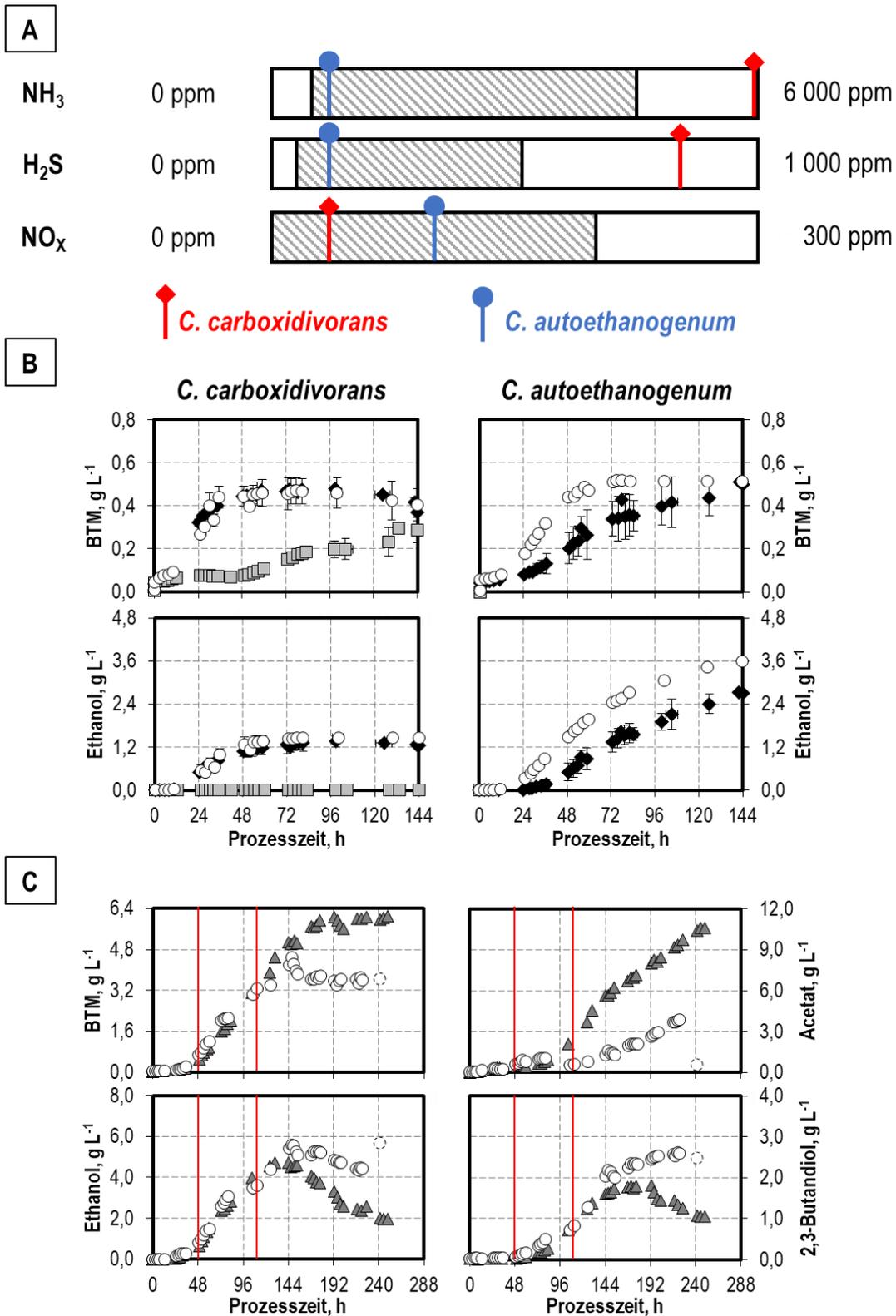
Der Einsatz des Rohrreaktors mit Palladium-Katalysator zur Sauerstoffreduktion auf 293 ppm O<sub>2</sub> ermöglichte in zwei unabhängigen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* jeweils erfolgreiche Alkoholproduktionsprozesse. Diese lieferten im Durchschnitt gleiches Wachstum und die gleiche hohe Alkoholproduktion wie drei unabhängige Referenzsatzprozesse mit Reingasen (Abbildung 7-1 B). Für *C. autoethanogenum* konnte in einem Synthesegasfermentationsprozess mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion sogar ein stärkeres Wachstum und eine höhere Alkoholproduktion als im Mittel in drei unabhängigen Vergleichssatzprozessen erreicht werden. Allerdings konnte dieser Satzprozess aufgrund unzureichender Verfügbarkeit des biogenen Synthesegases nicht mehr reproduziert werden.

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung kontinuierlicher Synthesegasfermentationsprozesse mit *C. autoethanogenum* mit dem Ziel einer Erhöhung der Alkoholproduktivität angestrebt. Kontinuierliche Prozesse ohne Zellrückhaltung (Chemostat) mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  führten zu keinem Erreichen eines stabilen Fließgleichgewichts. Durch eine getauchte

Mikrofiltrationsmembran zur Zellrückhaltung (Membranbioreaktor) bei  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  konnten die Biomassekonzentration sowie Alkoholkonzentrationen deutlich gegenüber dem Chemostaten gesteigert werden. Insbesondere zum Prozessende nahm jedoch die Acetatproduktion stark zu, auf Kosten einer sinkenden Ethanolproduktion. Der CO-Umsatz stieg im Membranbioreaktor mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  auf bis zu 91 % an. Durch diesen hohen CO-Umsatz könnte es zu einer Stoff-Transport-Limitierung kommen, die dazu führte, dass *C. autoethanogenum* schlechter mit CO versorgt wurde und sich daher das Produktspektrum weiter zur Säurebildung verschob. Um die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration zu begrenzen, wurde ein so genannter Verluststrom (engl. *bleed*) eingeführt. In dieser Arbeit wurde ein Verluststrom  $D_{\text{Bleed}} = 0,02 \text{ h}^{-1}$  in Höhe von 25 % des Gesamtdurchflusses  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  untersucht. In diesem Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung wurden für 5 mittlere hydraulische Verweilzeiten  $\tau$  nahezu stabile Biotrockenmasse- und 2,3-Butandiolkonzentrationen erreicht (Abbildung 7-1 C). Allerdings kam es auch hier zu einer langsamen Abnahme der Ethanolkonzentration auf Kosten einer steigenden Acetatkonzentration. Trotzdem lagen die pro Zeit gebildeten Alkoholmengen mit teilweiser Zellrückhaltung höher als in allen anderen kontinuierlichen Prozessen in dieser Arbeit. Insgesamt konnte durch die teilweise Zellrückhaltung noch ein CO-Umsatz von bis zu 84 % CO erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Effekte von Spurenverunreinigungen aus biogenen Synthesegasen auf verschiedene acetogene Mikroorganismen sehr unterschiedlich sein können. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können in zukünftigen Arbeiten weitere acetogene Mikroorganismen in Bezug auf ihre Toleranz gegenüber Spurenverunreinigungen untersucht werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnten einzelne Spurenverunreinigungen als mehr oder weniger kritisch für die Mikroorganismen *C. carboxidivorans* und *C. autoethanogenum* identifiziert werden. Durch genetische Modifikation der Mikroorganismen könnte die Toleranz gegenüber den kritischen Spurenverunreinigungen erhöht werden, um den notwendigen Aufwand für eine technische Synthesegasreinigung zu verringern.



**Abbildung 7-1** Grafische Kurzfassung

**A** Zusammenfassung der ermittelten kritischen Konzentrationen der Spurenverunreinigungen NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und NO<sub>x</sub> (unter der Annahme vollständiger Umsetzung des NO<sub>x</sub> Stickstoffs in Nitrat) für *C. carboxidivorans* (blauer Kreis) und *C. autoethanogenum* (rote Raute) im Vergleich zu Bereichen typischer Konzentrationen der Spurenverunreinigungen in biogenen Synthesegasen aus der Vergasung biogener Reststoffe (grau schraffiert).

**B** Vergleich der Synthesegasfermentationsprozesse mit biogenem Synthesegas mit Prozessen mit Reingasen. Referenzsatzprozesse mit Reingasen (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ), Satzprozesse mit biogenem Synthesegas ohne Sauerstoffreduktion (hellgraues Quadrat  $\square$ ) und Satzprozesse mit biogenem Synthesegas mit Sauerstoffreduktion (weißer Kreis  $\circ$ ). Satzprozesse mit Reingasen wurden jeweils dreimal durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Satzprozesse mit biogenem Synthesegas mit *C. carboxidivorans* (links) wurden jeweils zweimal durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert sowie Fehlerbalken aus Minimal- und Maximalwert der Prozesse. Der Prozess mit biogenem Synthesegas mit *C. autoethanogenum* (rechts) wurden einmal durchgeführt.

**C** Vergleich der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen mit *C. autoethanogenum* im kontinuierlichen Prozess mit totaler Zellrückhaltung mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (dunkelgraues Dreieck  $\blacktriangle$ ) und im kontinuierlichen Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  (weißer Kreis  $\circ$ ). Die erste vertikale rote Linie kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Prozesses nach 48 h. Die zweite vertikale rote Linie kennzeichnet das Erreichen von 5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb mit  $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$  ( $5 \tau = 62,5 \text{ h}$ ). Der letzte Messpunkt im Prozess mit teilweiser Zellrückhaltung stellt einen Ausreißer aufgrund eines Pumpenausfalls dar.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abrini, Jamal; Naveau, Henry; Nyns, Edmond-Jacques (1994): *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. In *Arch. Microbiol.* 161 (4), 345–351. doi: 10.1007/BF00303591.
- Abubackar, Haris Nalakath; Fernández-Naveira, Ánxela; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2016): Impact of cyclic pH shifts on carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum*. In *Fuel* 178, 56–62. doi: 10.1016/j.fuel.2016.03.048.
- Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2012): Biological conversion of carbon monoxide to ethanol. Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. In *Bioresource technology* 114, 518–522. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.027.
- Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2015a): Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. In *Bioresource technology* 186, 122–127. doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.113.
- Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2015b): Ethanol and acetic acid production from carbon monoxide in a *Clostridium* strain in batch and continuous gas-fed bioreactors. In *International journal of environmental research and public health* 12 (1), 1029–1043. doi: 10.3390/ijerph120101029.
- Abubackar, Haris Nalakath; Veiga, María C.; Kennes, Christian (2018): Production of acids and alcohols from syngas in a two-stage continuous fermentation process. In *Bioresource technology* 253, 227–234. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.026.
- Agon, N.; Hrabovský, M.; Chumak, O.; Hlína, M.; Kopecký, V.; Masláni, A. et al. (2016): Plasma gasification of refuse derived fuel in a single-stage system using different gasifying agents. In *Waste management (New York, N. Y.)* 47 (Pt B), 246–255. doi: 10.1016/j.wasman.2015.07.014.
- Ahmed, Asma; Cateni, Bruno G.; Huhnke, Raymond L.; Lewis, Randy S. (2006): Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7<sup>T</sup>. In *Biomass and Bioenergy* 30 (7), 665–672. doi: 10.1016/j.biombioe.2006.01.007.
- Ahmed, Asma; Lewis, Randy S. (2007): Fermentation of biomass-generated synthesis gas: effects of nitric oxide. In *Biotechnology and bioengineering* 97 (5), 1080–1086. doi: 10.1002/bit.21305.
- Ahrenfeldt, Jesper; Thomsen, Tobias P.; Henriksen, Ulrik; Clausen, Lasse R. (2013): Biomass gasification cogeneration – A review of state of the art technology and near future perspectives. In *Applied Thermal Engineering* 50 (2), 1407–1417. doi: 10.1016/j.applthermaleng.2011.12.040.
- Ajanovic, Amela (2011): Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? In *Energy* 36 (4), 2070–2076. doi: 10.1016/j.energy.2010.05.019.
- Alauddin, Zainal Alimuddin Bin Zainal; Lahijani, Pooya; Mohammadi, Maedeh; Mohamed, Abdul Rahman (2010): Gasification of lignocellulosic biomass in fluidized beds for renewable energy development: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (9), 2852–2862. doi: 10.1016/j.rser.2010.07.026.

- Allais, J. J.; Louktibi, A.; Baratti, J. (1983): Oxidation of Methanol by the Yeast *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Formate Dehydrogenase. In *Agricultural and Biological Chemistry* 47 (11), 2547–2554. doi: 10.1080/00021369.1983.10865989.
- Andrews, John F. (1968): A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. In *Biotechnology and bioengineering* 10 (6), 707–723. doi: 10.1002/bit.260100602.
- Arendsen, A. F.; Soliman, M. Q.; Ragsdale, S. W. (1999): Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. In *Journal of bacteriology* 181 (5), 1489–1495.
- Battino, Rubin; Seybold, Paul G.; Campanell, Frank C. (2011): Correlations Involving the Solubility of Gases in Water at 298.15 K and 101325 Pa. In *J. Chem. Eng. Data* 56 (4), 727–732. doi: 10.1021/je101070h.
- Benalcázar, Eduardo Almeida; Deynoot, Baudine Gevers; Noorman, Henk; Osseweijer, Patricia; Posada, John A. (2017): Production of bulk chemicals from lignocellulosic biomass via thermochemical conversion and syngas fermentation: a comparative techno-economic and environmental assessment of different site-specific supply chain configurations. In *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 11 (5), 861–886. doi: 10.1002/bbb.1790.
- Benevenuti, Carolina; Amaral, Priscilla; Ferreira, Tatiana; Seidl, Peter (2021): Impacts of Syngas Composition on Anaerobic Fermentation. In *Reactions* 2 (4), 391–407. doi: 10.3390/reactions2040025.
- 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, 143–221. doi: 10.1016/bs.aambs.2018.01.002.
- Bengelsdorf, Frank R.; Straub, Melanie; Dürre, Peter (2013): Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. In *Environmental technology* 34 (13-16), 1639–1651. doi: 10.1080/09593330.2013.827747.
- Bennett, George N.; Rudolph, Frederick B. (1995): The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. In *FEMS Microbiol Rev* 17 (3), 241–249. doi: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00208.x.
- Bertsch, Johannes; Müller, Volker (2015): Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria. In *Biotechnology for biofuels* 8, p. 210. doi: 10.1186/s13068-015-0393-x.
- Bollag, Jean-Marc; Henninger, Nancy M. (1978): Effects of nitrite toxicity on soil bacteria under aerobic and anaerobic conditions. In *Soil Biology and Biochemistry* 10 (5), 377–381. doi: 10.1016/0038-0717(78)90061-5.
- Briesemeister, Ludwig; Kremling, Michael; Fendt, Sebastian; Spliethoff, Hartmut (2017): Air-Blown Entrained-Flow Gasification of Biomass. Influence of Operating Conditions on Tar Generation. In *Energy Fuels* 31 (10), 10924–10932. doi: 10.1021/acs.energyfuels.7b01801.
- Bruant, Guillaume; Lévesque, Marie-Josée; Peter, Chardeen; Guiot, Serge R.; Masson, Luke (2010): Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7. In *PloS one* 5 (9), e13033. doi: 10.1371/journal.pone.0013033.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung (2022): Bioökonomie in Deutschland. Chancen für eine biobasierte und nachhaltige Zukunft. In Zusammenarbeit mit Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Berlin: Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) - Referat 725 Nachhaltiges

- Wirtschaften; Bioökonomie. Available online at <https://www.bundesregierung.de/breg-de/suche/biooekonomie-in-deutschland-2037548>, checked on 8/30/2022.
- Cao, Wen; Guo, Liejin; Yan, Xuecheng; Zhang, Deming; Yao, Xiangdong (2018): Assessment of sugarcane bagasse gasification in supercritical water for hydrogen production. In *International Journal of Hydrogen Energy* 43 (30), 13711–13719. doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.12.013.
- Carvalho, Mariana M.O.; Cardoso, Marcelo; Vakkilainen, Esa K. (2015): Biomass gasification for natural gas substitution in iron ore pelletizing plants. In *Renewable Energy* 81, 566–577. doi: 10.1016/j.renene.2015.03.056.
- Chan, Walter H.; Nordstrom, Robert J.; Calvert, Jack G.; Shaw, John H. (1976): Kinetic study of nitrous acid formation and decay reactions in gaseous mixtures of nitrous acid, nitrogen oxide (NO), nitrogen oxide (NO<sub>2</sub>), water, and nitrogen. In *Environ. Sci. Technol.* 10 (7), 674–682. doi: 10.1021/es60118a007.
- Chen, Zhong; Yuan, Shuai; Liang, Qinfeng; Wang, Fuchen; Yu, Zunhong (2009): Distribution of HCN, NH<sub>3</sub>, NO and N<sub>2</sub> in an entrained flow gasifier. In *Chemical Engineering Journal* 148 (2-3), 312–318. doi: 10.1016/j.cej.2008.08.038.
- Cheng, Chi; Bao, Teng; Yang, Shang-Tian (2019a): Engineering *Clostridium* for improved solvent production. Recent progress and perspective. In *Applied microbiology and biotechnology* 103 (14), 5549–5566. doi: 10.1007/s00253-019-09916-7.
- Cheng, Chi; Li, Weiming; Lin, Meng; Yang, Shang-Tian (2019b): Metabolic engineering of *Clostridium carboxidivorans* for enhanced ethanol and butanol production from syngas and glucose. In *Bioresource technology* 284, 415–423. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.145.
- Chmiel, Horst; Takors, Ralf; Weuster-Botz, Dirk (Eds.) (2018): Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chmiel, Horst; Walitza, Eckehard (2018): Transportvorgänge in Biosuspensionen. In Horst Chmiel, Ralf Takors, Dirk Weuster-Botz (Eds.): Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 131–156.
- Chmiel, Horst; Weuster-Botz, Dirk (2018): Bioreaktoren. In Horst Chmiel, Ralf Takors, Dirk Weuster-Botz (Eds.): Bioprozesstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 157–229.
- Daniell, James; Köpke, Michael; Simpson, Séan (2012): Commercial Biomass Syngas Fermentation. In *Energies* 5 (12), 5372–5417. doi: 10.3390/en5125372.
- Datar, Rohit P.; Shenkman, Rustin M.; Cateni, Bruno G.; Huhnke, Raymond L.; Lewis, Randy S. (2004): Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. In *Biotechnology and bioengineering* 86 (5), 587–594. doi: 10.1002/bit.20071.
- Doll, Kathrin (2018): Reaktionstechnische Untersuchungen zur autotrophen Herstellung von Alkoholen mit *Clostridium carboxidivorans*. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik. Online verfügbar unter <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1438916/1438916.pdf>.
- 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*. doi: 10.1007/s00449-018-1969-1.
- Drake, Harold L. (1995): Acetogenesis, Acetogenic Bacteria, and the Acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” Pathway: Past and Current Perspectives. In Harold L. Drake (Ed.): Acetogenesis. Boston, MA: Springer US, 3–60.

- Dürre, Peter (2007): Biobutanol. An attractive biofuel. In *Biotechnology journal* 2 (12), 1525–1534. doi: 10.1002/biot.200700168.
- Emerson, David F.; Woolston, Benjamin M.; Liu, Nian; Donnelly, Mackenzie; Currie, Devin H.; Stephanopoulos, Gregory (2019): Enhancing hydrogen-dependent growth of and carbon dioxide fixation by *Clostridium ljungdahlii* through nitrate supplementation. In *Biotechnology and bioengineering* 116 (2), 294–306. doi: 10.1002/bit.26847.
- Ezeji, Thaddeus C.; Qureshi, Nasib; Blaschek, Hans P. (2004): Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. In *Chemical record (New York, N.Y.)* 4 (5), 305–314. doi: 10.1002/tcr.20023.
- Ezeji, Thaddeus Chukwuemeka; Qureshi, Nasib; Blaschek, Hans Peter (2013): Microbial production of a biofuel (acetone-butanol-ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal. In *Bioprocess and biosystems engineering* 36 (1), 109–116. doi: 10.1007/s00449-012-0766-5.
- 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), 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 syn-gas/waste gas. In *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (4), 712–731. doi: 10.1002/jctb.5194.
- Fröstl, J. M.; Seifritz, C.; Drake, H. L. (1996): Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. In *Journal of bacteriology* 178 (15), 4597–4603. doi: 10.1128/jb.178.15.4597-4603.1996.
- Ganigué, Ramon; Sánchez-Paredes, Patricia; Bañeras, Lluís; Colprim, Jesús (2016): Low Fermentation pH Is a Trigger to Alcohol Production, but a Killer to Chain Elongation. In *Frontiers in microbiology* 7, p. 702. doi: 10.3389/fmicb.2016.00702.
- Gergel, D.; Cederbaum, A. I. (1996): Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S nitrosylation and the release of zinc. In *Biochemistry* 35 (50), 16186–16194. doi: 10.1021/bi962043r.
- Göbbels, Luise; Poehlein, Anja; Dumnitch, Albert; Egelkamp, Richard; Kröger, Cathrin; Haerdter, Johanna et al. (2021): Cysteine: an overlooked energy and carbon source. In *Scientific reports* 11 (1), p. 2139. doi: 10.1038/s41598-021-81103-z.
- Gompertz, Benjamin (1825): On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. In *Phil. Trans. R. Soc.* 115, 513–583. doi: 10.1098/rstl.1825.0026.
- Gong, Xin; Lu, Wenxue; Guo, Xiaolei; Dai, Zhenghua; Liang, Qinfeng; Liu, Haifeng et al. (2014): Pilot-scale comparison investigation of different entrained-flow gasification technologies and prediction on industrial-scale gasification performance. In *Fuel* 129, 37–44. doi: 10.1016/j.fuel.2014.03.030.
- Groher, Anna; Weuster-Botz, Dirk (2016): Comparative reaction engineering analysis of different acetogenic bacteria for gas fermentation. In *Journal of biotechnology* 228, 82–94. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.032.
- Gunning, Harry E. (1955): Thioacetamide as a sulfide precipitant in qualitative and quantitative analysis. In *J. Chem. Educ.* 32 (5), p. 258. doi: 10.1021/ed032p258.

- Guo, Ying; Xu, Jingliang; Zhang, Yu; Xu, Huijuan; Yuan, Zhenhong; Li, Dong (2010): Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. In *Bioresource technology* 101 (22), 8784–8789. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.072.
- Harvey, Benjamin G.; Meylemans, Heather A. (2011): The role of butanol in the development of sustainable fuel technologies. In *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (1), 2–9. doi: 10.1002/jctb.2540.
- Hass, Volker C.; Pörtner, Ralf (2011): Praxis der Bioprozesstechnik. Mit virtuellem Praktikum. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Haynes, W. M.; Lide, David R.; Bruno, Thomas J. (2016): CRC Handbook of Chemistry and Physics: CRC Press.
- Heffernan, James K.; Valgepea, Kaspar; Souza Pinto Lemgruber, Renato de; Casini, Isabella; Plan, Manuel; Tappel, Ryan et al. (2020): Enhancing CO<sub>2</sub>-Valorization Using *Clostridium autoethanogenum* for Sustainable Fuel and Chemicals Production. In *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, p. 204. doi: 10.3389/fbioe.2020.00204.
- Hemme, Christopher L.; Mouttaki, Housna; Lee, Yong-Jin; Zhang, Gengxin; Goodwin, Lynne; Lucas, Susan et al. (2010): Sequencing of multiple clostridial genomes related to biomass conversion and biofuel production. In *Journal of bacteriology* 192 (24), 6494–6496. doi: 10.1128/JB.01064-10.
- Hempel, D. C. (2005): Bioverfahrenstechnik. In K.-H Grote, J. Feldhusen (Eds.): *Dubbel. Taschenbuch für den Maschinenbau*. 21<sup>st</sup> ed.: Springer Berlin Heidelberg, N36-N55.
- Henry, William (1803): III. Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. In *Phil. Trans. R. Soc.* 93, 29–274. doi: 10.1098/rstl.1803.0004.
- Hernández, J. J.; Aranda, G.; Barba, J.; Mendoza, J. M. (2012): Effect of steam content in the air–steam flow on biomass entrained flow gasification. In *Fuel Processing Technology* 99, 43–55. doi: 10.1016/j.fuproc.2012.01.030.
- Hess, Verena; Schuchmann, Kai; Müller, Volker (2013): The ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na<sup>+</sup> and is reversibly coupled to the membrane potential. In *The Journal of biological chemistry* 288 (44), 31496–31502. doi: 10.1074/jbc.M113.510255.
- Hu, Peng; Bowen, Spencer H.; Lewis, Randy S. (2011): A thermodynamic analysis of electron production during syngas fermentation. In *Bioresource technology* 102 (17), 8071–8076. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.080.
- Humphreys, Christopher M.; McLean, Samantha; Schatschneider, Sarah; Millat, Thomas; Henstra, Anne M.; Annan, Florence J. et al. (2015): Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium autoethanogenum*, an industrially relevant bacterium. In *BMC genomics* 16, p. 1085. doi: 10.1186/s12864-015-2287-5.
- 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), 159–165. doi: 10.1016/j.bej.2009.09.004.
- Hyman, M. R.; Ensign, S. A.; Arp, D. J.; Ludden, P. W. (1989): Carbonyl sulfide inhibition of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. In *Biochemistry* 28 (17), 6821–6826. doi: 10.1021/bi00443a007.
- Infantes, Alba; Kugel, Michaela; Raffelt, Klaus; Neumann, Anke (2020): Side-by-Side Comparison of Clean and Biomass-Derived, Impurity-Containing Syngas as

- Substrate for Acetogenic Fermentation with *Clostridium ljungdahlii*. In *Fermentation* 6 (3), p. 84. doi: 10.3390/fermentation6030084.
- Itoh, Homare; Hirota, Akira; Hirayama, Kazuo; Shin, Takashi; Murao, Sawao (1995): Properties of Ascorbate Oxidase Produced by *Acremonium* sp. HI-25. In *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (6), 1052–1056. doi: 10.1271/bbb.59.1052.
- Jaenicke, L. (1965): The Enzymes. Herausgeg. v.P. D. Boyer, H. Lardy undK. Myrbäck. Band 8. Academic Press, New York-London 1963. 2. völlig neubearb. Aufl., 484 S., (77).
- Jayah, T. H.; Aye, Lu; Fuller, R. J.; Stewart, D. F. (2003): Computer simulation of a downdraft wood gasifier for tea drying. In *Biomass and Bioenergy* 25 (4), 459–469. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00037-0.
- Jeremiáš, M.; Pohořelý, M.; Bode, P.; Skoblia, S.; Beňo, Z.; Svoboda, K. (2014): Ammonia yield from gasification of biomass and coal in fluidized bed reactor. In *Fuel* 117, 917–925. doi: 10.1016/j.fuel.2013.10.009.
- Joshi, J. B.; Mahajani, V. V.; JUVEKAR, V. A. (1985): Invited Review Absorption of NO<sub>x</sub> Gases. In *Chemical Engineering Communications* 33 (1-4), 1–92. doi: 10.1080/00986448508911161.
- Kaltschmitt, Martin; Hartmann, Hans; Hofbauer, Hermann (Eds.) (2016): Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren. 3. ed. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer Vieweg.
- Kaneko, Takao; Derbyshire, Frank; Makino, Eiichiro; Gray, David; Tamura, Masaaki (2000): Coal Liquefaction. In : Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kantzow, Christina (2015): Prozessintensivierung der Gasfermentation mit *Acetobacterium woodii* in Rührkesselreaktoren. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik. Online verfügbar unter <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1277421/1277421.pdf>
- Kantzow, Christina; Mayer, Alexander; Weuster-Botz, Dirk (2015): Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. In *Journal of biotechnology* 212, 11–18. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.07.020.
- 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), 1325–1330. doi: 10.1007/s00449-016-1600-2.
- Karnholz, Arno; Küsel, Kirsten; Gössner, Anita; Schramm, Andreas; Drake, Harold L. (2002): Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. In *Applied and environmental microbiology* 68 (2), 1005–1009. doi: 10.1128/AEM.68.2.1005-1009.2002.
- King, Allen D.; King, R. B.; Yang, D. B. (1980): Homogeneous catalysis of the water gas shift reaction using iron pentacarbonyl. In *J. Am. Chem. Soc.* 102 (3), 1028–1032. doi: 10.1021/ja00523a020.
- Klask, Christian-Marco; Kliem-Kuster, Nicolai; Molitor, Bastian; Angenent, LARGUS T. (2020): Nitrate Feed Improves Growth and Ethanol Production of *Clostridium ljungdahlii* With CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, but Results in Stochastic Inhibition Events. In *Frontiers in microbiology* 11, p. 724. doi: 10.3389/fmicb.2020.00724.
- de Klerk (2011): Fischer-Tropsch Refining, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Kobayashi, Jun; Kawamoto, Katsuya; Fukushima, Ryutaro; Tanaka, Shingo (2011): Woody biomass and RPF gasification using reforming catalyst and calcium oxide. In *Chemosphere* 83 (9), 1273–1278. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.010.
- Köpke, Michael; Gerth, Monica L.; Maddock, Danielle J.; Mueller, Alexander P.; Liew, Fungmin; Simpson, Séan D.; Patrick, Wayne M. (2014): Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase. In *Applied and environmental microbiology* 80 (11), 3394–3403. doi: 10.1128/AEM.00301-14.
- Köpke, Michael; Mihalcea, Christophe; Bromley, Jason C.; Simpson, Séan D. (2011a): Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. In *Current opinion in biotechnology* 22 (3), 320–325. doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.005.
- Köpke, Michael; Mihalcea, Christophe; Liew, Fungmin; Tizard, Joseph H.; Ali, Mohammed S.; Conolly, Joshua J. et al. (2011b): 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. In *Applied and environmental microbiology* 77 (15), 5467–5475. doi: 10.1128/AEM.00355-11.
- Kraume, Matthias (2004): Stoffaustausch zwischen zwei fluiden Phasen. In Matthias Kraume (Ed.): *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 273–299.
- Kremling, Michael; Briesemeister, Ludwig; Gaderer, Matthias; Fendt, Sebastian; Spliethoff, Hartmut (2017): Oxygen-Blown Entrained Flow Gasification of Biomass. Impact of Fuel Parameters and Oxygen Stoichiometric Ratio. In *Energy Fuels* 31 (4), 3949–3959. doi: 10.1021/acs.energyfuels.6b02949.
- Kremling, Michael Bernd (2018): Experimentelle Untersuchungen zur sauerstoffgeblasenen Flugstromvergasung von staubförmiger Biomasse. Dissertation. Technische Universität München; Verlag Dr. Hut.
- Kundiyana, Dimple K.; Huhnke, Raymond L.; Wilkins, Mark R. (2010): Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: design and process considerations. In *Journal of bioscience and bioengineering* 109 (5), 492–498. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.022.
- Lee, Y. N.; Schwartz, S. E. (1981): Reaction kinetics of nitrogen dioxide with liquid water at low partial pressure. In *J. Phys. Chem.* 85 (7), 840–848. doi: 10.1021/j150607a022.
- Leppälahti, Jukka; Koljonen, Tiina (1995): Nitrogen evolution from coal, peat and wood during gasification: Literature review. In *Fuel Processing Technology* 43 (1), 1–45. doi: 10.1016/0378-3820(94)00123-B.
- Levenspiel, Octave (2007): *Chemical reaction engineering*. 3rd edition; International Student Edition. New Delhi: Wiley India.
- Li, Ning; Yang, Junjie; Chai, Changsheng; Yang, Sheng; Jiang, Weihong; Gu, Yang (2015): Complete genome sequence of *Clostridium carboxidivorans* P7(T), a syngas-fermenting bacterium capable of producing long-chain alcohols. In *Journal of biotechnology* 211, 44–45. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.430.
- Li, X. T.; Grace, J. R.; Lim, C. J.; Watkinson, A. P.; Chen, H. P.; Kim, J. R. (2004): Biomass gasification in a circulating fluidized bed. In *Biomass and Bioenergy* 26 (2), 171–193. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00084-9.
- Li, Yuqiang; Tang, Wei; Chen, Yong; Liu, Jiangwei; Lee, Chia-fon F. (2019): Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel. In *Fuel* 242, 673–686. doi: 10.1016/j.fuel.2019.01.063.

- Liakakou, E. T.; Infantes, A.; Neumann, A.; Vreugdenhil, B. J. (2021): Connecting gasification with syngas fermentation: Comparison of the performance of lignin and beech wood. In *Fuel* 290, p. 120054. doi: 10.1016/j.fuel.2020.120054.
- Liew, Fungmin; Henstra, Anne M.; Köpke, Michael; Winzer, Klaus; Simpson, Sean D.; Minton, Nigel P. (2017): Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production. In *Metabolic engineering* 40, 104–114. doi: 10.1016/j.ymben.2017.01.007.
- Liew, Fungmin; Köpke, Michael; Dennis, Sean (2013): Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. In Zhen Fang (Ed.): *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*: InTech.
- 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 *Front. Microbiol.* 7, p. 694. doi: 10.3389/fmicb.2016.00694.
- Liew, Fungmin Eric; Nogle, Robert; Abdalla, Tanus; Rasor, Blake J.; Canter, Christina; Jensen, Rasmus O. et al. (2022): Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale. In *Nature biotechnology*. doi: 10.1038/s41587-021-01195-w.
- Lin, Hongjun; Chen, Jianrong; Wang, Fangyuan; Ding, Linxian; Hong, Huachang (2011): Feasibility evaluation of submerged anaerobic membrane bioreactor for municipal secondary wastewater treatment. In *Desalination* 280 (1-3), 120–126. doi: 10.1016/j.desal.2011.06.058.
- 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), 2085–2091. doi: 10.1099/ijs.0.63482-0.
- Liu, Chen-Guang; Xue, Chuang; Lin, Yen-Han; Bai, Feng-Wu (2013): Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. In *Biotechnology advances* 31 (2), 257–265. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.
- Liu, Xi; Fabos, Viktoria; Taylor, Stuart; Knight, David W.; Whiston, Keith; Hutchings, Graham J. (2016): One-Step Production of 1,3-Butadiene from 2,3-Butanediol Dehydration. In *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 22 (35), 12290–12294. doi: 10.1002/chem.201602390.
- Ljungdahl, Lars G. (1986): The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. In *Annual review of microbiology* 40, 415–450. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.002215.
- Ljungdahl, Lars G.; Wood, Harland G. (1969): Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by heterotrophic bacteria. In *Annual review of microbiology* 23, 515–538. doi: 10.1146/annurev.mi.23.100169.002503.
- Maden, B. Edward H. (2000): Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C1 metabolism. In *Biochemical Journal* 350 (3), 609–629. doi: 10.1042/bj3500609.
- Mayer, Alexander (2018): Reaktionstechnische Untersuchungen zur Gasfermentation mit *Clostridium acetivum*. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik. Available online at <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1436846/1436846.pdf>.

- Mayer, Alexander; Schädler, Torben; Trunz, Sascha; Stelzer, Thomas; Weuster-Botz, Dirk (2018): Carbon monoxide conversion with *Clostridium aceticum*. In *Bio-technology and bioengineering*. doi: 10.1002/bit.26808.
- Mayer, Alexander; Weuster-Botz, Dirk (2017): Reaction engineering analysis of the autotrophic energy metabolism of *Clostridium aceticum*. In *FEMS microbiology letters*. doi: 10.1093/femsle/fnx219.
- Mazzoni, Luca; Janajreh, Isam; Elagroudy, Sherien; Ghenai, Chaouki (2020): Modeling of plasma and entrained flow co-gasification of MSW and petroleum sludge. In *Energy* 196, p. 117001. doi: 10.1016/j.energy.2020.117001.
- Meakin, G. E.; Jepson, B. J. N.; Richardson, D. J.; Bedmar, E. J.; Delgado, M. J. (2006): The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. In *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 1), 195–196. doi: 10.1042/bst0340195.
- Michel, Rudy; Rapagnà, Sergio; Burg, Philippe; Di Mazziotti Celso, Giuseppe; Courson, Claire; Zimny, Thierry; Gruber, René (2011): Steam gasification of *Miscanthus X Giganteus* with olivine as catalyst production of syngas and analysis of tars (IR, NMR and GC/MS). In *Biomass and Bioenergy* 35 (7), 2650–2658. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.054.
- Migliaccio, Renata; Brachi, Paola; Montagnaro, Fabio; Papa, Salvatore; Tavano, Alberto; Montesarchio, Pietro et al. (2021): Sewage Sludge Gasification in a Fluidized Bed: Experimental Investigation and Modeling. In *Ind. Eng. Chem. Res.* 60 (13), 5034–5047. doi: 10.1021/acs.iecr.1c00084.
- 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), 2965–2980. doi: 10.1128/jb.00399-15.
- Monod, Jacques (1942): Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
- Müller, Volker; Aufurth, Sascha; Rahlfs, Stefan (2001): The Na<sup>+</sup> cycle in *Acetobacterium woodii*. Identification and characterization of a Na<sup>+</sup> translocating F1F<sub>0</sub>-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1505 (1), 108–120. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00281-4.
- 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 *Bioresour. Technol.* 101 (13), 5013–5022. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.098.
- Nesbitt, Elizabeth R. (2020): Using Waste Carbon Feedstocks to Produce Chemicals. In *Industrial Biotechnology* 16 (3), 147–163. doi: 10.1089/ind.2020.29217.ern.
- Öhrman, Olov; Häggström, Caroline; Wiinikka, Henrik; Hedlund, Jonas; Gebart, Rikard (2012): Analysis of trace components in synthesis gas generated by black liquor gasification. In *Fuel* 102, 173–179. doi: 10.1016/j.fuel.2012.05.052.
- Öhrman, Olov G. W.; Molinder, Roger; Weiland, Fredrik; Johansson, Ann-Christine (2014): Analysis of trace compounds generated by pressurized oxygen blown entrained flow biomass gasification. In *Environ. Prog. Sustainable Energy* 33 (3), 699–705. doi: 10.1002/ep.11975.
- Öhrman, Olov G.W.; Weiland, Fredrik; Pettersson, Esbjörn; Johansson, Ann-Christine; Hedman, Henry; Pedersen, Mads (2013): Pressurized oxygen blown entrained

- flow gasification of a biorefinery lignin residue. In *Fuel Processing Technology* 115, 130–138. doi: 10.1016/j.fuproc.2013.04.009.
- Oliveira, Luis; Rückel, Anton; Nordgauer, Lisa; Schlumprecht, Patric; Hutter, Elina; Weuster-Botz, Dirk (2022): Comparison of Syngas-Fermenting *Clostridia* in Stirred-Tank Bioreactors and the Effects of Varying Syngas Impurities. In *Microorganisms* 10 (4). doi: 10.3390/microorganisms10040681.
- Oswald, Florian; Zwick, Michaela; Omar, Ola; Hotz, Ernst N.; Neumann, Anke (2018): Growth and Product Formation of *Clostridium ljungdahlii* in Presence of Cyanide. In *Frontiers in microbiology* 9, p. 1213. doi: 10.3389/fmicb.2018.01213.
- Park, Jong Yoon; Lee, Yin Nan (1988): Solubility and decomposition kinetics of nitrous acid in aqueous solution. In *J. Phys. Chem.* 92 (22), 6294–6302. doi: 10.1021/j100333a025.
- Pedroso, Daniel Travieso; Aiello, Ramon Cala; Conti, Leonetto; Mascia, Stefano (2005): Biomass gasification on a new really tar free downdraft gasifier. In *Rev. Ciências Exatas* 11, 59–62. Available online at <http://periodicos.unitau.br/ojs/index.php/exatas/article/view/345>.
- Peralta-Yahya, Pamela P.; Zhang, Fuzhong; Del Cardayre, Stephen B.; Keasling, Jay D. (2012): Microbial engineering for the production of advanced biofuels. In *Nature* 488 (7411), 320–328. doi: 10.1038/nature11478.
- 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, 114–121. doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.043.
- Picton, R.; Eggo, M. C.; Merrill, G. A.; Langman, M. J. S.; Singh, S. (2002): Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. In *Gut* 50 (2), 201–205. doi: 10.1136/gut.50.2.201.
- 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), 1873–1898. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.08.012.
- Ramachandriya, Karthikeyan D.; Kundiyana, Dimple K.; Wilkins, Mark R.; Terrill, Jennine B.; Atiyeh, Hasan K.; Huhnke, Raymond L. (2013): Carbon dioxide conversion to fuels and chemicals using a hybrid green process. In *Applied Energy* 112, 289–299. doi: 10.1016/j.apenergy.2013.06.017.
- Ramió-Pujol, Sara; Ganigué, Ramon; Bañeras, Lluís; Colprim, Jesús (2015a): How can alcohol production be improved in carboxydophilic *Clostridia*? In *Process Biochemistry* 50 (7), 1047–1055. doi: 10.1016/j.procbio.2015.03.019.
- Ramió-Pujol, Sara; Ganigué, Ramon; Bañeras, Lluís; Colprim, Jesús (2015b): Incubation at 25 °C prevents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7. In *Bioresource technology* 192, 296–303. doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.077.
- Riegler, Peter; Bieringer, Emmeran; Chrusciel, Thomas; Stärz, Moritz; Löwe, Hannes; Weuster-Botz, Dirk (2019a): Continuous conversion of CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> with *Clostridium acetivum* in biofilm reactors. In *Bioresource technology* 291, p. 121760. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121760.
- Riegler, Peter; Chrusciel, Thomas; Mayer, Alexander; Doll, Kathrin; Weuster-Botz, Dirk (2019b): Reversible retrofitting of a stirred-tank bioreactor for gas-lift operation to perform synthesis gas fermentation studies. In *Biochemical Engineering Journal* 141, 89–101. doi: 10.1016/j.bej.2018.09.021.

- Roll, H. (1994): Vergasung von grob gemahlenem Schilfgras (*Miscanthus sinensis giganteus*) im Flugstrom. Karlsruhe: Dissertation Uni Karlsruhe.
- Sander, R. (2015): Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. In *Atmos. Chem. Phys.* 15 (8), 4399–4981. doi: 10.5194/acp-15-4399-2015.
- Saxena, Jyotisna; Tanner, Ralph S. (2012): Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. In *World journal of microbiology & biotechnology* 28 (4), 1553–1561. doi: 10.1007/s11274-011-0959-0.
- Schneider, Jens; Grube, Christian; Herrmann, André; Rönsch, Stefan (2016): Atmospheric entrained-flow gasification of biomass and lignite for decentralized applications. In *Fuel Processing Technology* 152, 72–82. doi: 10.1016/j.fuproc.2016.05.047.
- 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), 809–821. doi: 10.1038/nrmicro3365.
- Seedorf, Henning; Fricke, W. Florian; Veith, Birgit; Brüggemann, Holger; Liesegang, Heiko; Strittmatter, Axel et al. (2008): The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6), 2128–2133. doi: 10.1073/pnas.0711093105.
- Seifritz, C.; Daniel, S. L.; Gössner, A.; Drake, H. L. (1993): Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. In *Journal of bacteriology* 175 (24), 8008–8013. doi: 10.1128/jb.175.24.8008-8013.1993.
- Seifritz, Corinna; Drake, Harold L.; Daniel, Steven L. (2003): Nitrite as an energy-conserving electron sink for the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*. In *Current microbiology* 46 (5), 329–333. doi: 10.1007/s00284-002-3830-6.
- Shen, Shaohuang; Gu, Yang; Chai, Changsheng; Jiang, Weihong; Zhuang, Yingping; Wang, Yonghong (2017): Enhanced alcohol titre and ratio in carbon monoxide-rich off-gas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* through combination of trace metals optimization with variable-temperature cultivation. In *Bioresourcetechnology* 239, 236–243. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.099.
- Siedlecki, M.; Jong, W. de (2011): Biomass gasification as the first hot step in clean syngas production process – gas quality optimization and primary tar reduction measures in a 100 kW thermal input steam–oxygen blown CFB gasifier. In *Biomass and Bioenergy* 35, S40–S62. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.05.033.
- Spliethoff, Hartmut (2010): Power Generation from Solid Fuels. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stark, G. R.; Blaschko, H.; Dawson, C. R.; de Green; Goldberg, R.; Hayaishi, O.; et al. (1965): Ascorbic acid oxidase. In : Boyer PD, Lardy H, Myrback K, editors. The enzymes. 2nd ed., vol. 8. 8<sup>th</sup> ed.: Wiley, 297–311.
- Storhas, Winfried (1994): Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender ; mit 57 Tabellen. Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg (Vieweg Lehrbuch Biotechnologie).
- Suleimenov, O. M.; Krupp, R. E. (1994): Solubility of hydrogen sulfide in pure water and in NaCl solutions, from 20 to 320°C and at saturation pressures. In *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58 (11), 2433–2444. doi: 10.1016/0016-7037(94)90022-1.

- Syldatk, Christoph; Hausmann, Rudolf; Chmiel, Horst (2018): Mikrobielle Prozesse. In Horst Chmiel, Ralf Takors, Dirk Weuster-Botz (Eds.): *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 449–488.
- Takors, Ralf; Kopf, Michael; Mampel, Joerg; Bluemke, Wilfried; Blombach, Bastian; Eikmanns, Bernhard et al. (2018): Using gas mixtures of CO, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as microbial substrates. The do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. In *Microbial biotechnology* 11 (4), 606–625. doi: 10.1111/1751-7915.13270.
- Thauer, R. K.; Jungermann, K.; Decker, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. In *Bacteriological reviews* 41 (1), 100–180.
- Tinôco, Daniel; Borschiver, Suzana; Coutinho, Paulo L.; Freire, Denise M. G. (2021): Technological development of the bio-based 2,3-butanediol process. In *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 15 (2), 357–376. doi: 10.1002/bbb.2173.
- Tjørve, Kathleen M. C.; Tjørve, Even (2017): The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. In *PloS one* 12 (6), e0178691. doi: 10.1371/journal.pone.0178691.
- Tong, Agnes S. F.; Lai, Keith C. K.; Ng, Kelvin T. W.; Tsang, Daniel C. W.; Liu, Tongzhou; Liu, Jess et al. (2007): Renewable Energy Generation by Full-Scale Biomass Gasification System Using Agricultural and Forestal Residues. In *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage.* 11 (3), 177–183. doi: 10.1061/(ASCE)1090-025X(2007)11:3(177).
- 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), 2720–2728. doi: 10.1002/bit.24549.
- Valgepea, Kaspar; Loi, Kim Q.; Behrendorff, James B.; Lemgruber, Renato de S.P.; Plan, Manuel; Hodson, Mark P. et al. (2017a): Arginine deiminase pathway provides ATP and boosts growth of the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum*. In *Metabolic engineering* 41, 202–211. doi: 10.1016/j.ymben.2017.04.007.
- Valgepea, Kaspar; Souza Pinto Lemgruber, Renato de; Abdalla, Tanus; Binos, Steve; Takemori, Nobuaki; Takemori, Ayako et al. (2018): H<sub>2</sub> drives metabolic rearrangements in gas-fermenting *Clostridium autoethanogenum*. In *Biotechnology for biofuels* 11, p. 55. doi: 10.1186/s13068-018-1052-9.
- Valgepea, Kaspar; Souza Pinto Lemgruber, Renato de; Meaghan, Kieran; Palfreyman, Robin William; Abdalla, Tanus; Heijstra, Björn Daniel et al. (2017b): Maintenance of ATP Homeostasis Triggers Metabolic Shifts in Gas-Fermenting Acetogens. In *Cell systems* 4 (5), 505–515.e5. doi: 10.1016/j.cels.2017.04.008.
- Vanoni, M. A.; Matthews, R. G. (1984): Kinetic isotope effects on the oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by the flavoprotein methyl-enetetrahydrofolate reductase. In *Biochemistry* 23 (22), 5272–5279. doi: 10.1021/bi00317a027.
- Vees, Charlotte Anne; Neuendorf, Christian Simon; Pflügl, Stefan (2020): Towards continuous industrial bioprocessing with solventogenic and acetogenic *Clostridia*: challenges, progress and perspectives. In *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 47 (9-10), 753–787. doi: 10.1007/s10295-020-02296-2.
- Vishwajeet; Pawlak-Kruczek, Halina; Baranowski, Marcin; Czerep, Michał; Chorążyczewski, Artur; Krochmalny, Krystian et al. (2022): Entrained Flow

- Plasma Gasification of Sewage Sludge—Proof-of-Concept and Fate of Inorganics. In *Energies* 15 (5), p. 1948. doi: 10.3390/en15051948.
- Weuster-Botz, Dirk (2022): Process Engineering Aspects for the Microbial Conversion of C1 Gases. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 180, 33–56. doi: 10.1007/10\_2021\_172.
- Weuster-Botz, Dirk; Takors, Ralf (2018): Wachstumskinetik. In Horst Chmiel, Ralf Takors, Dirk Weuster-Botz (Eds.): *Bioprozesstechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 45–70.
- Wood, H. (1986): The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. In *FEMS microbiology letters* 39 (4), 345–362. doi: 10.1016/0378-1097(86)90022-4.
- Xu, Deshun; Lewis, Randy S. (2012): Syngas fermentation to biofuels: Effects of ammonia impurity in raw syngas on hydrogenase activity. In *Biomass and Bioenergy* 45, 303–310. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.06.022.
- Xu, Deshun; Tree, Douglas R.; Lewis, Randy S. (2011): The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels. In *Biomass and Bioenergy* 35 (7), 2690–2696. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.03.005.
- Yasugi, Mayo; Otsuka, Keisuke; Miyake, Masami (2016): Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239. In *Microbiology and immunology* 60 (10), 657–668. doi: 10.1111/1348-0421.12437.
- Youssef, Ahmed (2010): Fluid Dynamics And Scale-Up Of Bubble Columns With Internals. St. Louis, MO, All Theses and Dissertations (ETDs). 393.: Washington University in St. Louis.
- Zhang, Kai; Chang, Jian; Guan, Yanjun; Chen, Honggang; Yang, Yongping; Jiang, Jianchun (2013): Lignocellulosic biomass gasification technology in China. In *Renewable Energy* 49, 175–184. doi: 10.1016/j.renene.2012.01.037.

## 9. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
abs	absolut
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>
AD	Außendurchmesser
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
BTM	Biotrockenmassekonzentration
<i>C. autoethanogenum</i>	<i>Clostridium autoethanogenum</i>
<i>C. carboxidivorans</i>	<i>Clostridium carboxidivorans</i>
<i>C. ljungdahlii</i>	<i>Clostridium ljungdahlii</i>
<i>C. magnum</i>	<i>Clostridium magnum</i>
<i>C. ragsdalei</i>	<i>Clostridium ragsdalei</i>
<i>C. thermoaceticum</i>	<i>Clostridium thermoaceticum</i> (wurde umbenannt in <i>Moorella thermoacetica</i> )
CH <sub>4</sub>	Methan
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	CO-Enzym A
CoFeSP	Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein
CSTR	Kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (engl. <i>continuous stirred-tank reactor</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Ech	Energiekonservierende Hydrogenase
e <sup>-</sup>	Elektron
Fd/Fd <sup>2-</sup>	Ferredoxin (oxidierte Form/reduzierte Form)
GC	Gaschromatographie
[H]	Reduktionsäquivalent
H <sup>+</sup>	Proton
HCN	Cyanwasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
HEPA	Sterilfilter (engl. <i>High efficiency particulate arrestance filter</i> )
HNO <sub>2</sub>	Salpetrige Säure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High performance liquid chromatography</i> )
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
ID	Innendurchmesser
KLF	Kleinlaborfermenter
L	Länge
L-Cys-HCl	L-Cystein Hydrochlorid
M	Molarität in mol L <sup>-1</sup>
max	maximal
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natriumsalz
MFC	Massendurchflussregler
MFM	Massendurchflussmesser
<i>M. thermoacetica</i>	<i>Moorella thermoacetica</i> (umbenannt von <i>Clostridium thermoaceticum</i> )
μGC	Mikrogaschromatographie
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinadenindinukleotid (oxidierte Form/reduzierte Form)
Nfn	Elektronentransferierende Transhydrogenase
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NO <sub>x</sub>	Sammelbegriff für verschiedene Stickoxide
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
NO	Stickstoffmonoxid

---

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Distickstofftrioxid
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Distickstofftetroxid
N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Distickstoffpentoxid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
Pd	Palladium
P <sub>i</sub>	Monophosphat
pH	Maß für sauren oder basischen Charakter (lat. <i>potentia hydrogenii</i> )
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PPG	Polypropylenglykol
RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i> )
Rnf	Ferredoxin:NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase
<i>R. rubrum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>stirred-tank reactor</i> )
TAA	Thioacetamid
THF	Tetrahydrofolat
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
YE	Hefeextrakt (engl. <i>yeast extract</i> )

---

Symbol	Beschreibung	Einheit
$a$	Spezifische Oberfläche der Gasblasen	$m^{-1}$
$a$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	$g L^{-1}$
$b$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	-
$c$	Parameter zur Optimierung über nicht-lineare Regression	$h^{-1}$
$c_g^*$	Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigphase	$g L^{-1}$
$c_g$	Gelöstkonzentration in der Kernströmung der Flüssigphase	$g L^{-1}$
$c_i$	Konzentration der Komponente i	$g L^{-1}$
$c_i^*$	Gleichgewichtskonzentration der Komponente i	$g L^{-1}$
$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf	$g L^{-1}$
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf	$g L^{-1}$
$c_{i,approx.}(t)$	Durch Regression berechnete zeitliche Konzentration	$g L^{-1}$
$c_S$	Substratkonzentration	$g L^{-1}$
$c_X$	Biomassekonzentration	$g L^{-1}$
$c_{X,0}$	Anfangsbiomassekonzentration	$g L^{-1}$
$c_{x,approx.}(t)$	Durch Regression berechnete zeitliche Änderungsrate	$g L^{-1} h^{-1}$
$C_{Wiederfindung}$	Kohlenstoffwiederfindung	%
$\delta_i$	Dicke der Grenzschicht	m
$D$	Durchflussrate	$h^{-1}$
$D_{opt}$	Optimale Durchflussrate	$h^{-1}$
$D_{Bleed}$	Durchflussrate des Verluststroms ( <i>bleed</i> )	$h^{-1}$
$D_{ij}$	Diffusionskoeffizient der Komponente i in Komponente j	$m^2 s^{-1}$
$f(t)$	Gompertz-Funktion zur nicht-linearen Regression	$g L^{-1}$
$f'(t)$	Ableitung der Gompertz-Funktion nach der Zeit	$g L^{-1} h^{-1}$
$g$	Erdbeschleunigung	$m s^{-2}$
$G_{f,i}$	Gaskonversionsfaktor der Komponente i	-
$h$	Höhe der Flüssigkeitssäule	m
$He_i(T)$	Temperaturabhängige Henry-Konstante der Komponente i	$g L^{-1} bar^{-1}$
$h_{i,Produkt}$	Kohlenstoff in Komponente i im Produkt	-
$h_{i,Substrat}$	Kohlenstoff in Komponente i im Substrat	-

Symbol	Beschreibung	Einheit
$k_i$	Stoffübergangskoeffizient	$\text{m s}^{-1}$
$k_l$	Flüssigkeitiger Stoffübergangskoeffizient	$\text{m s}^{-1}$
$K_s$	Halbsättigungskonzentration	$\text{g L}^{-1}$
$K_I$	Inhibierungskonstante	$\text{g L}^{-1}$
$MGK$	Mischgaskonversionsfaktor	-
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}$	Maximale spezifische Wachstumsrate	$\text{h}^{-1}$
$n_i$	Aufgenommene Stoffmenge der Komponente i	mol
$n_{i,Produkt}$	Produktkonzentration der Komponente i	mol
$n_{i,Substrat}$	Substratkonzentration der Komponente i	mol
$p$	Gesamtdruck	bar
$p_0$	Umgebungsdruck	bar
$p_i$	Partialdruck der Komponente i	bar
$p_i^*$	Gleichgewichtspartialdruck der Komponente i	bar
$\rho$	Dichte	$\text{kg m}^{-3}$
$Q_{i,approx.}(t)$	Durch Regression berechnete zeitliche Änderungsrate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{i,approx.}(t)$	Ableitung der Gompertz-Funktion nach der Zeit	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$Q_S$	Volumetrische Substrataufnahmerate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_S$	Spezifische Substrataufnahmerate	$\text{h}^{-1}$
$Q_P$	Volumetrische Produktbildungsrate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_P$	Spezifische Produktbildungsrate	$\text{h}^{-1}$
$r_{gas}$	Gasaufnahmerate	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$r_i$	Reaktionsrate der Komponente i	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$RZA$	Raum-Zeit-Ausbeute	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$t$	Zeit	h
$\Delta t$	Zeitintervall für die numerische Integration	h
$T$	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$
$\tau$	Hydraulische Verweilzeit	h
$\dot{V}_{aus}$	Zulaufvolumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{ein}$	Ablaufvolumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{flüssig}$	Flüssigkeitsvolumenstrom	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_i$	Volumenstrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$\dot{V}_{i,0}$	Gaszustrom der Komponente i	$\text{L h}^{-1}$
$V_M$	Molares Volumen	$\text{L mol}^{-1}$
$\dot{V}_{N_2}$	Volumenstrom des Gases bezogen auf Stickstoff	$\text{L h}^{-1}$

<b>Symbol</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Einheit</b>
$V_R$	Reaktionsvolumen	L
$y_i$	Gasphasenanteil der Komponente i	mol mol <sup>-1</sup>
$Y_{A/S}$	Alkohol-zu-Säure-Verhältnis	g g <sup>-1</sup>
$Y_{i/j}$	Ausbeutekoeffizient der Komponente i bezogen auf j	g g <sup>-1</sup>

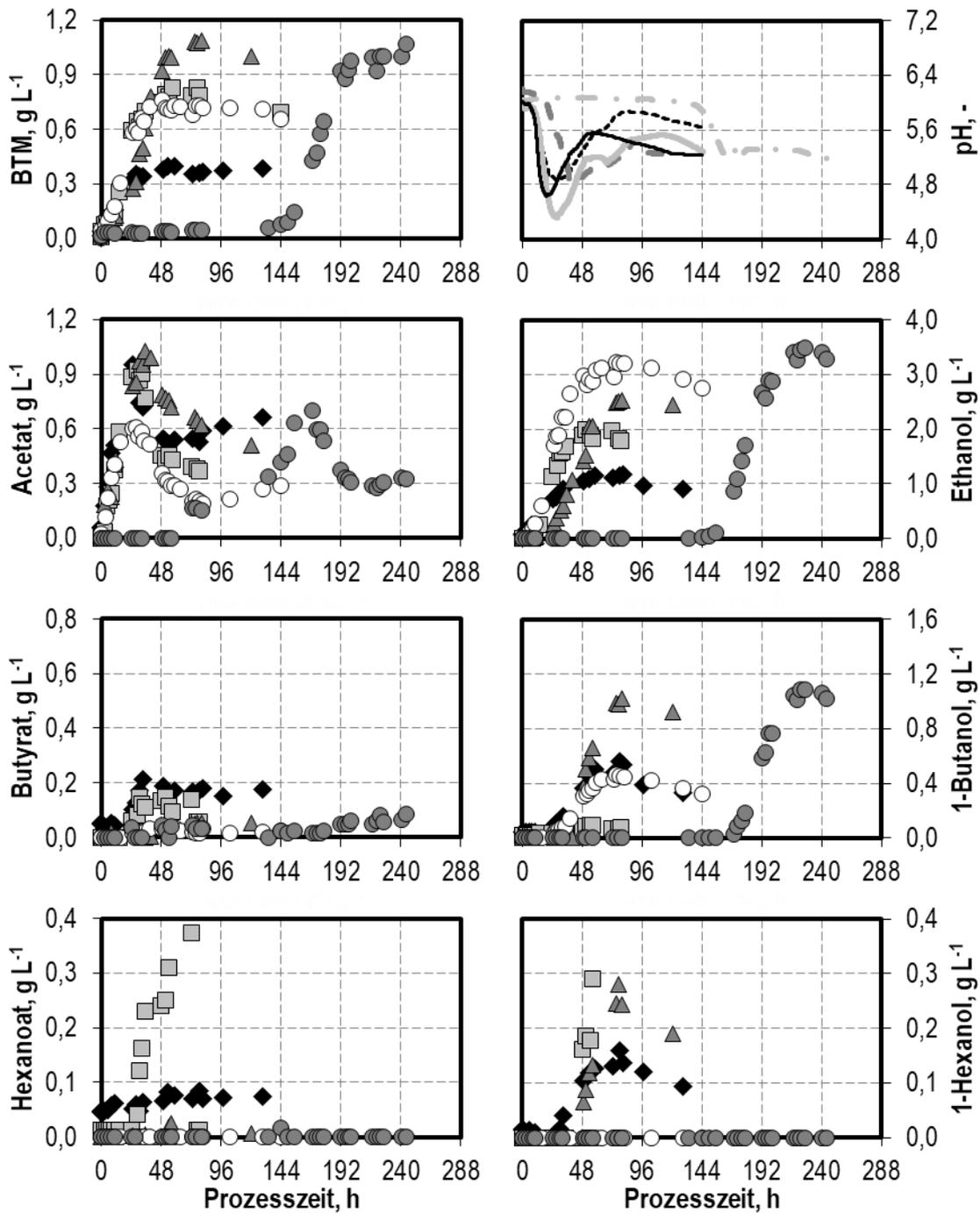
## 10. Anhang

### 10.1. Inhibierungsstudien mit *C. carboxidivorans* mit Zugabe von 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S mit Prozesszeit bis 244 h

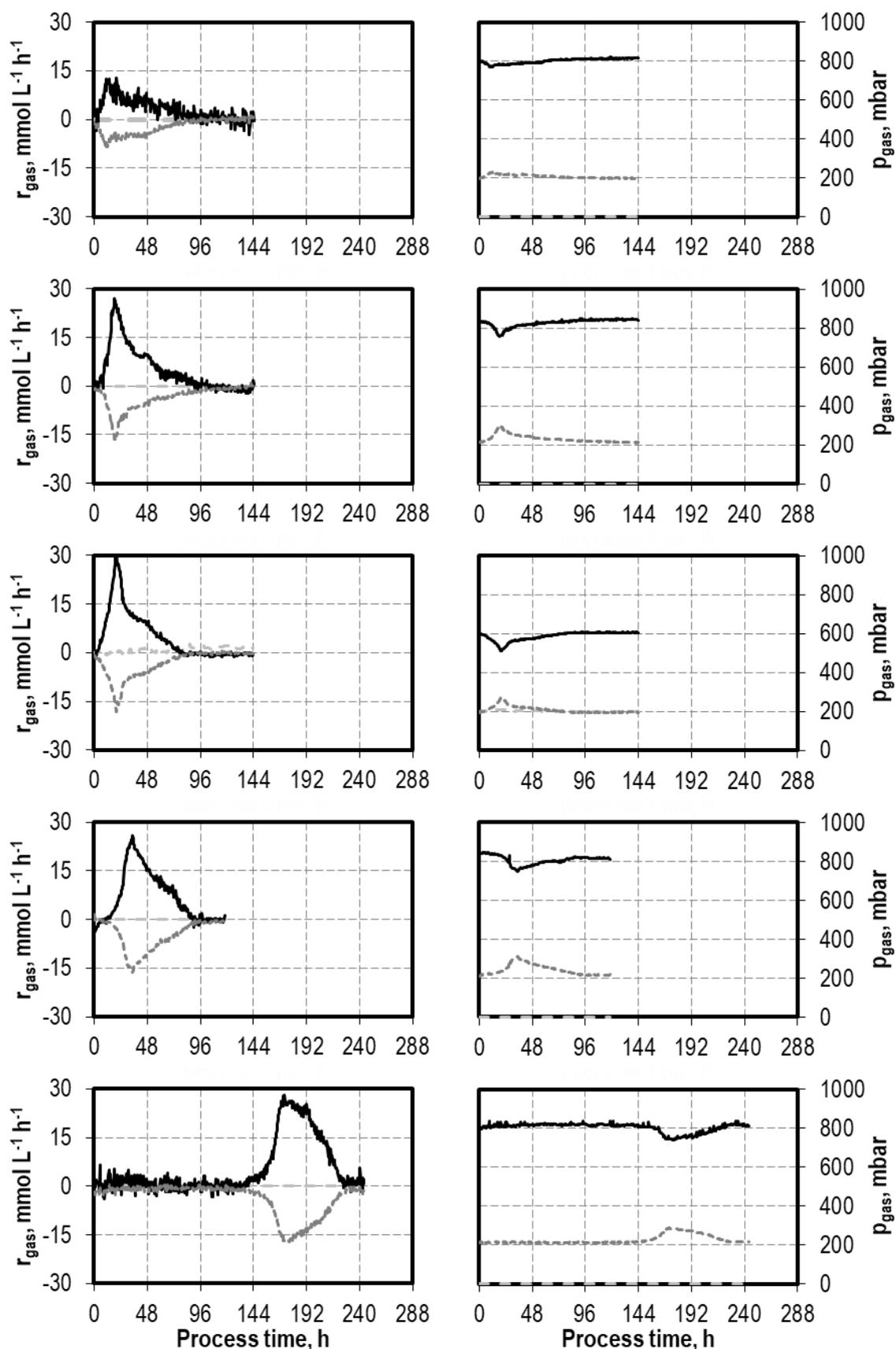
Der in Kapitel 5.1.3 beschriebene Satzprozess mit *C. carboxidivorans* mit Zugabe von 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S in Form von Thioacetamid wurde anders als die übrigen Satzprozesse für eine Prozesszeit von 244 h betrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10-1 und Abbildung 10-2 dargestellt und mit den übrigen Prozessen mit Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>S-Konzentrationen gegenübergestellt.

Wachstum und Produktbildung von *C. carboxidivorans* wurden bei Zugabe von 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S in einer ausgeprägten Verzögerungsphase des Wachstums um ca. 133 h verzögert. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden lediglich 0,34 g L<sup>-1</sup> Acetat produziert. Nach 144 h Prozesszeit begannen deutliche Zunahmen von Biotrockenmasse- und Ethanolkonzentration. Nach 169 h begann ein starker Anstieg der 1-Butanolkonzentration. Maximal wurden jeweils 1,07 g L<sup>-1</sup> BTM, 3,49 g L<sup>-1</sup> Ethanol und 1,09 g L<sup>-1</sup> 1-Butanol gebildet. Die maximale Biotrockenmassekonzentration war ebenso hoch wie im Satzprozess mit 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S und die maximalen Konzentrationen von Ethanol und 1-Butanol wurden somit gegenüber den Prozessen mit 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (8 % höher) und 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (10 % höher) gesteigert. Eine Bildung der Produkte Hexanoat und 1-Hexanol wurde hingegen im Satzprozess mit 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S während der gesamten Prozesszeit nicht quantifiziert.

Die maximale CO-Aufnahmerate im Satzprozess mit 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S wurde mit 27,7 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> nach 176 h erreicht. Diese maximale CO-Aufnahme ist gegenüber dem Satzprozess mit 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S von 30,8 mmol CO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> um 10 % geringer. Trotzdem war die insgesamt aufgenommene Menge von CO mit 1287,8 mmol CO im Satzprozess mit 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S im Gegensatz zum Satzprozess mit 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S mit 822,0 mmol CO um 57 % höher (Tabelle 5-3).



**Abbildung 10-1** Autotrophe Satzprozesse mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begastem Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab im Referenzsatzprozess (schwarze Raute  $\blacklozenge$ ) und mit Zugabe definierter Konzentrationen von  $+0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (hellgraue Quadrate  $\square$ ),  $+0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (dunkelgraue Dreiecke  $\blacktriangle$ ),  $+1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (weiße Kreise  $\circ$ ) und  $+2,0 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$  (dunkelgraue Kreise  $\bullet$ ) bei  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_{\text{initial}} = \text{pH } 6,0$  (ungeregelt),  $F_{\text{gas}} = 5,0 \text{ L h}^{-1}$ ,  $p_{\text{abs}} = 1013 \text{ mbar}$ ,  $n = 1200 \text{ min}^{-1}$  ( $P V^{-1} = 15,1 \text{ W L}^{-1}$ ),  $p_{\text{CO}} = 800 \text{ mbar}$ ,  $p_{\text{CO}_2} = 200 \text{ mbar}$ . Abweichende Gasmischung im Satzprozess mit  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ :  $600 \text{ mbar CO}$ ,  $200 \text{ mbar CO}_2$ ,  $200 \text{ mbar H}_2$ . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von vier unabhängigen Referenzsatzprozessen. Andere Satzprozesse wurden jeweils einmal durchgeführt.



**Abbildung 10-2** Gasaufnahme- und Gaspartialdruckverläufe der Synthesegaskomponenten CO (schwarze durchgezogene Linie) und CO<sub>2</sub> (dunkelgrau gepunktete Linie) bei autotrophen Satzprozessen mit *C. carboxidivorans* im kontinuierlich begasteten Rührkesselreaktor im Referenzsatzprozess (A und B) und mit Zugabe definierter Spurenverunreinigungen

+ 0,1 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (C und D), + 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (E und F), + 1,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (G und H) und + 2,0 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S (I und J) bei den Prozessbedingungen: T = 37 °C, F<sub>gas</sub> = 5,0 L h<sup>-1</sup>, p<sub>abs</sub> = 1013 mbar, n = 1200 min<sup>-1</sup> (P V<sup>-1</sup> = 15,1 W L<sup>-1</sup>), pH<sub>initial</sub> = pH 6,0 (ungeregelt), p<sub>CO</sub> = 800 mbar, p<sub>CO2</sub> = 200 mbar. Abweichende Gaszusammensetzung bei + 0,5 g L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S: p<sub>CO</sub> = 600 mbar, p<sub>CO2</sub> = 200 mbar, p<sub>H2</sub> = 200 mbar.

## 10.2. Verwendete Medien und Vorratslösungen

**Tabelle 10-1** Zusammensetzung des Mediums nach Doll et al. (2018) mit den Vorratslösungen pro 1 Liter Medium

Komponente	Menge pro Liter Medium
Mineralstofflösung	30 mL L <sup>-1</sup>
Ca-Lösung	60 mL L <sup>-1</sup>
Mg-Lösung	60 mL L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	10 mL L <sup>-1</sup>
Vitaminlösung	10 mL L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	1,0 g L <sup>-1</sup>
Cys-HCl <sup>a)</sup>	0,4 g L <sup>-1</sup>
MES <sup>b)</sup>	15 g L <sup>-1</sup>

<sup>a)</sup> Für alle Prozesse im Rührkesselreaktor und für Vorkulturen mit *C. autoethanogenum*

<sup>b)</sup> Nur für Medium in Anaerobflaschen für Vorkulturen und autotrophe Satzprozesse in geschüttelten Anaerobflaschen

**Tabelle 10-2** Zusammensetzung der Mineralstofflösung des Mediums nach Doll et al. (2018)

Komponente	Summenformel	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	100
Natriumchlorid	NaCl	80
Kaliumchlorid	KCl	10
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10

**Tabelle 10-3** Zusammensetzung der Vitaminlösung des Mediums nach Doll et al. (2018)

Komponente	Summenformel	Konzentration, mg L <sup>-1</sup>
Pyridoxin-Hydrochlorid	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl	0,0121
Thiamin-Hydrochlorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl	0,0056
Riboflavin	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0,0050
Ca-Pantothenat	CaC <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>5</sub>	0,0050
Thioctsäure	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,0050
p-Aminobenzoesäure	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	0,0050
Nikotinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,0050
Vitamin B12	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	0,0050
D-Biotin	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,0020
Folsäure	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	0,0020
Natrium-2-Mercaptoethansulfonat	NaC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	0,0233

**Tabelle 10-4** Zusammensetzung der Spurenelementlösung des Mediums nach Doll et al. (2018)

Komponente	Summenformel	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Nitritotriessigsäure	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub>	2,000
Mangansulfat-Monohydrat	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,119
Ammoniumeisen(II)sulfat-Hexahydrat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,104
Kobaltchlorid-Hexahydrat	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,366
Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,356
Kupferchlorid-Dihydrat	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,025
Nickelchlorid-Hexahydrat	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,037
Natriummolybdat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,023
Natriumselenat	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,020
Natriumwolframat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,022

**Tabelle 10-5** Verwendete Vorratslösungen

Vorratslösung	Summenformel	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Ca-Lösung	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,65
Mg-Lösung	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20,47
Glucoselösung	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	250
Xyloeselösung	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	250
Cys-HCl-Lösung	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S · HCl	40

**Tabelle 10-6** Zusammensetzung von PBS-Puffer

Komponente	Summenformel	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	NaCl	8,0
Kaliumchlorid	KCl	0,2
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27

### 10.3. Verwendete Chemikalien und Materialien

**Tabelle 10-7** Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Komponente	Hersteller	Artikelnummer
p-Aminobenzoesäure	Merck	822312
Ammoniumchlorid	Carl Roth	5470.2
Ammoniumeisen(II)sulfat-Hexahydrat	Merck	103792
D-Biotin	Carl Roth	3822.2
(2R,3R)-(-)-2,3-Butandiol	Merck	237639
1-Butanol	Carl Roth	7171
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	102382
Calcium-D-(+)-Pantothenat	Carl Roth	3812.1
Cystein-Hydrochlorid	Carl Roth	3468.3
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	106586
Ethanol	Carl Roth	5054.1
Folsäure	Carl Roth	T 912.1
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Carl Roth	6887.5
Glycerin	Carl Roth	3783.4
Hefeextrakt – Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson and Company	212750
1-Hexanol	Carl Roth	3847.1
Hexansäure	Carl Roth	8799.1
Kaliumchlorid	Carl Roth	6781.2
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth	3904.1
Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat	Carl Roth	7095.1
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	Merck	102733
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth	T888.3
Mangan(II)sulfat-Monohydrat	Merck	105941

---

Komponente	Hersteller	Artikelnummer
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth	6779.2
Natriumbutyrat	Merck	817500
Natriumchlorid	Carl Roth	P029.5
Natriumformiat	Sigma-Aldrich	715391
Natriumhydroxid	Carl Roth	P031.2
Natrium-2-Mercaptoethansulfonat	Merck	810595
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck	106521
Natriumnitrat	Carl Roth	A136.2
Natriumnitrit	Merck	106549
Natriumselenat	Sigma-Aldrich	S8295-10G
Natriumwolframat-Dihydrat	Sigma-Aldrich	1324421
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	Merck	106717
Nikotinsäure	Merck	818714
Nitrilotriessigsäure	Merck	108416
Polypropylenglykol (PPG)	Sigma-Aldrich	202339
Pyridoxin-Hydrochlorid	Carl Roth	T914.2
Riboflavin	Sigma-Aldrich	R4500
Schwefelsäure	neoLab	LC-7099.2G
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	T4625
Thioacetamid	Sigma-Aldrich	163678
Thioctsäure ( $\alpha$ -Liponsäure)	Carl Roth	6229.1
Vitamin B12	Carl Roth	T915.1
D-(+)-Xylose	neoLab	1971GR500
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck	108883

---

**Tabelle 10-8** Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Gase

Gas	Hersteller	Artikelnummer
<u>Flaschengase in 50 L Flaschen</u>		
ALPHAGAZ 1 Argon	AirLiquide	P0021L50R2A001
ALPHAGAZ 1 Helium	AirLiquide	P0251L50R2A001
ALPHAGAZ 1 Stickstoff	AirLiquide	P0271L50R2A001
ALPHAGAZ 1 Wasserstoff	AirLiquide	P0231L50R3A001
ARCAL F5 Formiergas	AirLiquide	I2513L50R2A001
Kohlendioxid N35	AirLiquide	P1724L50R0A001
Kohlenmonoxid N37	AirLiquide	P0752L40R2A001
<u>Kalibriergase</u>		
Ammoniak NH <sub>3</sub>		
100 ppm in Luft	All-in-Gas	134005
1000 ppm in N <sub>2</sub>	All-in-Gas	160015
5000 ppm in N <sub>2</sub>	All-in-Gas	160024
Schwefelwasserstoff H <sub>2</sub> S		
100 ppm in N <sub>2</sub>	All-in-Gas	2860017
250 ppm in N <sub>2</sub>	All-in-Gas	2860019
500 ppm in N <sub>2</sub>	All-in-Gas	2860030

**Tabelle 10-9** Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
Abgasfilter	Acro 50, 0,2 µm, PTFE	Pall Corporation
Butylgummistopfen	GL 45	Glasgerätebau Ochs
Einwegkanülen	0,6 x 30 mm, 0,9 x 70 mm	B.Braun B.Braun
Einwegküvetten	Küvetten, halbmikro	Ratiolab
Einwegpipettenspitzen	200 µL, 1000 µL, 10 mL	Gilson, Brand
Einwegspritzen	1, 3, 5, 10, 20, 50 mL	B.Braun
Hohlfaserfiltermodule	CFP-4-E-2U	Cytiva
Hungate-Type Kulturröhrchen	16 x 125 mm, mit Butylgummiseptum und Lochkappe	Dunn Labortechnik
HPLC-Rollrandfläschchen	ND11 mit Aluminiumbördelkappe und Septum, 1,5 mL	VWR
Lochkappen für Laborglasflaschen	GL 45	Glasgerätebau Ochs
Schnellkupplungen, Kunststoff	Polypropylen, 1/4" und 1/8" mit Schlauchtülle 3,2 und 6,4 mm	Colder Products Company
Schnellkupplungen, Metall	NW 5, Messing vernickelt und Edelstahl mit Schlauchtülle 3,2 und 6,4 mm	Riegler
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil RC-20/15 MS	Macherey-Nagel
Spritzenvorsatzfilter, steril	Minisart High Flow, PES, 28 mm, 0,22 µm	Sartorius
Zentrifugenröhrchen	15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One
Zugasfilter	Acro 50, 0,2 µm, Emflon II	Pall Corporation

## 10.4. Verwendete Geräte und Software

**Tabelle 10-10** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Explorer E121245 (0,1 mg – 210 g)	Ohaus
Analysenwaage	Explorer E1N213 (5 g – 32 kg)	Ohaus
Analysenwaage	Scout Pro 4000 g	Ohaus
CO-Warngerät	ToxiRAE 3 CO 2000	RAE Systems
Dampfautoklav	H+P 500 EC-Z	H+P Labortechnik
Dampfautoklav	Systec VX-150	Systec
Gasleckdetektor	GLD 100	COY Laboratory Products
Heizpilz	WiseTherm WHM 12015	witeg
Magnetrührer	Variomag 90750	2mag
Magnetrührer	D-6010	neoLab
pH-Elektrode	BlueLine 14pH	Schott
pH-Elektrode	HI 1330 B	HANNA-Instruments
pH-Meter	Lab 850	Schott
pH-Meter	PCE-PHD2	PCE-Group
Schüttelinkubator	WiseCube WIS-20	witeg
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich
Tischzentrifuge	Mirko 20	Hettich
Trockenschrank	Serie E 28 L	Binder
Pipetten	Transferpette S	Brand
Photometer	Spectronic Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
Vortex-Mixer	Reax top	Heidolph
Schlauchpumpe	501U	Watson Marlow
Schlauchpumpe	Reglo digital	Ismatec
Schwingmühle	MM200	Retsch

**Tabelle 10-11** Rührkesselreaktor im 1 L-Maßstab KLF2000 (BioEngineering) mit Peripherie

Gerät	Typ	Hersteller
Laborrührkesselreaktor	KLF2000, Nennvolu- men 2,4 L	BioEngineering
Mikrofiltrationsmembran (Hohlfa- sermodul)	CFP-4-E-2U	Cytiva
pH-Elektrode	405-DPAS-SC- K8S/120	
Redox-Elektrode	Pt4805-DPAS-SC- K8S/120	
Thermische Massendurchfluss- messer für Reingase	F-101D-RAD-33-V	Bronkhorst
Thermische Massendurchfluss- messer für korrosive Gase	F-111B-500-RGD-33-V	Bronkhorst
Thermische Massendurchflussreg- ler für Reingase	P-702CV-6K0R-RAD- 33-V	Bronkhorst
Thermische Massendurchflussreg- ler für korrosive Gase	F-201CV-500-RGD-33- V	Bronkhorst
Software Reaktorsteuerung	BioSCADA Lab	BioEngineering
Software Massendurchflussmesser und -regler	FlowDDE, FlowPlot, FlowView	Bronkhorst

**Tabelle 10-12** Mikrogaschromatographiesystem zur Quantifizierung von Gaskomponenten

Gerät	Typ	Hersteller
Mikrogaschromato- graphiesystem	µGC 490	Agilent
Trennsäule 1	Molsieb MS5A HI-BF, L = 10 m, ID = 0,25 mm (181), Trägergas Argon	Agilent
Trennsäule 2	PoraPlot PPQ HI-BF, L = 10 m, ID = 0,25 mm (283), Trägergas Helium	Agilent
Trennsäule 3	CP-Sil 5 CB HI-BF, L = 4m, ID = 0,15 mm (386), Trägergas Helium	Agilent
Steuerungssoftware für µGC	OpenLab CDS EZ Chrom	Agilent

**Tabelle 10-13** Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesystem (HPLC) zur Quantifizierung von Produkten

Gerät	Typ	Hersteller
HPLC-Kompaktsystem	LC2030-C mit integriertem UV-Vis-Detektor	Shimadzu
Automatische Hinterkolbenspülung	Automatic Rinsing Unit Kit für LC-20AD	Shimadzu
Brechungsindexdetektor	RID-20A	Shimadzu
Doppelkolbenpumpe	LC-20AD	Shimadzu
Probengeber	SIL-20ACHT Autosampler mit Direktinjektionsprinzip und Probenkühlung bis 4 °C	Shimadzu
Säulenofen	CTO-20AC mit Umluftfunktion bis 85 °C und Lecksensor	Shimadzu
Schaltventil für Niederdruckgradienten	Low Pressure Gradient Unit für LC-20AD	Shimadzu
Statische Mischkammer	MIXER SUS 20A, HP Version	Shimadzu
Vakuumentgaser	DGU-20 A5R Online Degasser, 5-Kanal für LC-20AD	Shimadzu
Software	LabSolutions Single LC	Shimadzu

**Tabelle 10-14** Anaerobarbeitsbank mit Peripherie

Gerät	Typ	Hersteller
Flexible Anaerobarbeitsbank aus Polyvinylchloridfolie	Typ A mit 2 Schleuskammern	Coy Laboratory Products, vertrieben durch Toepffer Lab Systems
Gasanalysator	Gas Analyzer für H <sub>2</sub> und O <sub>2</sub>	Coy Laboratory Products
HEPA Filter	Scout Pro 4000 g	Coy Laboratory Products
Lüfterboxen mit Trockenmittel und Palladiumkatalysator	StakPak mit Catalyst 180 gm und Dessicant 180 gm	Coy Laboratory Products
Trockenschrank zur Regeneration des Katalysators	UNB100	Memmert
Vakuumpumpe	G608NGX	Coy Laboratory Products

**Tabelle 10-15** Rohrreaktor mit Palladiumkatalysator und Silicageltrockenmittel zur Sauerstoffreduktion in biogenen Synthesegasen

Gerät	Typ	Lieferant	Artikelnummer
Doppelnippel	Doppelnippel G 1/4"-G 1/4", 1.4571	Landefeld	DN 1414 ES
Edelstahlrohr	Edelstahlrohr, nahtlos, 12,0 x 1,0 mm, L = 1 m, 1.4571	Landefeld	HR 12X1 ES6A
Edelstahlsieb	Edelstahl-Schmutzfänger G 1/4", PN 40, Sieb 1.4401, Gehäuse 1.4408	Landefeld	SF 14 ES-F
Reduzierverschraubung	Reduzierverschraubung 12 L (M18x1,5)-6 L (M12x1,5), 1.4571	Landefeld	GR 12/6 L ES
Rückschlagventil	Hydraulik-Rückschlagventil 6 L (M12x1,5), 1.4571	Landefeld	RHD 6 L ES
Schlauch	Polyurethan-Schlauch 6 x 4 mm, schwarz	Landefeld	PUN 6X4 SCHWARZ
Schneidringverschraubung	Gerade Schneidringverschr. G 1/4"-12 L (M18x1,5), 1.4571	Landefeld	GE 12 LR 1/4 ES
Schneidringverschraubung	Gerade Schneidringverschr. G 1/4"-6 L (M12x1,5), 1.4571	Landefeld	GE 6 LR 1/4 ES
Schnellkupplungsdosen	Kupplungsdose (NW5) 6x4mm Schlauch, 1.4404	Landefeld	KDK 4 NWS ES4A
Schnellkupplungsstecker	Kupplungsstecker (NW5) 6x4mm Schlauch, 1.4404	Landefeld	KSK 4 NWS ES4A
Verstärkungshülsen	Verstärkungshülse für Rohr 12x10,0 mm, 1.4571	Landefeld	VSH 12X10 ES
Trockenmittel	Silica Gel Orange 2 - 5 mm, mit Indikator, Perlform	Carl Roth	P077.1
Palladium Katalysator	Actisorb O3 (G-133 C), Pd-Katalysator auf Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Träger, 3 – 5 mm Kugeln	C&CS (Hersteller: Clariant)	1.2.133.1