

Optimierung der biologischen
Lösungsmittelproduktion mit *C. acetobutylicum*
in einem mehrstufigen kontinuierlichen
Bioreaktorsystem

Optimierung der biologischen Lösungsmittelproduktion mit *C. acetobutylicum* in einem mehrstufigen kontinuierlichen Bioreaktorsystem

vorgelegt von
Dipl.-Ing.
Sergej Trippel

an der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
-Dr.-Ing-
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

- Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Lorenz Adrian, Department
Isotopenbiogeochemie/Helmholtz-Zentrum für
Umweltforschung GmbH, Leipzig
- Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Neubauer, Fachgebiet
Bioverfahrenstechnik/Technische Universität Berlin,
Berlin
- Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Götz, Life Sciences and Technology/
Beuth Hochschule für Technik Berlin, Berlin
- Gutachter: Dr.-Ing. Stefan Junne, Fachgebiet Bioverfahrenstechnik/
Technische Universität Berlin, Berlin

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. April 2021

Berlin 2021

Abstract

Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in a stirred tank cascade resulted in a stable fermentation process lasting over 1,000 hours with constant solvent production. The two phases of the metabolism of *Clostridium acetobutylicum* were spatially separated in the six reactors of the stirred tank cascade. By regulating the pH in the first bioreactor (pH_1) between 5.6 and 4.3 and changing the cascade-related dilution rates from $D = 0.042 \text{ h}^{-1}$ to $D = 0.092 \text{ h}^{-1}$, the fermentation process in the stirred tank cascade was observed, and the data for creating a mathematical model for describing fermentation processes in the stirred tank cascade were generated.

In fermentations at pH_1 4.3, higher cascade-related butanol and solvent concentrations c_{But} and c_{LM} were achieved. For the stirred tank cascade of six bioreactors, an increase in the dilution rate D led to an increase in the butanol and solvent formation rates, q_{But} and q_{LM} . Adding acetate to the medium and returning the fermentation broth from the fourth to the second bioreactor showed a positive effect of the acetate on solvent formation and no advantages of returning the fermentation broth in terms of solvent productivity in the stirred tank cascade.

The highest cascade-related concentrations and formation rates were achieved at pH_1 4.3 h^{-1} and $D = 0.042 \text{ h}^{-1}$ for the first three bioreactors of the stirred tank cascade. The maximum butanol and solvent concentrations were $c_{\text{But}} = 9.7 \text{ g L}^{-1}$ and $c_{\text{LM}} = 13.6 \text{ g L}^{-1}$, and the butanol and solvent formation rates were $q_{\text{But}} = 0.81 \text{ g (L h)}^{-1}$ and $q_{\text{LM}} = 1.14 \text{ g (L h)}^{-1}$ at full substrate consumption.

Parameterizing the mathematical model for simulating the fermentation processes in the stirred tank cascade enabled simulations of fermentation processes with high agreement with the experimental data. The fermentation results confirmed simulation results relating to a positive effect of adding acetates on solvent formation and returning the fermentation broth with a negligible positive effect on solvent formation.

Zusammenfassung

Die kontinuierliche Fermentation von Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) in einer Rührkesselkaskade ergab einen stabilen, mehr als 1000 Stunden andauernden Fermentationsprozess mit konstanter Lösungsmittelproduktion. Die zwei Phasen des Stoffwechsels von *Clostridium acetobutylicum* wurden dabei in den sechs Reaktoren der Rührkesselkaskade räumlich voneinander getrennt. Durch die Regelung unterschiedlicher pH-Werte im ersten Bioreaktor (pH_1) zwischen 5,6 und 4,3 und durch die Änderung der kaskadenbezogenen Verdünnungsraten von $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ wurden Beobachtungen des Fermentationsprozesses in der Rührkesselkaskade durchgeführt und Daten für die Erstellung eines mathematischen Modells für die Beschreibung von Fermentationsprozessen in der Rührkesselkaskade generiert.

In Fermentationen mit pH_1 4,3 wurden höhere kaskadenbezogene Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen c_{But} bzw. c_{LM} erreicht. Bei der Betrachtung der Rührkesselkaskade mit sechs Bioreaktoren führte eine Erhöhung der Verdünnungsrate D zur Steigerung der Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten q_{But} bzw. q_{LM} . Die Zugabe von Acetat in das Medium und die Rückführung der Fermentationsbrühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor zeigten einen positiven Effekt des Acetats auf die Lösungsmittelbildung, aber keine Vorteile der Rückführung in Bezug auf die Lösungsmittelproduktivität in der Rührkesselkaskade.

Die höchsten kaskadenbezogenen Konzentrationen und Bildungsraten wurden bei pH_1 4,3 h^{-1} und $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ bei der Betrachtung der drei ersten Bioreaktoren der Rührkesselkaskade erreicht. Die maximalen Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen betragen c_{But} $9,7 \text{ gL}^{-1}$ bzw. c_{LM} $13,6 \text{ gL}^{-1}$ und die Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten q_{But} $0,81 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bzw. q_{LM} $1,14 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bei vollständigem Substratverbrauch.

Die Parametrisierung des mathematischen Modells für die Simulationen von Fermentationsprozessen in der Rührkesselkaskade ermöglichte entsprechende Simulationen, die hohe Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten aufwiesen. Die Simulationsergebnisse in Bezug auf eine positive Auswirkung der Acetatzugabe auf die Lösungsmittelbildung und eine Rückführung mit einem

vernachlässigbar geringen positiven Effekt auf die Lösungsmittelbildung wurden durch die Fermentationsergebnisse bestätigt.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Zusammenfassung.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	5
Danksagung	9
Abkürzungsverzeichnis	11
Symbole	11
1. Einleitung	14
Geschichte der ABE-Fermentation	14
2. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	16
2.1 Chemische Eigenschaften und Verwendung von Butanol	16
2.1.1 Kommerzielle Nutzung von Butanol.....	17
2.1.2 Butanol als Biotreibstoff.....	17
2.2 Biotechnologische Herstellung von Butanol	19
2.2.1 Stamm Clostridium acetobutylicum.....	19
2.3 Prozessführung der ABE-Fermentation	27
2.3.1 Batch.....	27
2.3.2 Fed-Batch/repeated Fed-Batch	28
2.3.3 Kontinuierliche Fermentationen	30
2.3.4 Kultivierung genetisch veränderter Stämme	35
2.3.5 Ökonomische Effizienz von ABE-Fermentationen.....	35
2.4 Aufbereitungsmethoden.....	39
2.4.1 Flüssig-flüssig-Extraktion.....	40
2.4.2 Pervaporation.....	41
2.4.3 Die Umkehrosmose	41
2.4.4 Gas-Stripping	42
2.4.5 Adsorption.....	43
2.5 Mathematische Modellierung.....	48

2.5.1	Simulation von stationären Zuständen einer Kaskade.....	48
3.	Forschungsfragen und Projektziel.....	52
4.	Materialien und Methoden.....	55
4.1.	Chemikalien.....	55
4.2	Geräte	56
4.3	Software	57
4.4	Medien	57
4.5	Batch-Fermentationen	59
4.6	Kontinuierliche Fermentationen	59
4.6.1	Aufbau der Rührkesselkaskade	60
4.7	Analyse chemischer Komponenten der Proben.....	68
4.7.1	Bestimmung der Trockenmasse	68
4.7.2	Glukosebestimmung.....	69
4.7.3	Bestimmung der Metaboliten	69
4.7.4	Gaschromatographie.....	69
4.7.5	Kalibriergerade	71
4.7.6	Gaschromatographie.....	72
5.	Ergebnisse	73
5.1	Batch-Fermentation	73
5.1.1	Batch-Fermentationen ohne pH-Regelung	73
5.1.2	pH-geregelte Batch-Fermentationen	75
5.2	Kontinuierliche Fermentation	76
5.2.1	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$	78
5.2.2	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$	81
5.2.3	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$	84
5.2.4	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$	87
5.2.5	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung	91
5.2.6	Kontinuierliche Fermentation bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Zugabe des Acetats in den ersten Bioreaktor der Kaskade.....	95

5.2.7	Zusammenfassung des experimentellen Teils	96
5.3	Morphologie der Zellen in später solventogenen Phase	97
6.	Diskussion.....	98
6.1	Kontinuierliche Fermentationen bei pH ₁ 5,6	98
6.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Fermentationen mit D = 0,042 h ⁻¹ und D = 0,092 h ⁻¹ bei pH ₁ 4,3	100
6.2.1	Verringerung der Zahl der Bioreaktoren in der Rührkesselkaskade bei D = 0,042 h ⁻¹ und pH ₁ 4,3.....	102
6.3	Rückführung der Fermentationsbrühe bei D = 0,092 h ⁻¹ und pH ₁ 4,3	103
6.4	Acetatzugabe in den ersten Bioreaktor der Kaskade bei D = 0,092 h ⁻¹ und pH ₁ 4,3.....	104
6.5	Gegenüberstellung der Immobilisierung und der Suspension der Mikroorganismen	105
7.	Schlussfolgerung	107
8.	Ausblick	108
8.1	Erforschung der Auswirkungen definierter Substratgemische und der Buttersäurezugabe.....	108
8.1.1	Auswirkung der Zugabe von Buttersäure auf die ABE-Produktivität 108	
8.1.2	Fermentation mit Glycerol-Glukose-Gemisch als Substrat	109
8.2	Versuche mit Erweiterung/Optimierung der Rührkesselkaskade	109
8.2.1	Fermentation mit einem kombinierten Bioreaktortypensystem....	109
8.2.2	Versuche mit in situ oder integrierten Aufbereitungsmethoden ...	110
9.	Literaturverzeichnis.....	112
10.	Thesen	129
11.	Appendix	130
i.	Medien	130
a.	Minimalmedium (MS-Medium) für Sporulation	130
b.	Clostridium Growth Medium (CGM), (Wiesenborn et al., 1988)	131
c.	Komplexes Medium für die Adaptierung der <i>C.-acetobutylicum</i> - Zellen	132

d.	Komplexes Medium für die kontinuierliche Fermentation der <i>C.-acetobutylicum</i> -Zellen	132
ii.	Parameter und Quellcode des mathematischen Modells	133
a.	In der Simulation verwendete Variablen	133
b.	Programmcode 1 - model8_160111_MATLAB\kinetic_models\biological_model7_kinetic s 134	
a.	Programmcode 2 - model8_160111_MATLAB\parameterfiles\biological_model7_param eters.m	136
iii.	Grafiken der Parameterschätzung des mathematischen Modells.....	139
1.	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$	139
2.	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$	141
3.	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$	142
4.	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$	144
5.	Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung	145
iv.	Veröffentlichung	148
	Modeling Physiological Differences in Cell Populations: Acetone-Butanol- Ethanol (ABE)-Fermentation in a Cascade of Continuous Stirred Tank Reactors	148

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projektes OPTISOLV FKZ: 031A231A des Förderprogramms Era-net EuroTransBio-7 und Bundesministerium für Bildung und Forschung angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Personen für die vielfältig erfahrene Hilfe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Peter Götz von der Beuth Hochschule für Technik Berlin, der meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt hat.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. rer. nat. Peter Neubauer von der Technischen Universität Berlin für seine Hilfe, für die Betreuung seitens der Technischen Universität Berlin, seine Zusage zum und die Teilnahme am Gutachten der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat., Lorenz Adrian, Department Isotopenbiogeochemie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung GmbH, Leipzig für seine Zusage als Vorsitzender des Promotionsausschusses.

Ich möchte Herrn Dr.-Ing. Stefan Junne von der Technischen Universität Berlin für seinen Beitrag im Gebiet Lösungsmittelproduktion mit *C. acetobutylicum* und für seine Hilfe danken. Auch für seine Zusage zum und die Teilnahme am Gutachten der vorliegenden Arbeit danke ich Herrn Dr.-Ing. Stefan Junne.

Für ihre vielfältige Unterstützung und Zusammenarbeit bin ich besonders Frau Dr. Katja Karstens von der Beuth Hochschule für Technik Berlin dankbar. Als wissenschaftliche Mitarbeiterin beim Projekt OPTISOLV hat sie entscheidend zur Realisierung des Projektes beigetragen.

Für die handwerkliche Unterstützung und die Konstruktionsideen sei Herrn Harald Gerullis von der Beuth Hochschule für Technik Berlin gedankt. Durch sein großes Engagement hat Herr Gerullis wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Ich danke den Projektpartnern Herrn Prof. Antonio Marzocchella und Frau Dr. Francesca Raganati von der Universität Neapel Federico II für ihren wesentlichen Beitrag und ihre fachliche Unterstützung.

Ich möchte meinen Dank auch Firma ARGUS Umweltbiotechnologien GmbH aussprechen, denn ihre Mitarbeiter Herr Dr. Horst Niebelschütz und Herr Dipl.-Ing. Richard Görlitz haben an diesem Projekt hilfreich mitgearbeitet.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abkürzungsverzeichnis

Symbole

#Reaktor – Nummer des Bioreaktors in der Rührkesselkaskade

D , [h^{-1}] – kaskadenbezogene Verdünnungsrate

τ , [h] – Verweilzeit

pH_1 – regulierter pH-Wert im ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade

q , [g(Lh)^{-1}] – kaskadenbezogene Aufnahme- bzw. Bildungsrate

q^{Sim} , [g(Lh)^{-1}] – simulierte kaskadenbezogene Aufnahme- bzw. Bildungsrate

q^{R} , [g(Lh)^{-1}] – reaktorbezogene Aufnahme- bzw. Bildungsrate

$q^{\text{R Sim}}$, [g(Lh)^{-1}] – simulierte reaktorbezogene Aufnahme- bzw. Bildungsrate

c , [gL^{-1}] – kaskadenbezogene Konzentration

c^{Sim} , [gL^{-1}] – simulierte kaskadenbezogene Konzentration

c^{R} , [gL^{-1}] – reaktorbezogene Konzentration

$c^{\text{R Sim}}$, [gL^{-1}] – simulierte reaktorbezogene Konzentration

LM – Lösungsmittel

Säure – gesamte Säuren (Essigsäure und Buttersäure)

Glc – Glukose

But – Butanol

c_{Soll} – die tatsächliche Konzentration eines Analyten (GC-Analyse)

c_{Ist} – die gemessene Konzentration eines Analyten (GC-Analyse)

A_{soll} – der Mittelwert der Peakflächen des internen Standards aus der Kalibriergeraden (GC-Analyse)

A_{ist} – die gemessene Peakfläche eines Analyten ist (GC-Analyse)

η , [mPa·s] – Viskosität

ΔH_c , [kJ kg⁻¹] – Verbrennungswärme

Variablen des mathematischen Modells:

$m.t_0$ – Startzeit der Simulation [h]

$m.t_{\text{END}}$ – Maximale Simulationsdauer [h]

$m.dt$ – Zeitinkrement der Simulation [h]

$i.nb$ – Zahl der Bioreaktorstufen

$i.ns$ – Zahl der Differenzierungszustände für die Zellen

$i.V_{\text{seg}}$ – Volumen pro Bioreaktorstufe [L]

$i.D$ – Verdünnungsrate in einer Bioreaktorstufe [h⁻¹]

$i.F_{\text{in}}$ – Zufütterungsrate [Lh⁻¹]

$i.c_{\text{feed}}$ – Vektor mit den Metabolitenkonzentrationen im Zufütterungsmedium [g L⁻¹]

$i.c_{\text{seg}}$

(c_{initial}) – Matrix mit Anfangskonzentrationen in den Bioreaktorstufen [g L⁻¹]

μ_{max} (μ_{max}) – maximale Wachstumsrate im Quellcode des mathematischen Modells

$Y_{X/P_{O_4}}$ (Y_{xp}) – Ausbeutekoeffizient im Quellcode des mathematischen Modells

sk – Kohlenstofffluss [molC(mol_{Glc})⁻¹]

1. Einleitung

Geschichte der ABE-Fermentation

Die Entwicklung von ABE-Fermentationen begann aufgrund des Mangels an natürlichem Gummi während des Wechsels vom 19. zum 20. Jahrhundert. Denn Anfang des 20. Jahrhunderts wuchs die Autoindustrie rasant und schon bald wurde offensichtlich, dass natürliches Gummi aus Brasilien, Asien und Afrika knapp wurde. Es wurde beschlossen, dass Butanol der beste Grundstoff zur Herstellung von Butadien für das synthetische Gummi sei (Gabriel & Crawford, 1930). Die erste Erwähnung der mikrobiologischen Synthese von Butanol liegt 156 Jahre zurück. Im Jahr 1861 wurde die Produktion von Butanol mittels Fermentation von Mikroorganismen von Pasteur beschrieben. Fernbach und Weizmann isolierten im Jahr 1911 Bakterien, die Amyl-Alkohol und Butanol produzierten. Nach der Entwicklung des Produktionsprozesses wurde von Strange & Graham, Ltd. 1913 eine Pilotanlage für die Butanolproduktion gebaut. Die erste industrielle Produktion von Butanol wurde 1914 von Strange & Graham, Ltd. mit dem ‚Bacillus of the type of Fitz‘ in England betrieben. Eine Schwachstelle des Prozesses bestand jedoch darin, dass das Bakterium nur Kartoffelstärke abbauen konnte. Währenddessen entdeckte Weizmann unabhängig von Strange & Graham, Ltd. einen Stamm, der eine höhere Butanolproduktivität aufwies und dem Bacillus im Bezug auf die Diversität des Substrats überlegen war. Im Ersten Weltkrieg stieg der Bedarf an Aceton stark an, da es für die Herstellung des in England wichtigsten rauchlosen Sprengstoffes Kordit benötigt wurde. Da im Prozess von Strange & Graham auch Aceton produziert wurde, wurde die Produktion auf die Herstellung von Aceton umgestellt. Nur die Kartoffel diente jedoch als Substrat, daher konnte der Strange-&-Graham-Prozess nur wenig Aceton liefern. Die Überlegenheit des Weizmanns-Stamms ‚BY‘ (später *Clostridium acetobutylicum*) führte dazu, dass die Regierung Englands die Strange-&-Graham-Anlage übernahm und diese anpasste, indem sie den Weizmanns-Stamm nutzte und Mais als Substrat verwendete, um Aceton herzustellen (D. T. Jones & Woods, 1986). Auf den zusätzlichen Umbau einiger Brennereien zur Aceton-Produktion folgte aufgrund der Seeblockade Englands die Verlegung der Produktion nach Toronto in Kanada.

Zwei weitere Butanol-Aceton-Produktionsanlagen nach Weizmann entstanden in den USA.

Nach dem Krieg blieben große Mengen von Butanol als Nebenprodukt der Aceton-Produktion übrig, es gab jedoch keinen konkreten Verwendungszweck dafür. Die Entwicklung der auf Butanol basierenden Autolacke brachte die Wende in die nach dem Ende des Ersten Weltkrieges fast vollständig abgebaute Butanol-Aceton-Produktion (Gabriel & Crawford, 1930). Der gestiegene Bedarf an Butanol stimulierte die Produktion von Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) in den USA, in Japan und in Südafrika. In den 1950er Jahren wurde das am meisten für die ABE-Prozesse verwendete Substrat Melasse wegen seiner Verwendung für Tierfutter teurer. Zudem erwies sich die Herstellung von Butanol mithilfe der Verfahren der Petrochemie als günstiger als seine mikrobiologische Synthese. Dies führte zur Schließung der ABE-Anlagen in den westlichen Ländern. Länder wie China und Ägypten produzierten ABE-Produkte bis zum Ende der 1980er Jahre (Zverlov, Berezina, Velikodvorskaya, & Schwarz, 2006).

Die Herstellung von ABE-Produkten auf mikrobiologischer Basis ist aufgrund der Endlichkeit fossiler Rohstoffe und des erhöhten Ausstoßes von Kohlenstoffdioxid in die Atmosphäre infolge der Industrie und des urbanen Lebensstils der Menschen wieder ein aktuelles Thema.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Chemische Eigenschaften und Verwendung von Butanol

Bei n-Butanol handelt es sich um ein lineares Alkohol-Molekül mit vier Kohlenstoffatomen (*Abbildung 2-1*). Die klare neutrale Flüssigkeit besitzt eine geringe Viskosität ($\eta = 2,9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$) und einen charakteristischen Geruch. Außerdem ist n-Butanol ein primärer Alkohol und mischt sich gut mit anderen Alkoholen, Ketonen, Aldehyden, Ethern, Glykolen, aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen, lässt sich dagegen schlecht in Wasser lösen – 68 gL^{-1} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Yalkowsky, He, & Jain, 2010). Folgende *Tabelle 2-1* enthält eine detaillierte Übersicht der chemischen und physikalischen Daten von n-Butanol.

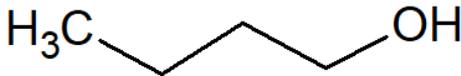


Abbildung 2-1: Chemische Struktur von n-Butanol

Tabelle 2-1: Übersicht chemischer und physikalischer Daten von n-Butanol, (BASF SE, 2008)

Chemische Daten

Name	Formel	Summenformel	Molare Masse [g mol^{-1}]
n-Butanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	74,12

Physikalische Daten

Siedetemperatur [$^\circ\text{C}$]	Dichte bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [g cm^{-3}]	Viskosität bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [$\text{mPa}\cdot\text{s}$]	Dampfdruck bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [hPa]	Verbrennungswärme ΔH_c [kJ kg^{-1}]
116-118	0,809-0,811	2,9	5,6	36111

2.1.1 Kommerzielle Nutzung von Butanol

N-Butanol wird als Lösungsmittel und Ausgangsmaterial für Synthesen verwendet. Wegen ihrer spezifischen Lösungsmittleigenschaften sind Butanol und seine Derivate wesentliche Zutaten vieler Farben und Lacke und werden daher von der Lackindustrie als Lösungsmittel für Lackzubereitungen verwendet. N-Butanol eignet sich gut als Verdünner in Nitrocelluloselacken, da es verhindert, dass diese beim Trocknen in feuchter Atmosphäre weiß anlaufen. Es senkt auch die Viskosität von Alkydharzlacken und verbessert damit ihre Verstreichbarkeit. Auch in wasserbasierten Formulierungen wird Butanol als Kopplungsmittel verwendet.

Fast 12 % des weltweit produzierten Butanols werden als Lösungsmittel eingesetzt, daher werden Lösungsmittel als dominierendes Einsatzgebiet von Butanol definiert. Ein erheblicher Teil des n-Butanols wird für die Herstellung von Acrylaten eingesetzt, die in wasserbasierten Farben, Reinigungsprodukten sowie Klebstoffen und Textilien verwendet werden. Die aus n-Butanol gewonnenen Phthalate spielen eine große Rolle als Weichmacher von Polyvinylchlorid (Ceresana, 2014).

Eine weitere Verwendung findet n-Butanol als Extraktionsmittel zur Gewinnung von Arzneimittelwirkstoffen und Naturstoffen. Hier seien einige von ihnen genannt: Extraktion von Antibiotika (Cavalleri, Pagani, Volpe, Selva, & Parenti, 1984; KENIG & READING, 1979; Larhsini et al., 2001; Leimgruber, Stefanović, Schenker, Karr, & Berger, 1965), Glykosiden (Chang et al., 2007; Huffman, Benjamin, & Bachur, 1972; Oyedapo & Araba, 2001), β -Amyloiden (Kang et al., 2011), Histamin (Shore, Burkhalter, & Cohn, 1959), Hormonen, Vitaminen, Alkaloiden und Kampfer.

2.1.2 Butanol als Biotreibstoff

Angesichts des wachsenden Problems der globalen Erwärmung, des andauernden Treibhauseffekts und der instabilen politischen Lage in Erdöl produzierenden Staaten und der damit verbundenen Instabilität der Preise für die fossilen Energieträger sucht die Industrie heute verstärkt nach alternativen Energieressourcen. Eine sichere, nachhaltige und die Umwelt schonende Quelle

einer solchen Energie hat unter anderem einen biologischen Ursprung. Schon seit Jahren wird an der Entwicklung von Prozessen für die Umwandlung von pflanzlichen Rohstoffen in Energie gearbeitet. Biogas und Biodiesel decken nur zum geringen Teil den Bedarf an Wärmeenergie bzw. Treibstoff. Neben der Verwendung von Ethanol als Additiv für Benzin wird an der biologischen Herstellung von langkettigen Alkoholen und anderen Stoffen gearbeitet, deren Beimischung zum Benzin den Verbrauch von Erdöl verringern soll. Butanol wird als ein vielversprechender Kandidat für einen Treibstoff der zweiten Generation eingestuft (González-Fernández, M. J., Muñoz, N., Alaoui, 2014).

Die physikalischen Eigenschaften von n-Butanol machen es als einen potenziellen Treibstoff der zweiten Generation attraktiv. Die Verbrennungswärme von n-Butanol (36111 kJ kg^{-1}) ist höher als die von Ethanol (26800 kJ kg^{-1}) und um einen geringen Anteil kleiner als die Verbrennungswärme von Benzin ($40100\text{--}41800 \text{ kJ kg}^{-1}$). Dementsprechend ist auch der Energiegehalt von Butanol höher als der von Ethanol. Butanol ist weniger flüchtig als Ethanol, Benzin oder deren Gemische und zudem weniger hygroskopisch oder korrosiv. Diese Eigenschaften machen seine Förderung durch die bestehenden Pipelines möglich, ohne dass Modifikationen von Mischanlagen, Lagertanks oder Zapfsäulen notwendig sind. Anders als Ethanol, von dem nur bis zu 10 % den Ethanol-Benzin-Gemischen zugegeben werden kann, kann Butanol in höheren Anteilen mit Benzin gemischt werden. Die Butanol-Benzin-Gemische können in den herkömmlichen Ottomotoren ohne Modifikation von Motorentechnik verbrannt werden. In Bezug auf Verbrennungsmerkmale, Motorleistung und Abgasemission ist Butanol die bessere Alternative zu Benzin oder Biodiesel (Jin, Yao, Liu, Lee, & Ji, 2011). Nach den Berechnungen von DuPont und BP, den zwei größten Global Players im Treibstoffsektor, ist die Treibhausgasemission in der Well-to-Wheel-Kette von Biobutanol bei der Nutzung der gleichen Rohstoffe nicht größer als die von Bioethanol (Dzięgielewski, Gawron, Kaźmierczak, & Kulczycki, 2014).

Untersuchungen verschiedener Gemische von Treibstoffen mit 1- und 2-Butanol ergaben, dass sich 1-Butanol besser als ein Additiv für Treibstoffe eignet. Es ist bis zu 10 % (v/v) mit Luftfahrtbetriebsstoff und Diesel mischbar, ohne nennenswerte Brennwertverluste des Treibstoffs zu erzeugen (Dzięgielewski et al., 2014). Nach ASTM D7862 kann Butanol bis zu 12,5 % (v/v) Benzin zugesetzt werden. DuPont und BP haben bei der Vorstellung ihres gemeinsam entwickelten Produkts Butamax™ eine 16%-(v/v)-Zugabe von Butanol erklärt (Llc, n. d.).

2.2 Biotechnologische Herstellung von Butanol

2.2.1 Stamm *Clostridium acetobutylicum*

Als Typstamm gilt der *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (*Clostridium acetobutylicum* DSM 792). *Clostridium acetobutylicum* ist ein Gram-positives, saccharolytisches Bakterium mit peritrich angeordneten Geißeln. Es kann Pentosen als auch Hexosen als Substrat verwerten. Als ein mesophiler Mikroorganismus verträgt es Temperaturen zwischen 10 und 60 °C. Bei 32–37 °C besitzt das Bakterium Eigenschaften zur Synthese einiger kommerziell brauchbarer Produkte, darunter Aceton, Ethanol und Butanol. *Clostridium acetobutylicum* gehört zu den anaeroben Bakterien und braucht das obligat anaerobe Milieu für vegetatives Wachstum. In aeroben und toxischen Umgebungen bildet es Sporen, die lange Zeit extreme Bedingungen überdauern können. Das Genom von *C. acetobutylicum* DSM 792 basiert auf einem 3 940 880 Basenpaarungen enthaltenden Bakterienchromosom und einem Megaplasmid pSOL1 mit 192 000 Basenpaarungen (Nölling et al., 2001).

2.2.1.1 Stoffwechselweg von *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum besitzt einen komplexen, zweiphasigen Metabolismus. Bei optimalen Temperaturen von 32–37 °C und bei einem ausreichend vorhandenen Substrat kommt es in der ersten, der sogenannten acidogenen Phase (vom engl. *acid* – Säure) zur Bildung organischer Säuren. Die zweite, solventogene Phase (vom engl. *solvent* – Lösungsmittel) beginnt, wenn sich das Milieu auf pH 4,3 ansäuert (Hubert Bahl, Andersch, Braun, & Gottschalk, 1982; Hubert Bahl, Andersch, & Gottschalk, 1983; Grupe & Gottschalk, 1992). Die Säuren werden von den Bakterien aufgenommen und in Lösungsmittel umgewandelt. Der Umstellungsmechanismus des Stoffwechsels in *C. acetobutylicum* ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Für die Lösungsmittelbildung mit dem Typstamm von *C. acetobutylicum* ist die vorausgehende Säuresynthese relevant. Nach Gen-Knockout-Experimenten wurde geschlossen, dass es auf dem Megaplasmid pSOL1 ein noch

unbekanntes Gen geben sollte, das den Elektronenfluss zwischen Säuresynthese (*Acidogenese*) und Lösungsmittelbildung (*Solventogenese*) kontrolliert (Sillers, Chow, Tracy, & Papoutsakis, 2008). Die Lösungsmittelbildung wird von der Initiierung des Sporulationsvorgangs begleitet. Der komplexe Steuermechanismus der Expression der entsprechenden Gene wird von dem Regulator Spo0A kontrolliert (Alsaker & Papoutsakis, 2005; Alsaker, Spitzer, Eleftherios, & Papoutsakis, 2004; Harris, Welker, & Papoutsakis, 2002; Nguyen et al., 2016; Zheng, Tashiro, Wang, & Sonomoto, 2015). Die für die Lösungsmittelbildung und Sporulation zuständigen Gene sowie Gene des Regulators spo0A sind auf dem pSOL1-Megaplasmid kodiert (Cornillot, Nair, Papoutsakis, & Soucaille, 1997; Harris et al., 2002).

2.2.1.2 Die acidogene Phase

Während der acidogenen Phase wird der Stoffwechselweg des *C. acetobutylicum* primär auf die Energiegewinnung ausgerichtet. Der Kohlenstofffluss wird in die Synthese von Carbonsäuren geleitet, während der Elektronenfluss für die Freisetzung vom Wasserstoff genutzt wird (D. T. Jones & Woods, 1986). In dieser Phase dominieren vegetative *C.-acetobutylicum*-Zellen. Die dünnen, beweglichen und stäbchenförmigen Zellen liegen einzeln vor oder bilden Zweierketten (Abbildung 2-2 A). Aus 1 Mol der von den Bakterien aufgenommenen Glukose werden in der Glykolyse je 2 Mol des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP), dem Redox-Cofaktor Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Pyruvat gebildet. Das Pyruvat wird von der NADH-Ferredoxin-Reduktase bei der Präsenz von Coenzym A unter Abspaltung des Kohlenstoffdioxids CO₂ zu Acetyl-CoA umgewandelt, wodurch ein Teil des NADH zu NAD⁺ oxidiert und das Enzym reduziert wird (Desai, Nielsen, & Papoutsakis, 1999; D. T. Jones & Woods, 1986). Das reduzierte Enzym Ferredoxin wird durch die Hydrogenase oxidiert und die reduzierte Hydrogenase setzt molekularen Wasserstoff H₂ frei (Vasconcelos, Girbal, & Soucaille, 1994a). Acetyl-CoA ist ein zentraler Metabolit des Stoffwechselwegs in *C. acetobutylicum*. In der acidogenen Phase wird aus Acetyl-CoA und dem anorganischen Phosphat durch die Phosphotransacetylase unter Freisetzung von Coenzym A ein Acetyl-Phosphat-Molekül gebildet. Das gebildete Acetyl-Phosphat wird unter Übertragung von Phosphat auf ein Adenosindiphosphat (ADP) in einer von der

Acetat-Kinase katalysierten Reaktion zu Essigsäure umgewandelt (Prüß & Wolfe, 1994) und ein ATP-Molekül wird generiert.

Der Acetyl-CoA-Pool in der acidogenen Phase wird parallel zur Essigsäurebildung für die Buttersäuresynthese beansprucht. Vier Enzyme wandeln das Acetyl-CoA zu Butyryl-CoA um, um in den zwei letzten Reaktionen der Buttersäuresynthese, analog zur Essigsäurebildung, über die Phosphorylierung von ADP ein Molekül ATP zu gewinnen: Das Enzym Thiolase kondensiert unter Freisetzung eines Coenzym-A-Moleküls zwei Acetyl-CoA-Moleküle zu einem Acetoacetyl-CoA-Molekül. Durch die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase wird das Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA umgewandelt, wodurch ein NADH-Molekül zu NAD⁺ oxidiert wird. Das 3-Hydroxybutyryl-CoA-Molekül wird von der Crotonase unter Abspaltung von H₂O zu Crotonyl-CoA dehydratisiert. In den nächsten Schritten isomerisiert die Butyryl-CoA-Dehydrogenase unter Oxidierung eines NADH-Moleküls zu NAD⁺ das Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA, das durch eine Phosphotransbutyrylase zu Butyryl-Phosphat und weiter unter Bildung eines Moleküls ATP von einer Butyrat-Kinase zur Buttersäure reagiert.

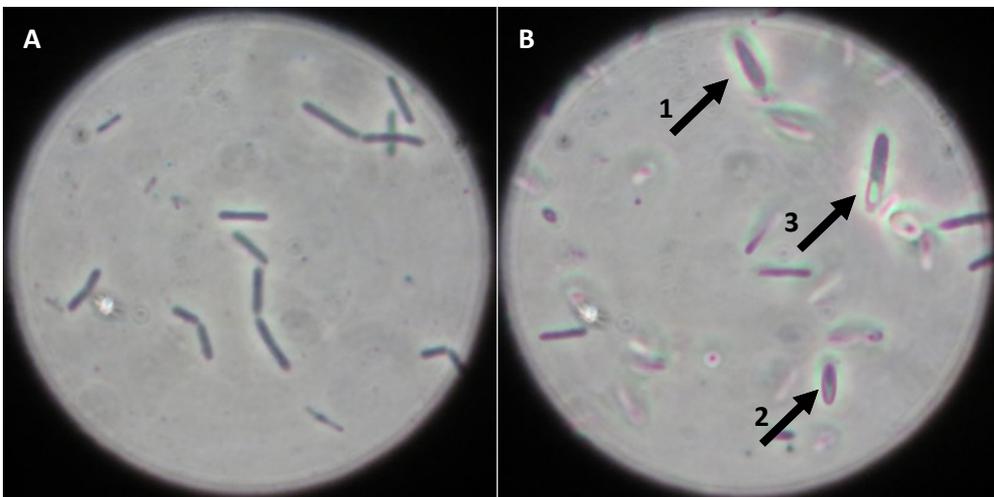


Abbildung 2-2: Mikroskopaufnahme von *Clostridium acetobutylicum*-Zellen. A: acidogene Phase. Dünne, bewegliche Zellen einzeln oder in Zweierketten; B: solventogene Phase. Geschwollene zigarrenförmige lösungsmittelbildende Zelle (1), Zelle mit reifender Vorspore (2) und Zelle mit Endospore (3)

2.2.1.3 Die solventogene Phase

In der solventogenen Phase von *C. acetobutylicum* unterscheidet sich die Morphologie der Zellen im Vergleich zur acidogenen Phase. Geschwollene, zigarrenförmige, lange Zellen (Abbildung 2-2 B **(1)**) zeichnen sich durch die hohe Lösungsmittelbildungsrate, die Reifung von Vosporen (Abbildung 2-2 B **(2)**) und die das Licht reflektierenden Endosporen (Abbildung 2-2 B **(3)**) aus. Die solventogene Phase ist durch die Aufnahme der in der acidogenen Phase gebildeten organischen Säuren, eine simultane Aufnahme des Substrats und Lösungsmittelbildung gekennzeichnet.

Mit Ausnahme der Acetonbildung sind lösungsmittelbildende Reaktionen von *C. acetobutylicum* NADH- und NADPH-abhängig. Dementsprechend ist die Lösungsmittelbildung energetisch ein aufwendiger Prozess. Die Lösungsmittel werden in *C. acetobutylicum* im Verhältnis 3:6:1 von Aceton, Butanol und Ethanol gebildet. Die für die Ethanol- und Butanolsynthese wichtigen Intermediate sind Acetyl-CoA bzw. Butyryl-CoA. Der Pool der beiden Intermediate wird durch den Katabolismus von Glukose und die Enzymaktivität der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrate:CoA-Transferase aufgefüllt. In *C. acetobutylicum* besitzt die Acetoacetyl-CoA-Transferase eine breite Spezifität zu Carbonsäuren und kann den Transfer von CoA entweder zur Essig- oder zur Buttersäure katalysieren (D. T. Jones & Woods, 1986). Bei dem Übertragen eines CoA-Rests vom Acetoacetyl-CoA auf eine der beiden Carbonsäuren wird Acetoacetat gebildet, das in der von der Acetoacetat-Decarboxylase katalysierten Reaktion zu Aceton und CO₂ decarboxyliert wird (Desai, Harris, Welker, & Papoutsakis, 1999), (Abbildung 2-3). Bei der Synthese von Ethanol aus Acetyl-CoA werden zwei NADH-Moleküle zu zwei NAD⁺-Molekülen oxidiert. Die Acet-/Butyraldehyd-Dehydrogenase wandelt Acetyl-CoA unter Oxidation eines NADH-Moleküls und Freisetzung von Coenzym A in Acetaldehyd um. Die Ethanol-Dehydrogenase katalysiert die letzte Reaktion unter Oxidation eines zweiten NADH-Moleküls und reduziert Acetaldehyd zu Ethanol. Unter Oxidation eines NADH- und eines NADPH-Moleküls wird analog zur Ethanol-Synthese Butanol aus Butyryl-CoA über Buteraldehyd von Buteraldehyd-Dehydrogenase und Butanol-Dehydrogenase gebildet (Yoo et al., 2015). Das für die letzte Reaktion der Butanolsynthese benötigte NADPH wird durch die Oxidation von Ferredoxin gebildet, da *C. acetobutylicum* keinen oxidativen Pentosephosphatweg besitzt (D. T. Jones & Woods, 1986; Yoo et al., 2015).

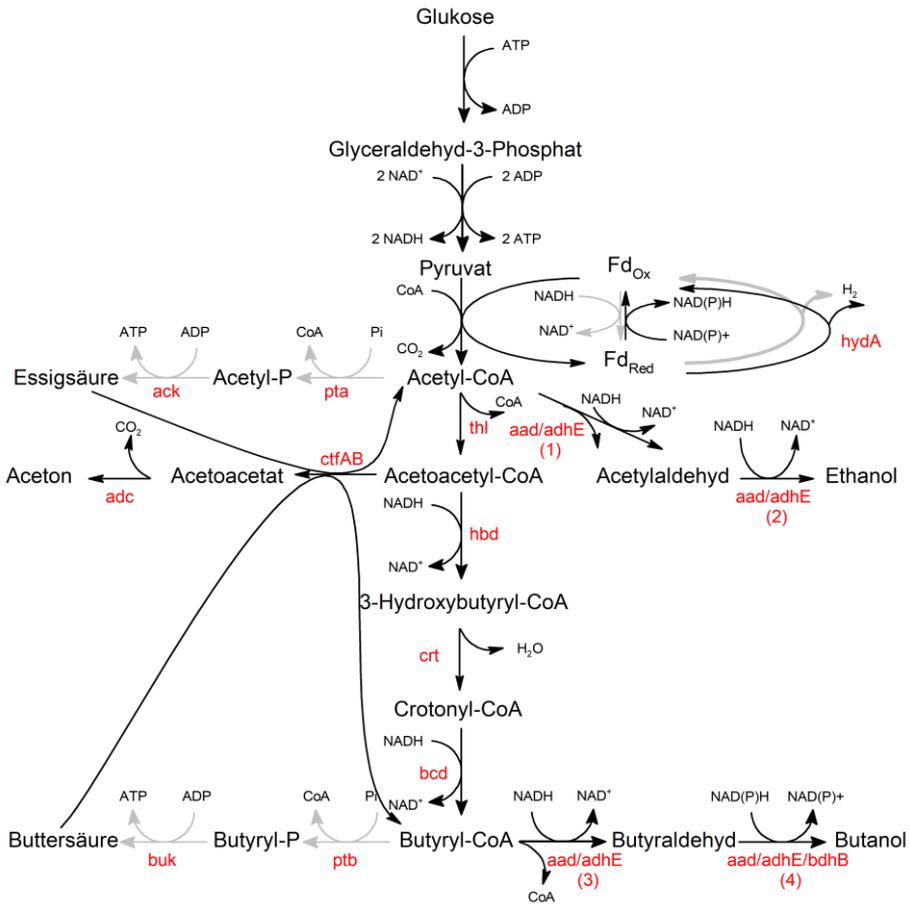


Abbildung 2-3: Der Stoffwechsel von *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Graue Pfeile – Acidogene; schwarze Pfeile – Solventogenese. Einige Enzyme werden aus mehreren gleichen Genprodukten zusammengesetzt, dennoch katalysieren sie unterschiedliche Reaktionen. Für ihre Differenzierung werden diese Enzyme beziffert. Die beschriebene Abbildung 2-3 (Übertrag): Gene kodieren folgende Enzyme: *hydA* – Hydrogenase, *pta* – Phosphotransacetylase, *ack* – Acetat-Kinase, *aad/adhE* (1) – Acetaldehyd-Dehydrogenase, *aad/adhE* (2) – Ethanol-Dehydrogenase, *thl* – Thiolase, *ctfAB* – Acetoacetyl-CoA: Acetat/Butyrat:CoA-Transferase, *adc* – Acetoacetat-Dekarboxylase, *hbd* – 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, *crt* – Crotonase, *bcd* – Butyryl-CoA-Dehydrogenase, *ptb* – Phosphotransbutyrylase, *buk* – Butyrat-Kinase, *aad/adhE* (3) – Butyraldehyd-Dehydrogenase, *aad/adhE/bdhB* (4) – Butanol-Dehydrogenase. Das Beschriftungsschema wurde wegen seiner Überschaubarkeit nach dem Prinzip aus (Zheng et al., 2015) gestaltet.

2.2.1.4 Umstellung des Stoffwechsels in *Clostridium acetobutylicum*

Der Umstellungsmechanismus des Stoffwechsels ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise auf und Hypothesen für verschiedene Änderungen im Kultivierungsmilieu, auf einige Intermediate des Stoffwechselwegs oder Proteine/Enzyme, die die Umstellung auslösen könnten. Es ist bewiesen und unbestritten, dass die Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* erst nach dem Akkumulieren organischer Säuren im intra- und extrazellulären Bereich auftritt (6–13 mM undissoziierter Buttersäure) (Husemann & Papoutsakis, 1990; Husemann & Papoutsakis, 1988; Monot, Engasser, & Petitdemange, 1984; Terracciano & Kashket, 1986). Die genauen Regulationsmechanismen der Umstellung des Metaboloms in *C. acetobutylicum* bedürfen weiterer Forschung und Erklärung. Die am meisten untersuchten möglichen Ursachen für die Umstellung des Stoffwechsels sind Effekte der intrazellulären undissoziierten Buttersäure, der pH-Gradient der Zelle, die Aktivität der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrate:CoA-Transferase, die Aktivität der Butyrat-Kinase und die Regulation der Aktivität des Enzyms Thiolase.

2.2.1.5 Hypothese 1: Intrazelluläre undissoziierte Buttersäure und der intrazelluläre pH-Gradient

Die Zellmembran ist für die protonierten (undissoziierten) Säuren permeabel (Kell, Peck, Rodger, & Morris, 1981). Der mögliche Effekt der undissoziierten Buttersäure auf die Umstellung des Stoffwechselwegs wurde mit der Verschiebung und der Erhöhung der Lösungsmittelproduktion nach der Inhibierung der membrangebundenen ATPase begründet. Aufgrund der Protonentranslokation durch die ATPase ist der intrazelluläre pH von *C. acetobutylicum* stets höher als der extrazelluläre (Herrero, 1983). Die Inhibierung der ATPase führt zur Senkung des intrazellulären pH-Wertes und zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration der undissoziierten Buttersäure. Der Vergleich der Lösungsmittelbildungsaktivitäten der Zellen mit intakter und inhibierter ATPase bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten zeigte einen positiven Effekt der ATPase-Inaktivierung und indirekt der undissoziierten Buttersäure auf die Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* (Monot et al., 1984).

2.2.1.6 Hypothese 2: Aktivität von Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrate:CoA-Transferase als Trigger

Die Behauptung, dass nur undissoziierte Buttersäure die Änderung des Stoffwechsels auslöst, wurde mit Begründung der chemischen Neutralität der nicht geladenen Säure infrage gestellt. Es wurde vermutet, dass die hohe intrazelluläre Konzentration der Essig- und Buttersäuren und die damit verbundene Anreicherung von Butyryl-Phosphat, Butyryl-CoA und Acetacetyl-CoA sowie der damit verbundene Mangel an Phosphat und Coenzym A in der Zelle die Basis für die Umstellung auf eine Lösungsmittelproduktion sind (Gottwald & Gottschalk, 1985). Es wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von *C. acetobutylicum*, seinen intrazellulären pH aufrechtzuerhalten, gering ist (Bowles & Ellefson, 1985) und vom extrazellulären pH abhängt. Die Phosphatlimitation in kontinuierlichen Fermentationen erwies sich als die Lösungsmittelbildung fördernd (H. Bahl & Gottschalk, 1984). Die Hypothese beruht auf der reversiblen Reaktion der Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrate:CoA-Transferase, die die akkumulierten intrazellulären Säuren in Acetyl- und Butyryl-CoA und Acetyl- und Butyryl-Phosphat umwandelt – die Vorstufen der Lösungsmittel. Dadurch werden das Phosphat und das Coenzym A gebunden und somit für weitere Bedürfnisse der Zelle entzogen. Die auf diesem Weg entstandene Phosphatlimitierung und der erhöhte Pool an Acetyl- und Butyryl-CoA könnten die Umstellung des Stoffwechsels von der acidogenen in die solventogene Phase steuern.

2.2.1.7 Hypothese 3: Aktivität von Butyrat-Kinase

Ein möglicher regulatorischer Effekt von Butyryl-Phosphat auf die Umstellung des Stoffwechsels wurde genauer untersucht. Das Ausschalten der Butyrat-Kinase-Genen (der finale Schritt in der Buttersäurebildung) in *C. acetobutylicum* resultierte in einer 300-prozentigen Erhöhung des metabolischen Flusses in Richtung des Butanols im Vergleich zum Wildstamm (Harris, Desai, Welker, & Papoutsakis, 2000). Die Lösungsmittelbildung begann in der exponentiellen Wachstumsphase. Anders als der Wildstamm produzierte die Butyrat-Kinase-Mutante mehr Butyryl- und Acetyl-Phosphat. Der Konzentrationspeak von Butyryl-Phosphat wurde in der exponentiellen Wachstumsphase registriert. In

allen getesteten *C. acetobutylicum*-Mutanten, außer in der Mutante M5, die kein pSOL1-Megaplasmid besitzt und dementsprechend keine Lösungsmittelbildung einleiten kann, fällt das Erreichen maximaler Konzentration von Butyryl-Phosphat in Höhe von 60–70 pmol g⁻¹_(Trockenmasse) Butyryl-Phosphat mit der Initiierung der Lösungsmittelbildung zusammen. Ein hoher Butyryl-Phosphat-Spiegel entsprach einer Hochregulierung der Lösungsmittelbildung und der Stressgene (Zhao, Tomas, Rudolph, Papoutsakis, & Bennett, 2005).

2.2.1.8 Hypothese 4: Das Enzym Thiolase als Trigger

Dank neuerer Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen und über die Struktur des Enzyms Thiolase wurde dieses Enzym zum Mittelpunkt der Diskussion über die Rolle als Auslöser der Stoffwechseländerung in *C. acetobutylicum*. Neben seiner großen Bedeutung bei der Regulation des ATP/NAD⁺-Pools der Zelle könnte das Enzym die Schlüsselkomponente des Phasenübergangs sein. Die Regulation der Thiolase in *C. acetobutylicum* unterscheidet sich von der Regulation ihrer aeroben Analogen. Im intrazellulären Raum kann die Thiolase im mikromolaren Bereich durch das Coenzym A reguliert werden, aber auch durch Butyryl-CoA und ATP bei 1 bzw. 10 mM (Kim et al., 2015). Die Überexpression des mutierten, auf den Regulierungsmechanismus nicht reagierenden Enzyms führt zu einer erhöhten und im Vergleich zur Überexpression des nativen Enzyms früheren Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum*. Die Autoren schließen daraus, dass der Redox-Regulationsmechanismus der Thiolase in *C. acetobutylicum* bedeutsam für die Butanolproduktion und verantwortlich für den metabolischen Fluss zum Acetyl-CoA ist. Früher wurde gezeigt, dass die Änderung des intrazellulären pH-Wertes aufgrund seines geringen Gradienten keinen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Enzyms haben kann. Der optimale pH-Wert der Thiolase-Enzymaktivität für die Kondensationsreaktion liegt zwischen pH 5,5 und 7,9. Auch der intrazelluläre pH von *C. acetobutylicum* ist stets höher als 5,5 (Bowles & Ellefson, 1985; Gottwald & Gottschalk, 1985), sodass das Enzym in beiden metabolischen Phasen aktiv ist.

2.3 Prozessführung der ABE-Fermentation

Da die Nachfrage nach Aceton für das rauchlose Schießpulver während der Weltkriege groß war, wurde Clostridium in Batch-Verfahren in großen Maßstäben und auf Basis von Melasse bzw. Maismaische als Substrat kultiviert (D. T. Jones & Woods, 1986). Die Lösungsmittel wurden in Mehrkolonnenapparaten kontinuierlich destilliert. In den nachfolgenden Jahrzehnten wurde versucht, die Fermentations- und Aufbereitungstechniken weiter zu verbessern und die Produktivität der Produktionsanlagen zu steigern.

2.3.1 Batch

Bei den ersten industriellen ABE-Fermentationen handelte es sich um Batch-Fermentationen in 200 bis 900 m³ großen Bioreaktoren. Das große Problem von ABE-Fermentationen in Batch-Prozessen besteht darin, dass die lösungsmittelbildenden Mikroorganismen wie *C. acetobutylicum* aufgrund der Toxizität des Butanols nicht mehr als 20–30 gL⁻¹ Lösungsmittel tolerieren oder produzieren können. Dies resultiert in einem geringen finalen Butanol-Titer und geringer ABE-Produktivität von 0,34–0,46 g(Lh)⁻¹ (Jouzani & Taherzadeh, 2015; Nanda, Dalai, & Kozinski, 2014; N. Qureshi, Liu, & Ezeji, 2012; Nasib Qureshi & Ezeji, 2008; Tao, He, Tan, Zhang, & Aden, 2014). Die Destillation von niedrig konzentrierten Lösungsmitteln ist energetisch aufwendig und ökonomisch nicht effizient.

In Versuchen, das Butanol während der Fermentation aus der Brühe zu entfernen, um die biokatalytische Aktivität von Mikroorganismen zu erhöhen, konnte die Produktivität von Batch-Prozessen gesteigert werden. Die Kopplung einer Batch-Fermentation mit einer flüssig-flüssig-Extraktion in einer Silikonmembran ergab summarisch in Fermentationsmedium und Extraktionsmittel 136,58 g Lösungsmittel aus 313,3 g Lactose nach 430 Fermentationsstunden (Nasib Qureshi & Maddox, 2005). In einer Batch-Fermentation mit integriertem Entfernen von n-Butanol aus der Brühe mittels Gas-Stripping wurden 199 gL⁻¹ produziert statt 30 gL⁻¹, wie in der Referenzfermentation ohne das Aufbereitungsmodul aus Glukose, die Lösungsmittelkonzentration konnte auf 69,7 gL⁻¹ erhöht werden (N. Qureshi & Blaschek, 2000).

Neben klassischen Batch-Verfahren wurden auch wiederholte Batch-Prozessführungen für ABE-Fermentationen angewandt, die in einem Fermentationsprozess mit wiederholten Beladungen eines Bioreaktors höhere Produktausbeute versprochen. Der Repeated-Batch mit immobilisiertem *C. acetobutylicum* reduzierte die Fermentationszeit von 27,8 auf 3,3 Stunden mit einer Produktivität von Lösungsmitteln und Butanol von $0,77 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bzw. $0,57 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Dolejš, Krasňan, Stloukal, Rosenberg, & Rebroš, 2014).

Folgende Nachteile der Batch-Fermentationen können genannt werden: Zum einen machen die Kosten für eine erneute, sich oft wiederholende Inbetriebnahme des Reaktors Batch als Prozessführung für ABE-Fermentationen ökonomisch wenig attraktiv. Zum anderen weisen Methoden wie Fed-Batch oder kontinuierliche Fermentationen bei deutlich längeren Fermentationszeiten bessere Produktivität als Batch-Verfahren auf.

Neben industrieller Anwendung der Batch-Fermentationen kann ihre Rolle für das Verständnis und die fundamentale Erforschung der Clostridien sowie Ermittlung der Optimierungsparameter der ABE-Fermentationen nicht unterschätzt werden. Batch-Fermentationen bieten eine experimentelle Basis für die Erforschung von Ursachen der Umstellung des Stoffwechselwegs von *C. acetobutylicum*. So wurden die Zusammenhänge zwischen dem externen pH-Wert und der extrazellulären Konzentration von Essig- und Buttersäure in Bezug auf die Stimulation von Lösungsmittelbildung untersucht (Gottschal & Morris, 1981; Holt, Stephens, & Morris, 1984). Ermittlungen des pH-Gradienten über die Zellmembran als mögliche Erklärung des von pH- und Säurekonzentrationen abhängigen Mechanismus der Umstellung des Stoffwechselwegs wurden ebenso unternommen (Bowles & Ellefson, 1985). Auch Untersuchungen der Antworten von Mikroorganismen auf Limitierungen verschiedener Nährstoffe wurden in Batch durchgeführt (D. T. Jones & Woods, 1986).

2.3.2 Fed-Batch/repeated Fed-Batch

Beim Fed-Batch-Verfahren wird der inhibierende Effekt von Butanol hinausgezögert und mehr Biomasse gebildet als bei Batch-Verfahren. Die Fed-Batch-Fermentationen ermöglichen eine längere Prozessdauer als Batch-Fermentationen. Infolge der kontinuierlichen Zugabe geringerer Mengen von Substrat oder anderen Nährstoffen in den Bioreaktor können Bakterien durch

Limitierung oder das Vermeiden des Überschusses den für die Produktbildung optimalen Bedingungen ausgesetzt werden. Durch die kontinuierliche Zugabe von 14 g(Ld)^{-1} Glukose wurden in einer Fed-Batch $13,5 \text{ gL}^{-1}$ Butanol und $16,9 \text{ gL}^{-1}$ Lösungsmittel produziert. Das limitierte Substrat führte im Vergleich zur Batch-Fermentation zur besseren Aufnahme von synthetisierten Säuren bei der simultanen Substrataufnahme (Fond, Petitdemange, Petitdemange, & Gay, 1984). Aufgrund des zunehmenden Inhibierungseffektes von Butanol reicherte sich jedoch das Substrat im Medium gegen Ende des Prozesses immer mehr an.

In einer Fed-Batch Fermentation im Repeated-Batch-Modus mit immobilisierten *C. acetobutylicum* Zellen, in der bei jedem Wiederholungszyklus nach dem Aufbrauchen von Glukose ein Glukosepuls gegeben wurde, konnten $1,21$ und $1,91 \text{ g(Lh)}^{-1}$ Butanol bzw. Lösungsmittel unter vollständiger Glukoseverwertung produziert werden (Dolejš et al., 2014).

Um die Produktinhibierung zu umgehen und die Effizienz des Fermentationsprozesses zu steigern, wurde das Entfernen von Butanol aus der Brühe mit verschiedenen Methoden in Fed-Batch-Fermentationen untersucht. Eine detaillierte Beschreibung von relevanten Aufbereitungsmethoden ist im Abschnitt ‚2.4 Aufbereitungsmethoden‘ gegeben. Eine Kopplung der Fed-Batch-Fermentation mit der flüssig-flüssig-Extraktion ergab $50,5\text{--}96,5 \text{ gL}^{-1}$ Lösungsmittel mit der Produktivität $1,4\text{--}2,3 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Roffler, Blanch, & Wilke, 1987). Die Fermentierung von *C. beijerinckii* in Fed-Batch mit verflüssigter Maisstärke, gekoppelt mit der Produktentfernung durch das Gas-Stripping, ergab $81,3 \text{ gL}^{-1}$ Lösungsmittel mit $225,8 \text{ gL}^{-1}$ verbrauchtem Substrat statt $18,6 \text{ gL}^{-1}$, wie bei der Referenzfermentation (Ezeji, Qureshi, & Blaschek, 2007).

Auch adsorptive Verfahren mit verschiedenen Adsorbentien zum Entfernen von Butanol on-line wurden getestet. Das Entfernen von Butanol mit dem Adsorbens Dowex Optipore L-493 führte zu $0,72 \text{ g(Lh)}^{-1}$ Lösungsmittelproduktivität und $40,7 \text{ gL}^{-1}$ ABE (Wiehn, Staggs, Wang, & Nielsen, 2014). Die Verwendung von KA-I-Adsorbens sorgte für $0,97\text{--}1,51 \text{ g(Lh)}^{-1}$ Lösungsmittelproduktivität und $130,7$ bzw. $96,5 \text{ gL}^{-1}$ ABE (Liu et al., 2014). Reillex 425, das Polyvinylpyridin-Adsorbens, ergab $1,69 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und $47,2 \text{ gL}^{-1}$ ABE (Yang & Tsao, 1995).

2.3.3 Kontinuierliche Fermentationen

Kontinuierliche ABE-Fermentationen in einem Bioreaktor sind wegen des zweiphasigen Stoffwechsels der Clostridien wenig effizient. Sowohl Fermentationen mit suspendierten (Andersch, Bahl, & Gottschalk, 1983) als auch mit immobilisierten Zellen (Häggström & Enfors, 1982) liefern geringe Mengen an Lösungsmitteln. Mehrstufige Systeme wie Bioreaktorkaskaden besitzen mehr Potenzial für die Lösungsmittelbildung. ABE-Fermentationen in Bioreaktorkaskaden wurden bereits früher beschrieben. Eine Kaskade, bestehend aus fünf Bioreaktoren mit der räumlichen Trennung der acidogenen und solventogenen Phasen und Endkonzentrationen von Lösungsmitteln im Bereich der Batch-Fermentationen, wurde von Dyr *et al.* präsentiert (Málek, 1958). Die Weiterentwicklung von ABE-Fermentationen in Bioreaktorkaskaden fand unter anderem in der ehemaligen UdSSR statt. Eine Kaskade, bestehend aus elf Bioreaktoren mit je 3,5 m³, wurde acht Tagen lang betrieben, wodurch eine Lösungsmittelkonzentration von 20,9 gL⁻¹ erreicht wurde (Malek, 1964). Andere Quellen berichten über die kontinuierliche ABE-Fermentation mit *C. acetobutylicum* mit einer ABE-Produktivität von 1,5 g(Lh)⁻¹ (D. T. Jones & Woods, 1986) oder 1,3–1,5 g(Lh)⁻¹ in einer dreistufigen Fermentation (Marlatt & Datta, 1986).

Der Vorteil einer mehrstufigen kontinuierlichen ABE-Fermentation gegenüber kontinuierlichen ABE-Fermentationen in einem Bioreaktor wurde anschaulich präsentiert. In einer einstufigen kontinuierlichen Fermentation konnten 0,81 gL⁻¹ Butanol bei einem pH-Wert von 4,3 erreicht werden (Hubert Bahl *et al.*, 1982) während eine zweistufige Fermentation bei gleichem pH-Wert mit 12,6 gL⁻¹ Butanol eine deutlich bessere Produktivität zeigte (Hubert Bahl *et al.*, 1983), siehe auch *Tabelle 2-2*. Die Fortsetzung der Optimierung kontinuierlicher ABE-Fermentationen in mehrstufigen Systemen mit der Untersuchung von Einflüssen von Limitierungen verschiedener Bestandteile von Medien auf die Produktivität trug zur Entwicklung dieser Prozessführung bei (H. Bahl *et al.*, 1986). Bei der Fermentation von *C. beijerinckii* in einem zweistufigen System mit $D_1 = 0,12 \text{ h}^{-1}$ und $D_2 = 2,2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ wurden über einen Zeitraum von 1600 Stunden kontinuierlich Lösungsmittel mit einer Produktivität von 0,27 g(Lh)⁻¹ und einer Konzentration von 15 gL⁻¹ produziert (Mutschlechner, Swoboda, & Gapes, 2000).

Kontinuierliche ABE-Fermentationen mit suspendierten Zellen können nur bis zu einer vergleichsweise geringen Verdünnungsrate D durchgeführt werden, um das Auswaschen der Zellen aus dem Bioreaktor oder einem Bioreaktorsystem zu verhindern. Die Immobilisierung von Mikroorganismen hingegen führt zur Zurückhaltung und Anreicherung der Biomasse im Bioreaktor und ermöglicht eine Prozessführung mit höheren Verdünnungsraten. Verschiedene Träger mit unterschiedlichen Eigenschaften, auch in Bezug auf die Verblockung von Bioreaktoren, wurden für ABE-Fermentationen getestet: Koks, Chitosanmatrix, Buchenholzspänen, Carrageenanmatrix, Calcium-Alginat, Knochen, Ziegel und andere (N. Qureshi & Blaschek, 2000). Um eine Stabilität kontinuierlicher Bakterienkultur aufrecht zu erhalten, werden Fermentationen phosphatlimitiert durchgeführt. Denn es wurde gezeigt, dass Phosphatlimitation und Glukoseüberschuss bei niedrigem pH-Wert in kontinuierlichen *C.-acetobutylicum*-Kulturen Lösungsmittelbildung begünstigen (H. Bahl et al., 1986; Hubert Bahl et al., 1983; Vasconcelos et al., 1994a).

Bei der Immobilisierung von *C.-acetobutylicum*-Zellen im Alginat wurde in einem Plug-Flow-Bioreaktor eine Produktivität hinsichtlich Butanol von $2,8 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im quasistationären Zustand und bei einem pH-Wert von 4,5 und $D = 0,055 \text{ h}^{-1}$ erreicht (Hägström & Enfors, 1982). Die Immobilisierung von *C. beijerinckii* BA101 auf Ziegel in einem Bioreaktor führte zu einer Produktivität der Lösungsmittel von $15,8 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bei $D = 2,0 \text{ h}^{-1}$ und ergab $7,9 \text{ gL}^{-1}$ Lösungsmittel (N. Qureshi & Blaschek, 2000). Dahingegen erbrachte die Immobilisierung von *C.-acetobutylicum*-Zellen auf Tygon-Ringen in einer Kaskade aus vier Festbettreaktoren mit $D_{\text{gesamt}} 0,85 \text{ h}^{-1}$ insgesamt $10,8 \text{ gL}^{-1}$ n-Butanol mit einer Produktivität von $9,2 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Raganati et al., 2016).

Geringe Konzentrationen von Lösungsmitteln in ABE-Fermentationen sind Folge der inhibierenden Wirkung von n-Butanol in der Fermentationsbrühe. Das Entfernen von toxischem Butanol während einer laufenden Fermentation verhindert die schnelle Inhibierung der Mikroorganismen und erlaubt eine effizientere Lösungsmittelproduktion. Ohne den inhibierenden Effekt von n-Butanol können Bakterien mehr Substrat aufbrauchen und größere Mengen von Lösungsmittel produzieren.

In der Fermentation mit immobilisierten *C.-acetobutylicum*-Zellen mit Laktose als Substrat in einem Festbett-Bioreaktor, gekoppelt mit Pervaporation, wurden

97,9 % des 130 gL^{-1} konzentrierten Substrats verbraucht und eine Produktivität der Lösungsmittel von $3,5 \text{ g(Lh)}^{-1}$ erreicht (Friedl, Qureshi, & Maddox, 1991).

Mit dem integrierten Entfernen von n-Butanol mittels Gas-Stripping konnten 200 gL^{-1} Laktose in 70 gL^{-1} Lösungsmittel umgewandelt werden (Maddox, Qureshi, & Roberts-Thomson, 1995). Das angewandte Gas-Stripping-Verfahren für das Entfernen von Lösungsmitteln aus der zweiten Stufe einer zweistufigen Fermentation ermöglichte eine zusätzliche Substratzugabe in den Bioreaktor, wodurch im Kondensat 56 gL^{-1} Butanol und 73 gL^{-1} Lösungsmittel erreicht wurden (Setlhaku, Heitmann, Górak, & Wichmann, 2013). Die Anwendung der Pervaporation als Trennverfahren *ex situ* in derselben Fermentation ergab 167 gL^{-1} Butanol und 269 gL^{-1} Lösungsmittel im Permeat.

Es ist offensichtlich, dass eine kontinuierliche Prozessführung von ABE-Fermentationen in Systemen, bestehend aus mehr als einem Bioreaktor, im Hinblick auf die Produktivität und die Substratumwandlung in das Produkt eine optimale Fermentationsart ist. Die Kopplung solcher Fermentationssysteme mit der Produktaufbereitungsmethode erhöht ihre ökonomische Effizienz und steigert das Potenzial zur Konkurrenzfähigkeit gegenüber der petrochemischen Synthese der Lösungsmittel.

Tabelle 2-2: Weiterführende Übersicht von kontinuierlichen ABE-Fermentationen mit Clostridium (gestützt auf (Fangfang Liu, 2014) und entsprechend ergänzt). Glc – Glukose; D – Verdünnungsrate; cLM/cBut – Konzentration von Lösungsmitteln bzw. Butanol; s – Zellsuspension; r – Rückführung; i – immobilisierte Zellen

Stufen	pH	D [1/h]	Substrat	Limitierung [g/L]	Zugabe [g/L]	c _{LM} /c _{But} [g/L]	Art ^{Biomass} _e	Kopplung mit Aufbereitungsmod.	Verweis
1	4,3	0,133	Glc	Glc	Butyrate 5,2	-/0,81	S		(Hubert Bahl et al., 1982)
2	4,3/4,3	0,125/0,03	Glc	PO ₄ ³⁻ 0,058	-	18,2/12,6	S		(Hubert Bahl et al., 1983)
1	4,4	0,14	Molke	Eisen 0,00278	-	-	S		(H. Bahl et al., 1986)
2	4,3/5	0,1/0,03	Molke	PO ₄ ³⁻ 0,1	L-Laktat ₁ 2,7/Laktat ₂ 7,2	14,7/11,7	s		(H. Bahl et al., 1986)
2	6/4,5	0,075/0,06	Glc	N- Verbindungen 0,25	-	9,11/5,93	s		(Lai & Traxler, 1994)
2	4,3-4,4	0,64	Glc	-	-	15/-	s, r		(Afschar, Biebl, Schaller, & Schiigerl, 1985)
2	4,7/5,1	0,12/2,2x10 ⁻²	Glc	-	-	15/-	s		(Mutschlechner et al., 2000)
1	6	0,05	Glc	-	Glycerol	7,9/6,6	s		(Andrade & Vasconcelos, 2003)

Tabelle 2-2 (Übertrag)

1	4,5	0,055	Glc	-	-	-/2,05	i		(Häggröm & Enfors, 1982)
1		2,0	Glc			7,9/-	i		(N. Qureshi & Blaschek, 2000)
4	pH ₁ 5,5/pH ₂ -3 4,7	0,85	Laktose	-	-	-/10,8	i		(Raganati et al., 2016)
1	4,2	0,1	Glc	-	-	12,9/8	s	Flüssig-flüssig Extraktion	(Eckert & Schügerl, 1987)
2	5,0	0,3/0,13	Lactose	-	-	12,3/8,1 3	i	In-line Adsorption	(Ennis, Qureshi, & Maddox, 1987)
1	5,0		Molkepermeat	-	-	69,1/38, 6	s	Gas-Stripping	(Nasibuddin Qureshi, Maddox, & Friedl, 1992)
2	4,5		Glc	-	-	73/59	s	Gas-Stripping	(Setlhaku et al., 2013)
	4,5		Glc			269/167	s		
1	5,0		Molkepermeat			42/26,8	s	Pervaporation	(Nasibuddin Qureshi et al., 1992)
	0,07- 0,12	0,07	Glc	-	-	Ca. 10/-	i	Gas-Stripping	(Mollah & Stuckey, 1993)

2.3.4 Kultivierung genetisch veränderter Stämme

Eines der bedeutsamsten Kriterien der gesamten ABE-Produktion sind die Kosten für die Produktaufbereitung. Diese Kosten werden nicht nur von der Wahl der Aufbereitungsmethode bestimmt, sondern auch von den Eigenschaften des Mikroorganismus beeinflusst. Wenn der Mikroorganismus während des Fermentationsprozesses neben Butanol kein oder nur wenig Aceton oder Ethanol produziert oder der Mikroorganismus eine hohe Toleranz gegenüber Butanol aufweist, so wird die Aufbereitung von Butanol wesentlich einfacher (Lee et al., 2008). Die Entwicklung von butanoltoleranten oder nur Butanol produzierenden Bakterien wird mithilfe von Gentechnik vorangetrieben. Im Folgenden wird auf die Ergebnisse einiger Kultivierungen genetisch modifizierter Mikroorganismen eingegangen.

Die Immobilisierung des *C. acetobutylicum*-P262-(spoA2)-Mutanten zeichnete sich im Vergleich zur gleichartigen Fermentation mit dem Wildstamm durch eine zehnfach höhere Lösungsmittelproduktivität aus: $3,0 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bzw. $0,3 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Largier, Long, & Santangelo, 1985). *C. acetobutylicum* EA 2018 veränderte sich durch Knockout vom Acetoacetat-Dekarboxylase-Gen (*abc*) zum Mutantstamm 2018abc. Infolge der Steuerung des Elektronenflusses durch Methylviologen bei der Synthese von Essigsäure zur Butanolproduktion konnte der Butanolanteil von 70 auf 82 % gesteigert werden (Jiang et al., 2009). Die Überexpression der Thiolase-Promoterregion *groESL* in *C. acetobutylicum* ATCC 824(pGROE1) erhöhte die Lösungsmittelkonzentration im Vergleich zum Wildstamm um 40 % und verbesserte die Butanoltoleranz des Stammes wesentlich (Tomas, Welker, & Papoutsakis, 2003).

2.3.5 Ökonomische Effizienz von ABE-Fermentationen

Für die Förderung der Produktion von Biobutanol mittels ABE-Fermentationen sprechen die schrumpfenden Erdölvorräte und nicht zuletzt die Problematik des Treibhausgasausstoßes (Brehmer, Boom, & Sanders, 2009). Um die Produktion von Butanol aus nachhaltigen Rohstoffen effizient zu gestalten, müssen viele technische, ethische und politische Fragen geklärt werden.

Dank der natürlichen Fähigkeit der Clostridien, eine Vielfalt von Zuckern und einige Kohlenwasserstoffe zu verstoffwechseln, können ABE-Fermentationen mit verschiedenen Substraten zur Produktion von Lösungsmitteln eingesetzt werden. Oft werden ethische Diskussionen im Format ‚Teller oder Tank‘ oder ‚Trog oder Reaktor‘ geführt (Thompson, 2008) mit der Konsequenz, dass bestimmte Rohstoffe wie Molke, Trester, Treber oder Kartoffelschalen entweder nur bedingt oder überhaupt nicht als ein langfristig zur Verfügung stehendes Substrat in Betracht gezogen werden. Für die nachhaltige und zuverlässige Prozessführung von ABE-Fermentationen werden Kohlenhydrate aus Lignocellulose gewonnen, die in pflanzlicher Biomasse vorkommt. Eine kurze Übersicht über die ABE-Fermentationen auf Basis lignocellulosehaltiger Biomasse ist in *Tabelle 2-3* gegeben.

Tabelle 2-3: Übersicht über ABE-Fermentationen mit cellulosehaltigen Rohstoffen

Rohstoff	Mikroorganismus	Ausbeute Lösungsmittel [gL⁻¹]	Referenz
Mais	<i>C. acetobutylicum</i>	12-20	(D. T. Jones & Woods, 1986)
Cellulose, Lichenin	<i>C. beijerinckii</i>	4,9	(López-Contreras et al., 2001)
Maisfaser	<i>C. acetobutylicum</i>	10-25	(Nasib Qureshi, Li, Hughes, Saha, & Cotta, 2006)
Maisfaser	<i>C. beijerinckii</i>	22	(Nasib Qureshi, Ezeji, et al., 2008)
Weizenstroh	<i>C. beijerinckii</i>	22	(Nasib Qureshi & Ezeji, 2008; Nasib Qureshi, Saha, Hector, Hughes, & Cotta, 2008)
Gerstenstroh (Übertrag)	<i>C. beijerinckii</i>	7-27	(Nasib Qureshi et al., 2010)

<i>Tabelle 2-3 (Übertrag)</i>			
Cellulose	<i>C. celluloliticum</i>	0,66	(Higashide, Li, Yang, & Liao, 2011)
Cellulose	<i>C. thermocellum</i> , <i>C. saccharoperbutyl acetonicum</i>	7,9	(Nakayama, Bando, Ohnishi, Kadokura, & Nakazato, 2013; Nakayama, Kiyoshi, Kadokura, & Nakazato, 2011)
Cellulose	<i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. cellulolyticum</i>	0,35	(Salimi & Mahadevan, 2013)
Birkenholz, Xylan	<i>Clostridium strain BOH3, Kluyvera strain OM3</i>	1,2	(Xin & He, 2013)
Maisstroh	<i>C. cellulolyticum</i>	0,42	(Y. Li et al., 2014)
Maiskolben	<i>C. cellulovorans</i> , <i>C. beijerinckii</i>	8,3	(Wen et al., 2014)

Die Anschaffung des Substrats und der Prozess der Kohlenhydratgewinnung aus Lignocellulose können 48 (Daza Montaña, 2009) bis 79 % (Kujawska, Kujawski, Bryjak, & Kujawski, 2015) der gesamten Produktionskosten betragen und machen somit neben der Produktaufbereitung den größten Investitionsbedarf aus. Der Preisunterschied zwischen den Substraten kommt durch Unterschiede der Substratart und der Bioraffineriengenerationen zustande. Dies sei am Beispiel der Zuckerrohrraffinerien erklärt. In Bioraffinerien der ersten Generation wird der Rohstoff Zuckerrohrsaft als Substrat für Butanolherstellung verwendet, während die Zuckerrohrbagasse zur Energie- und Dampfgewinnung

verbrannt wird. In Bioraffinerien der zweiten Generation werden aus Zuckerrohrbegasse Reststoffe wie Pentosen und durch die Hydrolyse auch Glukose gewonnen und neben dem Zuckerrohrsaft als Substrat verwendet (Lucas G. Pereira, Chagas, Dias, Cavalett, & Bonomi, 2015). Die Substrataufbereitungspreise fließen in die Formulierung des Preises für das Biobutanol ein, der Preis für das Substrat hängt jedoch auch stark von Marktpreisfluktuationen ab (Green, 2011). Der molekulare Anteil des n-Butanols in der Brühe beeinflusst ebenso seinen Preis (Tao et al., 2014): Mit steigendem molekularem Anteil von n-Butanol ist seine Abtrennung aus der Brühe günstiger, was wiederum eine Senkung des Preises hervorruft. Um Biobutanol gegen Petroleumbutanol konkurrenzfähig zu machen, muss jedes Nebenprodukt der ABE-Fermentation für die Gewinngenerierung genutzt werden. Aceton, Ethanol und n-Butanol müssen daher aus der Brühe selektiv getrennt und entsprechend aufbereitet werden. Die Aufbereitungsverfahren ihrerseits verursachen zusätzliche Kosten, sodass eine energieeffiziente und dennoch selektive Trennmethode genutzt werden sollte. Die Bakterienbiomasse muss wie Hefebiomasse bei Ethanol-Herstellungsverfahren zu Futtermitteln verarbeitet werden. Zusätzlich muss der Wasserstoff, der während des Fermentationsprozesses gebildet wird, komprimiert und gereinigt werden. Sowohl die für die Aufbereitung von Produkten erzeugte Energie als auch das Prozesswasser müssen in den Fermentationsprozess wieder zurückgeleitet werden, um die Produktionskosten in einem ökonomisch zulässigen Bereich halten zu können (L. G. Pereira, Dias, Mariano, Maciel Filho, & Bonomi, 2015; Tao et al., 2014).

Unter Berücksichtigung der geringen Butanolkonzentration in Fermentationsbrühe ($13\text{--}15\text{ gL}^{-1}$) und dampfverbrauchender Operationen wie Sterilisation des Substrates, Produktaufbereitung (Destillation) und Abwasserbehandlung weisen derartige Lösungsmittelherstellungsprozesse sichtbare ökonomische Nachteile auf. Eine Korrelation zwischen dem Energieverbrauch für die Destillation und der Butanolkonzentration in der Fermentationsbrühe deutet auf eine Steigerung der Butanolkonzentration in der Brühe auf 36 gL^{-1} hin, mit der eine ökonomische Effizienz erreicht wird (Mariano & Filho, 2012; Setlhaku et al., 2013). Die Produktivität des Produktionsprozesses kann durch die simultane Fermentation, Trennung und Aufbereitung von Butanol gesteigert werden. Im Abschnitt ‚2.4 Aufbereitungsmethoden‘ wird auf die Vorarbeiten der *in situ* oder offline durchgeführten

Produktaufbereitungsmethoden näher eingegangen. Die Kopplung eines ABE-Fermentationsprozesses mit einer simultanen Produktaufbereitung erfordert nach wie vor eine Optimierung sowohl des Fermentationsprozesses hinsichtlich der Produktivität als auch der Aufbereitung des Produktes hinsichtlich seiner Reinheit und des Ertrags.

Die Förderung erneuerbarer Energie steht derzeit im Fokus der europäischen Politik. Dank vieler Förderprogramme werden staatliche und private Forschungsinstitute, zusammen mit kleinen und mittelgroßen Unternehmen, in die Entwicklung innovativer Technologien einbezogen. Methoden für die fermentative Produktion und Aufbereitung von Butanol und anderen Produkten werden weiter erforscht und optimiert. Es werden Lebenszyklusanalysen von ABE-Fermentationen durchgeführt, um nach der effizientesten Herstellungsstrategie zu suchen. Dank weiterer Forschung und andauernder politischer Unterstützung wird der Anteil an Biobutanol und anderen Lösungsmitteln aus biologischer Herstellung auf dem Weltmarkt steigen.

2.4 Aufbereitungsmethoden

Geringe Mengen von n-Butanol in der Fermentationsbrühe der ABE-Fermentationen, das aufgrund seiner inhibierenden Wirkung eingesetzt wird, resultieren in einem großen Energiebedarf bei der Gewinnung des n-Butanols während der Destillation (Oudshoorn, van der Wielen, & Straathof, 2009). Ein integrierter Prozess, bei dem die Inhibierung durch das n-Butanol während der Fermentation mittels kontinuierlichen Entfernens aus der Brühe verhindert wird, weist einen entscheidenden Vorteil auf, da die Produktivität des Prozesses gesteigert wird (Schügerl, 2000). Die Kopplung beider Prozesse wird als kosteneffektiv bewertet (Tao et al., 2014). Zu den Aufbereitungsmethoden des n-Butanols gehören flüssig-flüssig-Extraktion, Pervaporation, Umkehrosmose, Gas-Stripping und Adsorption. Für eine vielseitige Verwendung ist n-Butanol mit 99,5-prozentiger Reinheit erforderlich. Die komplette Aufbereitung beinhaltet dementsprechend neben einer selektiven Trennung des Produkts Methoden für die Erhöhung seiner Reinheit. Dies ist unweigerlich mit erhöhten Kosten verbunden. So können nach einer adsorptiven Trennung des n-Butanols von der Brühe einige Destillationskolonnen, Extraktionskolonnen oder Dekanter ihre Verwendung finden. Insofern ist es notwendig, ein effektives und rentables

Trennverfahren zu entwickeln, um der biologischen Herstellung des n-Butanols und anderer Lösungsmittel eine ökonomische Konkurrenzfähigkeit zu garantieren.

Einer kontinuierlichen Produktaufbereitung muss eine kontinuierliche Fermentation vorausgehen. Durch ihre Neigung, wegen der Produkttoxizität Sporen zu bilden, soll die kontinuierliche *C.-acetobutylicum*-Kultur gegen Sporenbildung stabilisiert werden. Dank früherer Vorarbeiten wurde eine Phosphatlimitation als zuverlässiges Mittel zur Verhinderung der Sporulation in *C. acetobutylicum* etabliert (H. Bahl et al., 1986; Hubert Bahl et al., 1983; Vasconcelos, Girbal, & Soucaille, 1994b).

2.4.1 Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Trennung eines homogenen Gemisches mithilfe eines in ihm wenig löslichen zweiten Lösungsmittels (Extraktionsmittel) wird als Extraktion bezeichnet. Die weit verbreiteten Extraktionsmittel für die Extraktion von n-Butanol aus einer Fermentationsbrühe sind Dekanol und das Oleylalkohol (Honda, Toyama, Takahashi, Nakazeko, & Kobayashi, 1995; Nasibuddin Qureshi & Maddox, 1995; Weilhammer & Blass, 1994). Die meisten Versuche von ABE-Fermentation mit simultaner Extraktion von n-Butanol haben nur eine bedingte Steigerung der Produktivität bewirkt. Die Extraktionsmittel fügen der Biomasse Schaden zu, was sich in der Senkung ihrer metabolischen Aktivität widerspiegelt. Des Weiteren bewehrt sich die flüssig-flüssig-Extraktion als Aufbereitungsmethode gegenüber anderen Methoden in kontinuierlichen Prozessen nicht, auch wegen der Kosten für die Wiedergewinnung von n-Butanol und die Regenerierung des Extraktionsmittels für seinen wiederholten Einsatz (Tao et al., 2014). Bei dem Versuch, die Effizienz der ABE-Fermentation mit simultaner Extraktion von n-Butanol zu steigern, wurden permeable Membranen zwischen der Fermentationsbrühe und dem Extraktionsmittel installiert (Grobben, Eggink, Petrus Cuperus, & Huizing, 1993; Nasib Qureshi & Maddox, 2005). Das Hauptproblem des sofortigen Lösens von n-Butanol im Extraktionsmittel blieb jedoch bestehen und die damit verbundenen Kosten für seine Wiedergewinnung und die Regenerierung des Extraktionsmittels veränderten sich nicht, sodass der flüssig-flüssig-Extraktion als Aufbereitungsmethode in kontinuierlichen ABE-Fermentationen wenig Beachtung geschenkt wird.

2.4.2 Pervaporation

Die Pervaporation ist ein Membranverfahren zur Trennung von Flüssigkeitsgemischen. Dabei fließt die von dem Gemisch zu trennende Komponente (Permeat) durch die Membran, während das gereinigte Gemisch (Retentat) zurückbleibt. Durch das Verdampfen des Permeats auf der Außenschicht der Membran ist seine Konzentration auf dieser Seite der Membran geringer als in der Grenzfläche zum Gemisch. Dank des Konzentrationsgefälles im Querschnitt der Membran ist die Diffusion die treibende Kraft bei diesem Trennverfahren. Durch das Verdampfen des Permeats sinkt die Temperatur in der Außenschicht der Membran. Dieser Wärmeverlust kann durch verschiedene Verfahren kompensiert werden. Es werden verschiedene Membranen für die Pervaporation verwendet: Membranen aus Keramik (J. Huang & Meagher, 2001), flüssige (Matsumura & Kataoka, 1987; Thongsukmak & Sirkar, 2007) oder Polymermembranen (Vrana, Meagher, Robert, & Duffield, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute von n-Butanol aus ABE-Fermentationen verbessert werden kann (N. Qureshi & Blaschek, 2000). Die Anschaffung von Pervaporationsmembranen ist jedoch mit hohem Investitionsbedarf verbunden, sodass die ABE-Produktion mit solchen Trennverfahren ökonomisch nicht effizient ist. Obwohl es den Energieverbrauch um bis zu 50 % reduzieren kann, ist das Verfahren aufgrund der Kosten für ein Pervaporationssystem, die das 30-fache einer herkömmlichen Destillationskolonne ausmachen (Kazi et al., 2010), wenig attraktiv.

2.4.3 Die Umkehrosmose

Die Umkehrosmose ist ein physikalisches Membranverfahren für die Konzentrierung eines in einem Flüssigkeitsgemisch gelöstem Stoff. Eine semipermeable Membran trennt das Flüssigkeitsgemisch von dem Medium, das das gleiche Lösungsmittel enthält wie das Flüssigkeitsgemisch, jedoch mit höherer Konzentration. Auf das Flüssigkeitsgemisch wird ein Druck ausgeübt, um das Lösungsmittel gegen seine natürliche Diffusionsrichtung durch die Membran zu pressen. Die Membran ist für das Permeat (Lösungsmittel) durchlässig, allerdings nicht für den im Flüssigkeitsgemisch gelösten Stoff. Im Flüssigkeitsgemisch bleibt der konzentrierte gelöste Stoff zurück (Konzentrat). Die Umkehrosmose als eine Butanol-Aufbereitungsmethode ist insofern

vorteilhaft, als sie bei Raumtemperatur eine optimale Trennung leistet. Der Nachteil der Umkehrosmose ist der hohe Preis für die semipermeable Membran. Zudem sind die meisten Membranen nicht beständig gegenüber Aceton (N. Qureshi & Blaschek, 1999), was die Attraktivität dieser Aufbereitungsmethode einschränkt.

Das Wasser-Aceton-Butanol-Ethanol-Gemisch kann mithilfe von Polyamid-Membranen getrennt werden, die für Butanol ein Rückhaltevermögen von 98 % aufweisen (Garcia, Iannotti, & Fischer, 1986). Die Verwendung einer Polyamid-Membran bewirkte eine geringe Butanol-Wiedergewinnung aus der Brühe (20–45 %) bei für die Membran optimalen Prozesseinstellungen. Kompositionsmembranen wie die FT-30-Membran ermöglichen die Trennung von Stoffen bei niedrigerem Druck und weisen ein Rückhaltevermögen für 1-Butanol von 72–75 % auf (Alsaygh, Jennings, & Bader, 1993). Das Rückhaltevermögen von mehr als 99 % für Butanol zeigte sich bei 25 °C und 5515,8 kPa (Diltz, Marolla, Henley, & Li, 2007).

2.4.4 Gas-Stripping

Das Gas-Stripping ist eine der vielversprechendsten Aufbereitungsmethoden. Es bedarf keiner Membran und verbraucht wenig Energie. Zudem werden beim Gas-Stripping keine für die Mikroorganismen schädlichen Extraktionsmittel verwendet und es kann *in situ* durchgeführt werden. Gas-Stripping hat einige Vorteile: (i) Es entfernt effektiv das n-Butanol und andere Lösungsmittel aus der Fermentationsbrühe, ungeachtet der Fermentationsart (Batch, Fed-Batch oder kontinuierliche Prozesse); (ii) beim Gas-Stripping werden hohe Konzentrationen von n-Butanol im Kondensat erreicht, wodurch die nachfolgende selektive Trennung erleichtert wird (Y. Li et al., 2014).

Für die Anwendung des Gas-Strippings bei der Trennung von bestimmten Komponenten aus der Fermentationsbrühe muss der Aufbereitungsprozess unter Berücksichtigung der in der Brühe gelösten Stoffe und der Matrix des Nährmediums optimiert werden.

So stellte sich bezüglich der Trennung von n-Butanol aus der Brühe von ABE-Fermentationen heraus, dass die Anwendung der Gas-Stripping-Methode mit Begasung durch Fritte und ohne Rührwerk von einer unerwünscht größeren Schaumbildung begleitet wurde als die Anwendung der Gas-Stripping-Methode

mit betätigtem Rührer (Ezeji, Karcher, Qureshi, & Blaschek, 2005). Die beschleunigte Schaumbildung wurde durch feine Gasblasen $< 0,5$ mm hervorgerufen und erforderte eine zusätzliche Antischaummittelzugabe. Infolgedessen sank die Produktivität der Fermentation aufgrund eines negativen Effekts des Antischaummittels auf die Mikroorganismen. Daraus folgte die Feststellung von Gasblasengrößen für das optimale Entfernen von n-Butanol aus der Brühe (0,5–5,0 mm). Das Vorhandensein anderer Lösungsmittel wie Aceton und Ethanol in der Brühe beeinflusst das Entfernen von Butanol aus dem Fermentationsgemisch mittels Gas-Stripping nicht.

Für das Gas-Stripping muss die Fermentationsbrühe nicht zwangsläufig aus dem Bioreaktor entfernt werden. Die Abtrennung der Lösungsmittel kann in der Gasphase eines kontinuierlichen Rieselbettreaktors mit immobilisierten *Clostridium*-Zellen erfolgen (*in situ*), ohne die metabolische Aktivität der Zellen zu beeinträchtigen. Die *in-situ*-Anwendung des Gas-Stripping-Verfahrens in einem Festbett-Bioreaktor mit immobilisierten *C. acetobutylicum*-Zellen zeigte im Vergleich zur Prozessführung mit der Nachbehandlung der Fermentationsbrühe eine um 54,7 % erhöhte Glukoseumsetzung und eine gesteigerte Produktivität von n-Butanol (Park, Okos, & Wankat, 1991).

Die Reduktion der n-Butanolinhibierung durch die Kopplung von ABE-Fermentation und Gas-Stripping führt zur erhöhten Produktivität und Ausbeute der Lösungsmittel. Die verbesserte Ausbeute ist möglich, da das Gas-Stripping keine intermediären Produkte der ABE-Fermentation entfernt (N. Qureshi & Blaschek, 2000). Die Essig- und Buttersäure werden fast vollständig in Lösungsmittel umgewandelt (Maddox et al., 1995). Von den getesteten Gasen (N_2 , O_2 und CO_2) eignet sich Stickstoff (N_2) mit einem Stoffübergangskoeffizient von $17,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ für das Entfernen von n-Butanol mittels Gas-Stripping am besten (Liao, Lu, & Li, 2014). Molekularer Sauerstoff sowie Kohlenstoffdioxid sind für *in-situ*-Gas-Stripping-Anwendungen aufgrund des anaeroben Stoffwechsels von Clostridien bzw. der Erhöhung des pH-Wertes durch die CO_2 -Zugabe nicht einsetzbar.

2.4.5 Adsorption

Die Adsorption ist ein Trennverfahren, das auf der Affinität eines zu adsorbierenden Stoffes (Adsorptiv) aus Gasen oder Flüssigkeiten zum festen

Adsorbens basiert. Bei der physikalischen Adsorption findet der Adsorptionsprozess an der Grenzfläche beider Phasen (flüssig-fest) statt. Anders als bei der chemischen Adsorption werden Adsorptive nicht durch chemische, sondern durch schwache Van-der-Waals-Kräfte an ein Adsorbens gebunden, was der Adsorptionsenergie von 4–40 kJ mol⁻¹ entspricht. Die geringe Adsorptionsenergie erfordert einen geringen Energiebedarf für die Desorption des an ein Adsorbens gebundenen Stoffs. Daher wird die Adsorption in der Entwicklung innovativer ABE-Produktionsanlagen und Bioraffinerien als Aufbereitungsmethode für die Trennung von wenig konzentriertem n-Butanol aus der geklärten Brühe genutzt. Im Vergleich zu anderen herkömmlichen Aufbereitungsmethoden stellt die Adsorption die energetisch effizienteste Trennmethode für n-Butanol dar (*Abbildung 2-4*). Die am meisten genutzten Adsorbentien basieren auf Aktivkohle, synthetischen Silikaten und polymerischen Harzen. Ein optimales selektives Entfernen von n-Butanol aus den flüssigen Gemischen und seine spätere energetisch günstige Desorption bedarf einer Optimierung der Adsorptions-/Desorptionsprozesse mit den existierenden Adsorbentien. Adsorptionsharze haben in der Regel eine größere Aufnahmekapazität für n-Butanol als Aktivkohle, doch ihre teure Anschaffung hat die Entwicklung neuer Arten von Aktivkohle hervorgerufen. Aus wirtschaftlich-ökonomischer Sicht sind zyklische Beladungs-/Regenerierungs-Abläufe und eine lange Haltbarkeit der Adsorbentien bei konstanter Aufnahmekapazität erforderlich.

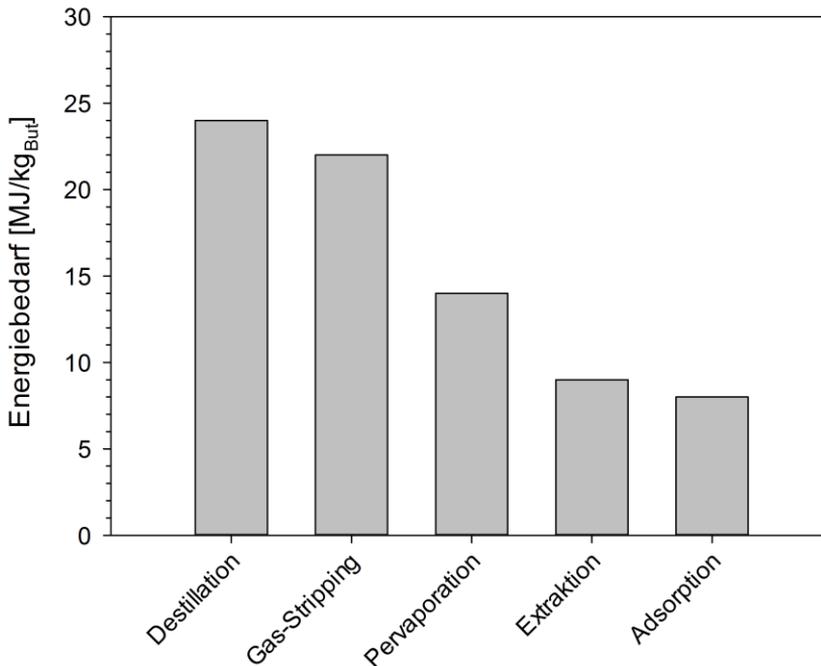


Abbildung 2-4: Vergleich des Energiebedarfs unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden für die Trennung von n-Butanol aus flüssigen Gemischen (umgerechnet in MJ (kgBUT)-1 aus Daten in (N. Qureshi, Hughes, Maddox, & Cotta, 2005))

In der Arbeit von (N. Qureshi et al., 2005), in der verschiedene Adsorbentien wie Silicalite, Harze, Aktivkohle und Polyvinylpyridin auf die Trennung von n-Butanol aus Testmedien getestet wurden, stellten sich Silicalite als ein optimales Adsorbens für das Entfernen von n-Butanol heraus: die Trocknung des Harzes bei 40 °C und das stufenweise Erhitzen der Säule bis auf 150 °C für den Desorptionsprozess von n-Butanol konzentrierte es von 5 gL⁻¹ im Feed auf 790–810 gL⁻¹ (maximale Adsorptionskapazität 97 mgg⁻¹) auf. Ein Vergleich über die Adsorptionskapazitäten einiger Adsorbentien ist in *Tabelle 2-4* dargestellt. Nach Einschätzungen der Autoren wird bei dieser Heizungsart weniger Energie verbraucht als bei einem konstanten Temperaturprofil.

Am Beispiel des makroporösen Adsorptionsharzes KA-I wurde gezeigt, dass die Adsorption von n-Butanol an das Harz temperaturabhängig ist und in keinem Zusammenhang mit der Konzentration von n-Butanol im Feed steht (Kujawska et

al., 2015; Lin et al., 2012). Die maximale adsorbierte Menge von n-Butanol betrug 139 mgg⁻¹ bei 10 °C und 304 mgg⁻¹ bei 37 °C.

Tabelle 2-4: Überblick einiger Adsorbentien für die selektive Trennung von n-Butanol. (Einige Daten wurden aus veröffentlichter Arbeit von (Kujawska et al., 2015) übernommen)

Adsorbens	Max. Adsorptionskapazität [mg g⁻¹]	Verweis
KA-I	304	(Lin et al., 2012)
Silicalite	97	(N. Qureshi et al., 2005)
High silica zeolite CBV28014	116	(Oudshoorn et al., 2009)
ZSM-5	160,8	(Takeuchi, Lwamoto, Miyata, Asano, & Harada, 1995)
XAD-2	78	(Groot & Luyben, 1986; N. Qureshi et al., 2005)
XAD-4	100	(N. Qureshi et al., 2005)
XAD-8	66	(Groot & Luyben, 1986; N. Qureshi et al., 2005)
XAD-16	75	(Ennis et al., 1987)
MEL3-6	222,24	(Sharma & Chung, 2011)
Dowex OPTipore L-493	Ca. 300	(Wiehn et al., 2014)
Polyvinylpyridin	68	(Yang, Tsai, & Tsao, 1994)
ZIF-8	Ca. 300	(Remi, Baron, & Denayer, 2012)
AC 207C	270	(Goerlitz et al., 2018)

Tabelle 2-4 (Übertrag)

CAL TR

381

(Goerlitz et al., 2018)

Die Selektivität sowie die optimalen Adsorption-/Desorptionsprozesse einzelner Adsorbentien werden in Modellmedien und in Wasser-n-Butanol-Aceton-Ethanol-Systemen oft ohne Essig- und Buttersäure untersucht bzw. ermittelt. Die reale Kopplung von ABE-Fermentationen und adsorptiven Trennverfahren kann unvorhersehbare Folgen auf die Fermentation haben und zu einer außerplanmäßigen Unterbrechung des Prozesses führen (Groot & Luyben, 1986).

Die Wahl des optimalen Adsorbens ist von der Prozessführung, der Konzentration des n-Butanols in der Brühe und von deren Vorbehandlungsmethode, von der Zeit der Aufarbeitung (on-line oder *ex situ*) und von anderen Faktoren abhängig. Das Polyvinylpyridin-Adsorbens bindet das n-Butanol schnell, wird dagegen mit Methanol zur Desorption behandelt (Yang et al., 1994) und später mit Wasser gespült sowie anschließend getrocknet werden müssen, bevor es wiederverwendet werden kann. Dies würde seine Verwendung in einem on-line Aufbereitungsmodul bei kontinuierlichen Fermentationen erschweren. Silicalit adsorbiert Butanol ab einer Konzentration von 5 gL^{-1} im Gemisch und bedarf keiner komplizierten Desorption des n-Butanols (N. Qureshi et al., 2005). Es ist allerdings in seiner Anschaffung teuer.

Der Adsorptions-/Desorptionsmethode werden dementsprechend drei Nachteile zugeschrieben: (i) die teure Anschaffung von Adsorbentien wie Harzen und synthetischen Silikaten, (ii) eine zum Teil komplizierte und vergleichsweise teure Desorption der an das Adsorbens gebundenen Stoffe (z. B. das Polyvinylpyridin-Adsorbens), (iii) die Notwendigkeit, dass die Gemische vor der Adsorption von den Zellen befreit werden. Trotz aller Nachteile ist das Adsorptionsverfahren eine selektive und effiziente Aufbereitungsmethode für die Produkte von ABE-Fermentationen.

2.5 Mathematische Modellierung

2.5.1 Simulation von stationären Zuständen einer Kaskade

Der Simulator ist ein agentenbasiertes mathematisches Modell auf Struktur der objektorientierten Programmierung. Er wurde für die Beschreibung und Modellierung möglicher Ergebnisse der ABE-Fermentationen mit *C. acetobutylicum* in kontinuierlicher Rührkesselkaskade programmiert.

Unter Annahme empirischer kinetischer Gesetze für die Produktion und den Verbrauch extrazellulärer Metaboliten und des Zellwachstums sowie ohne Berücksichtigung intrazellulärer Metabolite wurde zwischen drei Biomasse-Subpopulationen mit individuellen metabolischen Eigenschaften unterschieden, nämlich acidogenen (A), intermediären (I) und solventogenen (S) Zellen. Die Entwicklung der Metabolitenkonzentrationen in jedem Bioreaktor wurde durch iterative Berechnungen der inkrementellen Änderungen der Metabolitenkonzentrationen in jeder Bioreaktorstufe simuliert (K. Karstens, Trippel, & Götz, 2016). Experimentelle Daten von drei der vier Betriebsbedingungen ($D = 0,042 \text{ h}^{-1}/\text{pH}_1 = 5,6$; $D = 0,042 \text{ h}^{-1}/\text{pH}_1 = 4,3$; $D = 0,092 \text{ h}^{-1}/\text{pH}_1 = 4,3$) wurden zur Parameterschätzung des mathematischen Modells genutzt. Der vierte Datensatz ($D = 0,092 \text{ h}^{-1}/\text{pH}_1 = 5,6$) war für die Modellvalidierung reserviert. Durch manuelles Anpassen der Parameter des kinetischen Modells wurde der simulierte stationäre Zustand den experimentellen Datensätzen angenähert (K. Karstens et al., 2016).

Der hier etablierte Simulator ist in der Lage, die simulierten Daten graphisch darzustellen und zu speichern. Darüber hinaus überprüft das Programm in jedem Iterationsschritt, ob ein stationärer Zustand erreicht wurde. Prüfkriterium hierbei ist, dass die Konzentration der Metaboliten in allen Bioreaktorstufen für eine Bioreaktorstufen-Verweilzeit $i.D$ unverändert ist ($\epsilon = 0,01$). Ist ein stationärer Zustand erreicht, wird dies und die Zeit bis zum Erreichen des Zustands (als Vielfaches von $i.D$) ausgegeben. Nach einer Verweilzeit nach Erreichen des stationären Zustands oder nach Ablauf der maximalen Simulationszeit $m.tEND$ wird die Simulation beendet. Die simulierten Daten werden entsprechend der Vorgaben graphisch dargestellt und gespeichert.

Zunächst war es das Ziel, stationäre Metabolitenkonzentrationen in den einzelnen Bioreaktorstufen bei kontinuierlichem Betrieb der Kaskade zu simulieren. Die folgenden Konzentrationen – Biomasse (X), Glukose (GLU), Aceton (ACT), Ethanol (ETH), Butanol (BUT), Essigsäure (AA), Buttersäure (BA) und KH_2PO_4 (PO4) – sowie der pH-Wert (pH) sollten hierbei betrachtet werden und stellen damit die Zielgrößen der Simulation dar. Die Parameter und Funktionen, die bei der Etablierung des Modells vorgesehen wurden, unterteilen sich in drei Gruppen (vgl. *Abbildung 2-5*). Die Simulationsparameter, d. h. die Startzeit (t_0), die Simulationsdauer (t_{END}) und das Zeitinkrement der Simulation (dt), werden in der Funktion `model_parameters` festgelegt. Die Konfiguration der Bioreaktorkaskade – dazu zählen z. B. die Zahl der Bioreaktorstufen (nb) und das Volumen einer Bioreaktorstufe (V_{seg}) – sowie die Konzentration der Metaboliten zu Beginn der Simulation (c_{initial}) werden durch die Funktion `initial_parameters_from_Steady_State(file.xlsx)` an die Simulation übermittelt. Diese Funktion übernimmt einen Teil der Parameter aus experimentellen Datensätzen, die in dem durch das `Template_SteadyState.xlsx` vorgegebenen Format bereitgestellt werden müssen.

Ein kinetisches Modell, das die Wachstumsraten und die Substrataufnahme- bzw. Produktbildungsraten der einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von den aktuellen Metabolitenkonzentrationen berechnet, ist die dritte Stellgröße der Simulation. Das kinetische Modell wird in Form eines Skriptes übergeben, z. B. `biological_model7_kinetics.m` (siehe Anhang Seite 134). Zusätzlich werden die für die Berechnungen benötigten Parameter, wie z. B. μ_{max} (`mu_max`) oder der Ausbeutekoeffizient Y_{X/PO_4} (`Y_xp`), in einer zum kinetischen Modell gehörigen Funktion vorgegeben. Im Beispiel ist dies `biological_model7_parameters.m` (siehe Anhang S. 136). Hierbei werden Parameter unterschieden, die vom metabolischen Zustand der Zellen (`state`) abhängig bzw. unabhängig sind.

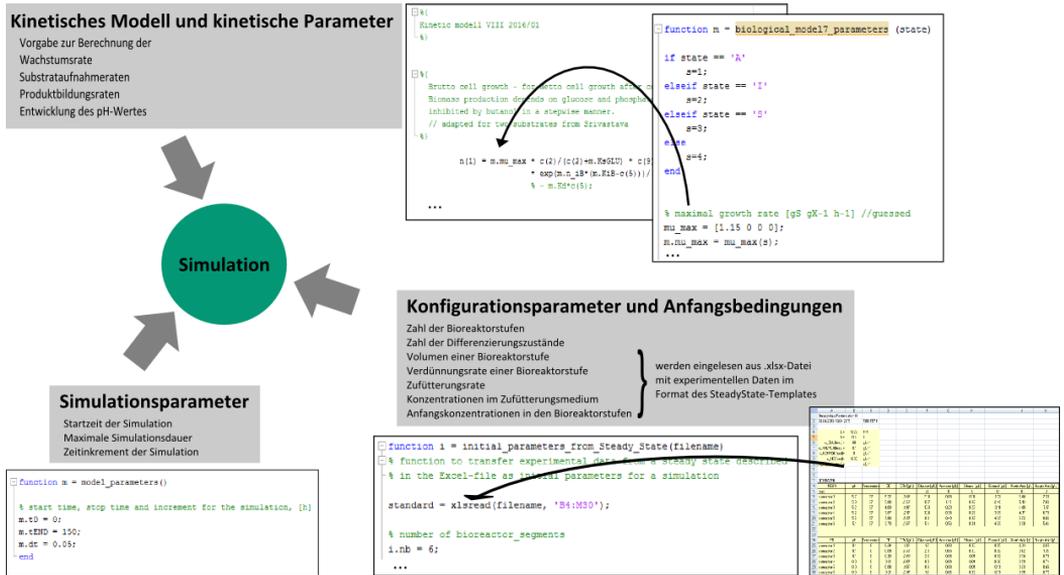


Abbildung 2-5: Stellgrößen der Simulation

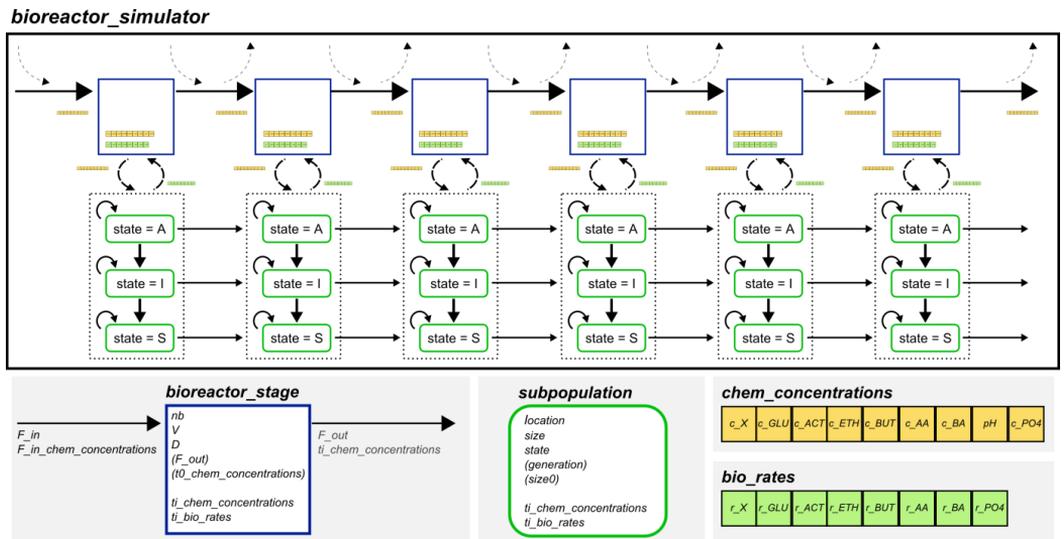


Abbildung 2-6: Quelle: Architektur des Simulators der kontinuierlichen mehrstufigen Kaskade (K. Karstens et al., 2016)

Zur weiteren Optimierung des mathematischen Modells wurden folgende Änderungen bzw. Ergänzungen vorgenommen: (I) Zugabe eines butanol- und glucoseabhängigen Lyseterms, der die subpopulationsunabhängige Zelllyse in Gegenwart hoher Butanolkonzentrationen und Glucosebegrenzungen berücksichtigt; (II) Ermöglichung des Wachstums der intermediären und lösungsmittelbildenden Zellen zusätzlich zum Wachstum in der acidogenen Phase; (III) Flexibilisierung der Kohlenstoffbilanz durch Einführung des Parameters s_k , der mögliche zusätzliche Kohlenstoffquellen berücksichtigt, die durch den Hefeextrakt oder den Kohlenstofffluss in zusätzliche Produkte eingeführt werden (Katja Karstens, Trippel, & Götz, 2021).

3. Forschungsfragen und Projektziel

In dieser Arbeit wird eine Methodik zur Optimierung von ABE-Fermentationen in kontinuierlichen mehrstufigen Fermentationssystemen und zur Erstellung eines mathematischen Modells für die Simulation der in diesem Fermentationssystem stattfindenden metabolischen Prozesse vorgeschlagen.

Im Rahmen der aktuellen Arbeit wird eine Kaskade aus sechs Rührkesseln als Fermentationssystem bestimmt. Durch flexible Konfigurationsmöglichkeiten der Kaskade werden Kenntnisse über kontinuierliche mehrstufige ABE-Fermentationen mit *C. acetobutylicum* erlangt.

Zusammenfassend werden die Ziele der angewandten Forschung wie folgt definiert:

- a. Funktionalität und Robustheit des Fermentationssystems in Form einer Rührkesselkaskade für langwierige, kontinuierliche ABE-Fermentationen mit suspendierten *C.-acetobutylicum*-Bakterienzellen sollen gezeigt werden.
- b. Es sollen Auswirkungen verschiedener pH_1 -Werte und verschiedener Verdünnungsraten D auf die Produktivität der Rührkesselkaskade hinsichtlich der Lösungsmittelbildung erforscht werden.
- c. Die Auswirkungen z. B. einer Acetatzugabe zum ABE-Fermentationsprozess und die Änderungen der Konfiguration in Form einer Rückführung der Fermentationsbrühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor der Kaskade sollen untersucht werden.
- d. Die experimentellen Daten aus der Rührkesselkaskade wurden für die Erstellung und Optimierung des mathematischen Modells verwendet. Ferner wurden in der Rührkesselkaskade die Ergebnisse von Simulationen im Hinblick auf die Produktivitätssteigerung ausgewertet. Das Modell ist kein Teil dieser Dissertation. Es wurde im Rahmen dieses Projekts von Frau Dr. rer. nat. Katja Karstens programmiert. Die Ergebnisse der Fermentationen, die aus den Ergebnissen der Simulation hergeleitet wurden, wurden zur Validierung des mathematischen Modells verwendet.

1. *Wird in kontinuierlichen Fermentationen in einer Rührkesselkaskade die Butanolinhibierung der Bakterienzellen aufgrund der Verteilung der metabolischen Phasen des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* entlang der Rührkesselkaskade verhindert?*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten kontinuierliche Fermentationen von *C. acetobutylicum* in einem mehrstufigen Bioreaktorsystem – einer Kaskade – erprobt werden. Es sollte gezeigt werden, dass eine Verteilung von metabolischen Phasen des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* entlang der Kaskade existiert. Durch die Wahl verschiedener Verdünnungsraten D und pH_1 -Werte sollte die Butanolinhibierung der Zellen in den vorderen Bioreaktoren der Kaskade verhindert bzw. die Butanolproduktion untersucht werden.

Die Verwendung einer Kaskade ermöglicht Einstellungen hoher Flussraten. Das impliziert zum einen eine Vermeidung der Butanolinhibierung und zum anderen schnelles Wachstum der Zellen im ersten Bioreaktor der Kaskade durch die Wahl von Prozessparametern für optimales Wachstum der Zellen. Somit soll ein Auswaschen des Bioreaktors bei konstant hohen Flussraten umgangen werden.

2. *Welchen Effekt haben Änderungen in der Verdünnungsrate D oder des pH_1 -Wertes in kontinuierlichen mehrstufigen Fermentationen auf die Lösungsmittelbildung?*

Untersuchungen der Lösungsmittelbildung in den Suspensionskulturen *C. acetobutylicum* mit Änderung der Verdünnungsrate D oder des pH_1 -Werts in kontinuierlichen mehrstufigen Fermentationen sind aus bioverfahrenstechnischen Gründen interessant, zumal ihre Auswirkungen auf die immobilisierten *C.-acetobutylicum*-Bakterienzellen bereits beschrieben wurden (Raganati et al., 2013).

3. *Bewirkt die Acetatzugabe eine Steigerung der Lösungsmittelproduktivität?*

Weiterhin wurde gezeigt, dass am Beispiel von *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 eine Acetatzugabe eine Steigerung der Lösungsmittelproduktivität bewirkt (Gao, Tashiro, Wang, Sakai, & Sonomoto, 2016). Der Acetatzugabe zu ABE-Fermentationen wird eine relevante Rolle bei der Erhöhung der Lösungsmittelproduktivität zugeschrieben (Gao et al., 2016; Luo et al., 2016). Die Autoren berichten über die gesteigerte Produktivität von Enzymen, die an der

Aufnahme von Acetat und der Bildung von Aceton und Butanol beteiligt sind, wenn dem Fermentationsmedium Acetat zugefügt wird.

Um den früher für ein pH-Stat beschriebenen positiven Effekt des Acetats auf die Lösungsmittelbildung von *C. acetobutylicum* (Gao et al., 2016) in der Rührkesselkaskade zu untersuchen, wurden Experimente mit einer Acetatzugabe in den zweiten Bioreaktor der Kaskade durchgeführt.

4. *Kann eine Butanolzugabe die Butanolbildung in C. acetobutylicum induzieren?*

Nach Stefan Junne soll eine Butanolzugabe in der acidogenen Phase des Stoffwechsels die Butanolbildung in *C. acetobutylicum* induzieren (Stefan Junne, 2010). In kontinuierlichen Fermentationen in einer Kaskade kann eine Butanolzugabe durch die Konfigurationsänderung der Kaskade umgesetzt werden. Dafür wird die Fermentationsbrühe aus einem Reaktor mit solventogenen Zellen in einen Reaktor mit acidogenen Zellen zurückgeführt.

Des Weiteren sollen Fermentationsdaten für das auf der Struktur der objektorientierten Programmierung basierende agentenbasierte mathematische Modell zur Modellierung der Verteilung der hypothetischen Subpopulation von *C. acetobutylicum* in unterschiedlichen Stufen kontinuierlicher Rührkesselkaskade verwendet werden. Dafür werden Informationen über die Verweilzeitverteilung und die Umstellung des Stoffwechsels benötigt, die durch praktische Umsetzung der Fermentationsvorgänge gewonnen werden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien

Die während der praktischen Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der unten dargestellten Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4-1 Chemikalienliste

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Aceton	≥ 99,7 % (GC)	Carl Roth GmbH + Co. KG
p-Aminobenzoesäure		Sigma-Aldrich
L-Asparagin	99 %	Alfa Aesar GmbH & Co. KG
Biotin	≥ 98,5 %, Ph. Eur	Carl Roth GmbH + Co. KG
Butanol	Min. 99,8 % (GC)	Merck KGaA
CaCO ₃	reinst	Merck KGaA
Essigsäure	100 %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG
FeSO ₄ x7H ₂ O	≥ 99,0 %, p. a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glukose Monohydrat	Für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt	Art.-Nr. 2363.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
HCl	32 %, p. a., ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG
K ₂ HPO ₄	≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
KH ₂ PO ₄	98,0–101,0 %	Merck KGaA
Methanol	≥ 99,5 % (GC)	Carl Roth GmbH + Co. KG
MgSO ₄ x7H ₂ O	≥ 48 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
MnSO ₄ xH ₂ O	Min. 99,0–101,0 %	Merck KGaA

Tabelle 4-1 (Übertrag)

NaCl	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ammoniaklösung 25 % (NH ₄) ₂ SO ₄	25 %, z. A. ≥ 99 %, krist.	Merck KGaA Carl Roth GmbH + Co. KG
Resazurin (0,1 % (v/v)) 1-Propanol	> 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Demineralisiertes Wasser (VE)		

4.2 Geräte

MiniSpin®-Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

RQflex®-10-Reflektquant®-Messgerät (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

MQuant™-Teststäbchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Gaschromatograph GC-14B-FID (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan)

Autoinjektor AOC 20i (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan)

Säule: Kapillarsäule Zebron ZB-FFAP, Phenomenex Inc.; Länge 50 m, I. D. 0,32 mm, Filmdicke 0,50 µm; Temperaturlimits: Minimum 40 °C, Maximum 250 °C/260 °C (Isothermisch/Gradientenprogramm)

Vorsäule: Zebron Guard Column Kit, Phenomenex Inc.; Länge 5 m, I. D. 0,32 mm, Polyimide Resin Glue; Temperaturlimits: Minimum -60 °C, Maximum 340 °C

Liner: SGE FocusLiner™; SH14 I.D. 3,4 mm; TAPFOCUS PKT5; Split/Splitless

1,5-mL-Rotilabo®-Gewindefläschchen mit Mikroinserten

4.3 Software

GCSolution-Software (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan)

SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)

Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

4.4 Medien

Für Erstellung der Sporenbank wurden frisch angesetzte *C. acetobutylicum* DSM 792 der ‚Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH‘ (DSMZ) bis zum Erreichen einer exponentiellen Wachstumsphase zuerst im Clostridium Growth Medium (CGM) nach (Wiesenborn, Rudolph, & Papoutsakis, 1988) kultiviert. Um den Sauerstoffausschluss zu gewährleisten, wurde das *CGM* zunächst eine Stunde lang mit Stickstoff begast. Dafür wurde der Schlauch, durch den das Gas mit $0,4 \text{ mL h}^{-1}$ fließt, in das Medium getaucht, sodass die aufsteigenden Gasblasen zu sehen waren. Die exponentielle Wachstumsphase wurde sichtbar durch aktive Schaumbildung über dem Medium. Das *CGM* wurde wie folgt definiert (Angaben für 1 Liter Medium): Glukose 50 g; K_2HPO_4 0,75 g; KH_2PO_4 0,75 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,71 g; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; NaCl 1 g; L-Asparagin 2 g; Hefeextrakt 5 g (Appendix, Seite 131). Der pH-Wert 6,9 wurde mit HCl eingestellt. Die Zugabe von $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ und Glukose erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums, um das Ausfallen von Metallen und die Bildung von Maillard-Produkten zu vermeiden.

Nach einer 24 Stunden langen Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank befinden sich die Zellen in der Regel in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurden 30 mL Medium mit aktiven vegetativen Zellen in 270 mL des mit N_2 entlüfteten Minimalmediums (MS-Medium) überführt und einschließlich fünf Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ weiter inkubiert. Die Zusammensetzung des MS-Mediums für 1 Liter: Glukose 60 g; K_2HPO_4 0,55 g; KH_2PO_4 0,55 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g; Essigsäure 2,3 mL; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,011 g; NaCl 1 g; p-Aminobenzoessäure 0,008 g; Biotin 80 μg ; CaCO_3 2 g (Appendix, Seite 130). Der pH-Wert 6,5 wurde mit NH_4 eingestellt. Nach der Inkubationsperiode lagen freie Sporen in der Brühe in großer Zahl vor. Das gesamte Volumen der die Sporen enthaltenen Brühe wurde in 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit Deckel verteilt (50 mL in jedes Zentrifugenröhrchen)

und bei 5000 x g 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 2,5 mL *CGM* je Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Die Sporensuspensionen wurden vereint und je 500 µL der homogenisierten Sporensuspension wurden in 1,5-mL-Eppendorfggefäße pipettiert. Anschließend wurden die Eppendorfggefäße bei -20 °C gelagert.

Für jede Fermentation wurde ein 1,5-mL-Eppendorfggefäß mit 500 µL Sporensuspension zehn Minuten lang bei 80 °C in einem Wasserbad erhitzt. Der Hitzeschock dient zur Abtötung der in der Sporensuspension gebliebenen vegetativen Zellen, die das pSOL1-Plasmid verloren haben können. Nach dem Hitzeschock wurden 500 µL Sporensuspension in 50 mL *CGM* pipettiert, das vorausgehend eine Stunde lang mit Stickstoff begast wurde. Die angesetzte Vorkultur wurde 24 Stunden lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Da die Zusammensetzung des Fermentationsmediums sich von der des *CGM* unterscheidet, wurde der Mikroorganismus an das Fermentationsmedium adaptiert, um lange Lag-Phasen während der Fermentationen zu vermeiden. Die Adaptierung erfolgte durch das Überimpfen (10 % (v/v)) der 24 Stunden lang im *CGM* gewachsenen Zellen in das mit Stickstoff begaste komplexe Medium. Das komplexe Medium für die Adaptierung der *C.-acetobutylicum*-Zellen besteht aus folgenden Komponenten (für 1 Liter): Glukose 50 g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g; MnSO₄ x H₂O 0,1 g; FeSO₄ x 7H₂O 0,1 g; Hefeextrakt 5 g (Appendix, Seite 132). Der pH-Wert 6,9 wurde mit HCl eingestellt.

- a) Für die Batch-Fermentationen wurden 10 mL der im *CGM* gewachsenen Zellen zu 90 mL des mit N₂ begasten Fermentationsmediums in einer 500-mL-Flasche zugegeben und für 12,5 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor sie in den Bioreaktor überführt wurden.
- b) Für die kontinuierlichen Fermentationen wurden 4,5 mL der im *CGM* gewachsenen Zellen zu 45 mL des mit N₂ begasten komplexen Mediums zugegeben und 13 Stunden lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor sie in den Bioreaktor überführt wurden.

Das Volumen des Inokulums machte 10 % (v/v) des Arbeitsvolumens des Bioreaktors aus.

4.5 Batch-Fermentationen

Die Vorbereitung der Vorkultur für Batch-Fermentationen hat sich von der Vorbereitung für kontinuierliche Fermentationen nur in der Glukosekonzentration des Adaptionmediums unterschieden: Statt 50 gL^{-1} für kontinuierliche Verfahren wurden 60 gL^{-1} Glukose verwendet. Das Fermentationsmedium wurde im Bioreaktor (Biostat M, B. Braun Melsungen AG) bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 Minuten sterilisiert. Glukose, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ wurden steril mithilfe von Einwegspritzen (B. Braun SE) und $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ steriler Filter nach der Sterilisierung des Bioreaktors zugegeben, um einerseits die Maillard-Reaktion und andererseits das Ausfallen der Metall-Ionen zu vermeiden. Nach einer Stunde Begasung mit N_2 mit $0,1 \text{ L h}^{-1}$ wurde das Inokulum in den Bioreaktor überführt und die Fermentation gestartet. Die Rührerdrehzahl wurde auf 100 min^{-1} eingestellt und der Bioreaktor wurde mit $0,1 \text{ L h}^{-1}$ N_2 begast. Mithilfe von S-Monovette[®]-Kanülen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) und Membran-Adaptoren (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurden stündlich Proben genommen.

4.6 Kontinuierliche Fermentationen

Die kontinuierlichen Fermentationen wurden als Batch-Fermentationen gestartet, um die notwendige Biomassekonzentration für den kontinuierlichen Prozess zu erreichen. Dabei war die Zusammensetzung des Mediums für die Batch-Phase dieselbe wie für den Adaptierungsschritt der Vorkultur. Der erste Bioreaktor der Rührkesselkaskade wurde während der Batch-Phase von der Kaskade entkoppelt, indem der Überlaufschlauch zwischen dem ersten und dem zweiten Bioreaktor mit einer Klemme geschlossen wurde. Der erste Bioreaktor wurde mit 400 mL Medium, bestehend aus 5 gL^{-1} Glukose, 5 gL^{-1} Hefeextrakt, $0,01 \text{ gL}^{-1}$ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und $0,01 \text{ gL}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, gefüllt (Appendix, Seite 132) und der Bioreaktor wurde eine Stunde lang mit technischem Stickstoff ($0,4 \text{ mL h}^{-1}$) begast. Das Inokulum (50 mL) wurde über einen Schlauch in den Bioreaktor überführt, indem in der Inokulumflasche ein leichter Stickstoffüberdruck erzeugt wurde. Die Stickstoffbegasung wurde über den gesamten Fermentationsvorgang durchgeführt. Nachdem die Biomasse die $\text{OD}_{600} 2$ erreicht hatte, wurde die Klemme vom Überlaufschlauch gelöst und mit

der Zugabe des frischen Mediums in den ersten Bioreaktor gestartet. Das komplexe Medium für die kontinuierliche Fermentation unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung nicht von der des komplexen Mediums für die Adaptierung, die Glukosekonzentration wurde jedoch auf 60 gL^{-1} erhöht und die KH_2PO_4 -Konzentration auf $0,1 \text{ gL}^{-1}$ gesenkt, um die kontinuierliche Kultur zu stabilisieren (Vasconcelos et al., 1994a) und die Glukoseaufnahme zu steigern, damit die inhibierte Sporulation und dementsprechend der Stoffwechselweg von *C. acetobutylicum* bei einem pH-Wert unter 5 aufrechterhalten werden konnten (Hubert Bahl et al., 1982, 1983).

4.6.1 Aufbau der Rührkesselkaskade

Der Rührkesselkaskade liegt folgende Überlegung zugrunde: Werden die sich in einem Batch zeitlich entwickelnden metabolischen Ereignisse räumlich voneinander getrennt und in unterschiedlichen Rührkesseln einer Rührkesselkaskade kontinuierlich getrieben, so wird die solventogene Phase ununterbrochen mit Säuren acidogener Phase versorgt und damit die kontinuierliche Lösungsmittelbildung ermöglicht (Abbildung 4-1).

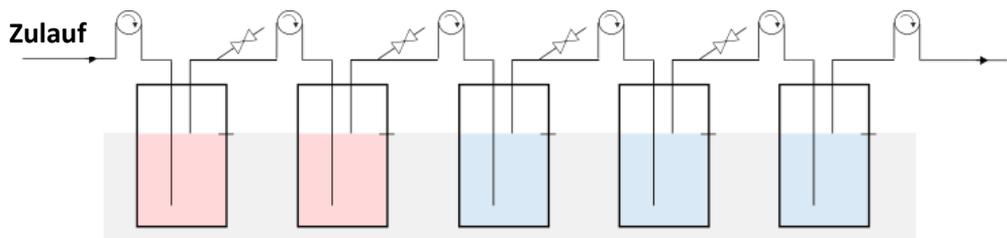


Abbildung 4-1: Eine theoretisch mögliche Verteilung der metabolischen Phasen von *C. acetobutylicum* in einem mehrstufigen Fermentationssystem

Mit steigender Anzahl der Stufen eines kontinuierlichen Fermentationssystems sollen Prozessführungen mit höheren Verdünnungsraten D für eine erhöhte Produktivität und gleichzeitig für einen besseren Substratverbrauch von Clostridien ermöglicht werden. Es wird angenommen, dass Zellen in den einzelnen Stufen des Fermentationssystems der inhibierenden Wirkung des Butanols weniger ausgesetzt werden, sodass sie ihre metabolische Aktivität und Zellteilung über lange Zeitperioden unverändert aufrechterhalten können.

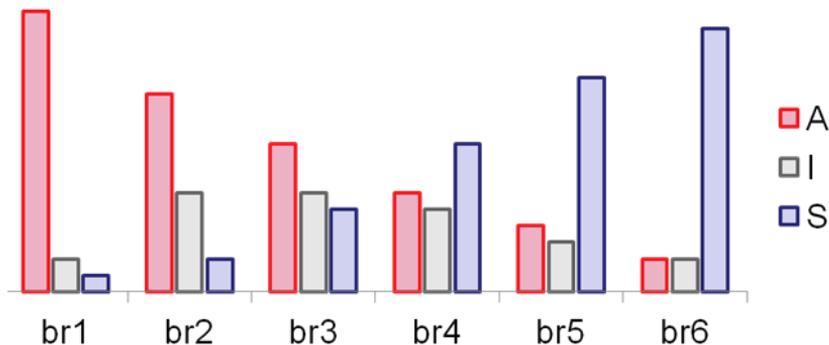


Abbildung 4-2: Eine mögliche Verteilung von Subpopulationen der suspendierten *C. acetobutylicum*-Zellen im mehrstufigen Fermentationssystem

Um die Auswirkungen der räumlichen Trennung der drei metabolischen Zustände von *C. acetobutylicum* (acidogen, intermediär und solventogen) zu verstehen, wurde eine Kaskade mit sechs Bioreaktoren (Stufen) verwendet (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5). Eine große Anzahl von Bioreaktoren in einer Kaskade ermöglicht eine hohe Auflösung der morphologischen und metabolischen Änderungen der Bakterienzellen in der Kaskade (Abbildung 4-2). Auf der anderen Seite ist der Betrieb mehrstufiger Kaskaden jedoch mit hohem Aufwand verbunden. Insgesamt wurde eine Kaskade aus sechs Bioreaktoren als optimal für die Durchführung von Experimenten angenommen. Mit verschiedenen Verdünnungsraten und Volumina kann die Auflösung der metabolischen Ereignisse für ihre mathematische Charakterisierung optimiert werden. Gleichzeitig ist es möglich, die optimalen Fermentationsparameter zu bestimmen. Das Fermentationsvolumen jedes Bioreaktors war gleich und wurde so gewählt, dass die entnommene Probe einen unwesentlichen Anteil der Brühe im Bioreaktor ausmachte. Dem Aufbau der Rührkesselskaskade waren Versuche im 2-Rührkesselsystem vorausgegangen, die für die Optimierung der technischen Ausführung ausgelegt waren (die Daten werden in dieser Arbeit nicht näher beschrieben). Das zweistufige Rührkesselsystem bestand aus zwei 1-L-Glasflaschen mit einem magnetischen Rührstab in jeder Flasche. Zudem befanden sich die Flaschen in einem Temperierbad, um die Temperatur auf 37 °C zu halten. Unter das Temperierbad wurden Magnetrührer gestellt, um die magnetischen Rührstäbe in den Flaschen zum Rotieren zu bringen. Die Flaschen wurden zudem dicht mit Deckeln verschraubt, um

Luft eintritt in die Flaschen zu vermeiden. Jeder Deckel hatte Fittings (Tüllen) für ein Überlaufrohr, die Probenahme, Gas-Ein- und -Austritt und Mediumzufuhr/Inokulum. Die Flaschen wurden durch einen Überlaufschlauch am Überlaufrohr des Deckels der ersten Flasche und an der Verbindungsstelle des Deckels der zweiten Flasche miteinander verbunden. Das System diente der Validierung der technischen Ausführung der Mediumzufuhr/des Inokulum, der Brühbeförderungstechnik zwischen den Flaschen und der Probenahmen. Nach einem erfolgreichen Machbarkeitstest wurde eine Rührkesselkaskade nach dem gleichen Bauprinzip gebaut.

Jeder Bioreaktor der Rührkesselkaskade wurde mit 400 mL Fermentationsbrühe betrieben. Nach den Ergebnissen der Batch-Fermentationen mit und ohne pH-Regulierung soll der pH-Wert seine natürliche Dynamik entlang der Rührkesselkaskade erfahren, um die Lösungsmittelbildung zu begünstigen (die Begründung ist in Kapitel ‚5.1 Batch-Fermentation‘ ausführlich beschrieben). Aus diesem Grund erfolgte die pH-Regelung nur im ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade, die den Fermentationsanfang im Batch darstellte. In anderen Bioreaktoren stellte sich der pH-Wert durch die metabolische Aktivität der Zellen ein. Die Zugabe des frischen Mediums in die Kaskade erfolgte durch den ersten Bioreaktor (*Abbildung 4-3*, *Abbildung 4-5* und *Abbildung 4-7*). In jedem Bioreaktor wurde die Fermentationsbrühe mit Magnetrührstäbchen, getrieben von den Magnetrührern, mit geringer Umdrehungszahl gemischt. Der Labormaßstab der Rührkesselkaskade erlaubte, durch einen konstanten Stickstoffstrom das Volumen in den Bioreaktoren konstant zu halten und gleichzeitig die anaerobe Umgebung für Mikroorganismen zu erhalten. Das Gas wurde mit dem Filter gereinigt, bevor es in die Rührkesselkaskade strömte. Der permanente Stickstoffstrom wurde durch den ersten Bioreaktor in die Kaskade geleitet und durchströmte sie mittels Überlaufrohren, die auf den Deckeln aller Bioreaktoren installiert worden waren. Über die Länge des Überlaufrohrs wurde das Volumen in den Bioreaktoren eingestellt. Durch die Zugabe des frischen Mediums in den ersten Bioreaktor bzw. der Fermentationsbrühe in die nachstehenden Bioreaktoren stieg der Flüssigkeitsspiegel bis zum Überlaufrohr und unterbrach den freien Austritt des Gases aus dem Bioreaktor. Der dadurch gestiegene Gasdruck drückte die überschüssige Menge der Flüssigkeit über das Überlaufrohr aus dem Bioreaktor in den nächsten, bis sie wieder aus der Rührkesselkaskade austrat. Die Bioreaktoren wurden durch Schläuche aus dem für den Sauerstoff nicht permeablen Stoff Ismapren (PharMed®, ISMATEC

Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) miteinander verbunden, durch die die Brühe floss. Jeder Bioreaktor verfügte über eine Möglichkeit zur Probenahme, die mithilfe des S-Monovette®-Systems (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) realisiert wurde. Die Rührkesselkaskade wurde in einem Wasserbad installiert, um Fermentationen bei 37 °C durchführen zu können. Das frische Medium befand sich in einer 20-L-Flasche, die über einen für den Sauerstoff nicht permeablen Schlauch (PharMed®, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) mit dem ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade verbunden wurde (*Abbildung 4-4*).

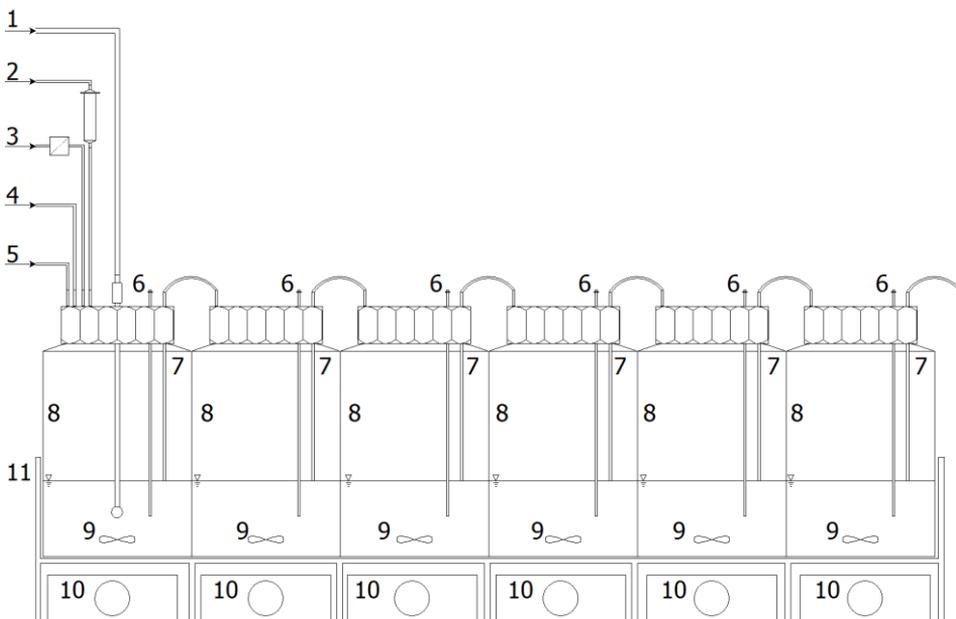


Abbildung 4-3: Die Rührkesselkaskade. 1 – pH-Elektrode; 2 – Medium-Zugabe mit Kontaminationssperre; 3 – N₂-Zufuhr mit Filter; 4 – Säure; 5 – Base; 6 – Probenahme; 7 – Überlaufrohr; 8 – Bioreaktor; 9 – Rührfisch; 10 – Magnetrührer; 11 – Temperierwanne

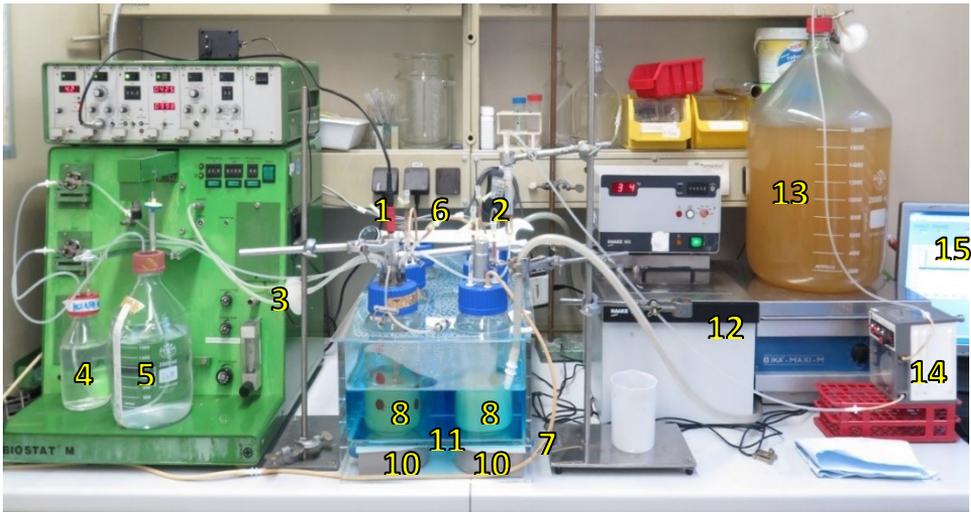


Abbildung 4-4: Aufbau der Rührkesselkaskade. 1 – pH-Elektrode; 2 – Medium-Zugabe mit Kontaminationssperre; 3 – N₂-Zufuhr mit Filter; 4 – Säure; 5 – Base; 6 – Probenahme; 7 – Schlauch vom Überlaufrohr zum Auslauf; 8 – Bioreaktor; 10 – Magnetrührer; 11 – Temperierwanne; 12 – Temperierbad; 13 – Feed-Flasche; 14 – Feed-Pumpe; 15 – Überwachungssystem

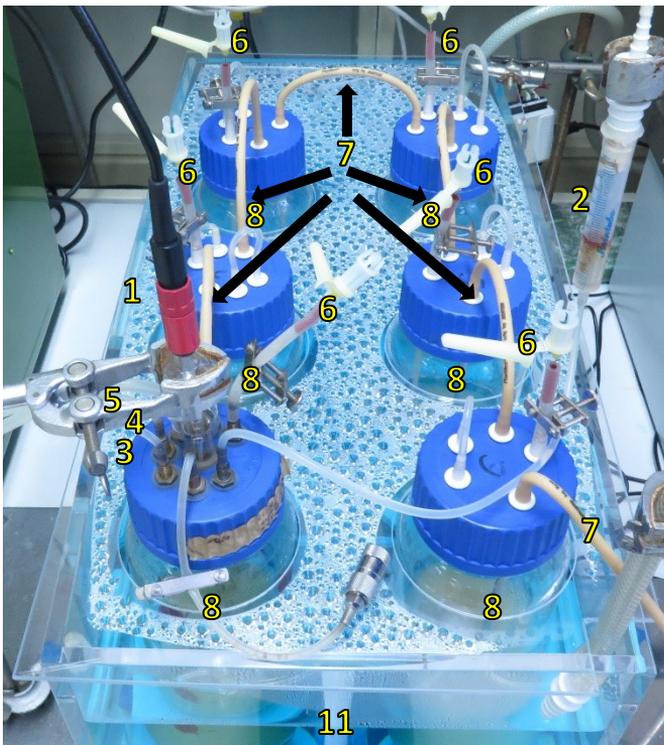


Abbildung 4-5: Rührkesselkaskade, Draufsicht. 1 – pH-Elektrode; 2 – Medium-Zugabe mit Kontaminationssperre; 3 – N₂-Zufuhr mit Filter; 4 – Säure; 5 – Base; 6 – Probenahme; 7 – Überlaufrohr; 8 – Bioreaktor; 11 – Temperierwanne

Das Medium für den kontinuierlichen Betrieb der Rührkesselkaskade wurde in zwei Schritten vorbereitet.

1. Das sterile Medium wurde mittels Stickstoffüberdruck aus 5-L-Flaschen in die sterile 20-L-Flasche überfüllt (Ströme 1 und 2 in *Abbildung 4-6*). In der 20-L-Flasche wurde das Medium mit filtriertem Stickstoff begast, wodurch O₂ aus ihm verdrängt wurde (Ströme 3 und 4a). Nach einer Stunde Begasung wurde das Medium mittels Stickstoffüberdruck in die 20-L-Feed-Flasche umgefüllt (Ströme 4b und 5).
2. In der 20-L-Feed-Flasche wurde ein leichter Überdruck von 0,5 bar eingestellt (Strom 3 in *Abbildung 4-7*). Die Pumpe förderte das sterile und entlüftete Medium durch die Kontaminationssperre in die Rührkesselkaskade.

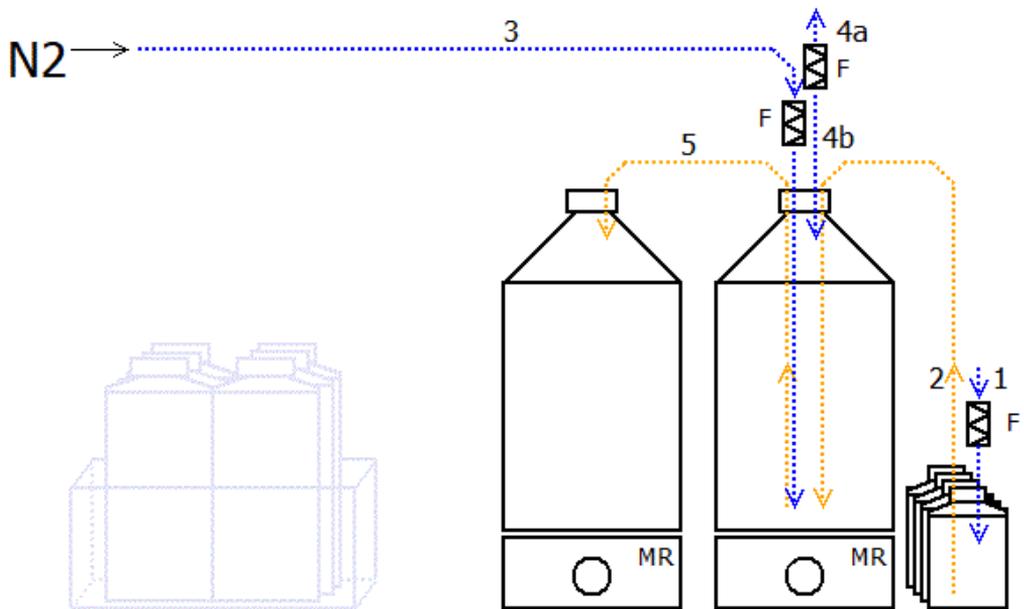


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des sterilen Füllens der Feed-Flasche mit dem Medium und der Entlüftung des frischen Mediums. F – Filter, MR – Magnetrührer, 1 – der Stickstoffstrom zum Umfüllen des Mediums aus 5-L-Flaschen in die 20-L-Flasche, 2 – der Mediumstrom aus 5-L-Flaschen in die 20-L-Flasche, 3 – der Stickstoffstrom zum Begasen des Mediums, 4a – der austretende Stickstoff während des Begasens, 4b – der Stickstoffstrom zum Umfüllen des entlüfteten Mediums aus der 20-L-Flasche in die 20-L-Feed-Flasche, 5 – der Mediumstrom in die 20-L-Feed-Flasche

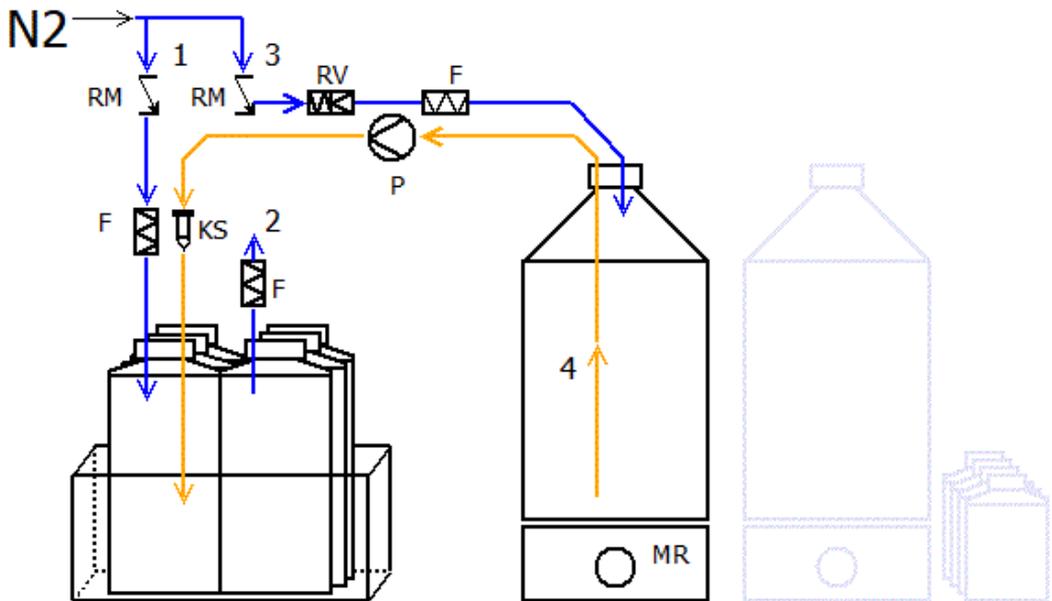


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Zugabe des Mediums in die Rührkesselkaskade. F – Filter, MR – Magnetrührer, P – Pumpe, KS – Kontaminationssperre, RM – Rotameter, RV – Rückschlagventil, 1 – der Stickstoffstrom in die Rührkesselkaskade, 2 – der Stickstoffaustritt aus der Kaskade, 3 – der Stickstoffstrom zur Feed-Flasche, 4 – der Mediumstrom in die Rührkesselkaskade

Zwischen dem Bioreaktor und der Flasche wurde eine Kontaminationssperre angeschlossen (Abbildung 4-8). Dabei handelte es sich um einen Zylinder, der auf der Ober- und Unterseite jeweils Schlauchverbindungsstellen besaß. Das frische Medium aus der Flasche wurde mit einer Peristaltikpumpe von oben in die Kontaminationssperre befördert. Das untere Ende des Zylinders wurde durch einen Schlauch mit dem ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade verbunden. Das eintretende und austretende Volumen war immer gleich, sodass die Kontaminationssperre nie voll wurde. Durch diese präventive Maßnahme gegen eine Kontamination des frischen Mediums wurde der direkte Kontakt des ersten Bioreaktors mit der Flasche mit frischem Medium ausgeschlossen. Der Ablauf aus der Rührkesselkaskade wurde in 20-L-Fässern aufgefangen und für weitere Analytik und Experimente behandelt bzw. aufbewahrt.

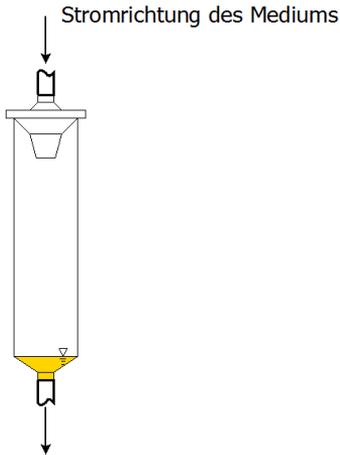


Abbildung 4-8: Kontaminationssperre für das frische Medium

4.7 Analyse chemischer Komponenten der Proben

4.7.1 Bestimmung der Trockenmasse

Für die Bestimmung der Zelltrockenmasse wurden 2-mL-Eppendorf-Gefäße über zwölf Stunden bei 80 °C getrocknet und zwölf Stunden lang im Exsikkator entfeuchtet. Jedes getrocknete Eppendorf-Gefäß wurde mit einer analytischen Waage gewogen und das Gewicht aufgeschrieben. Die Fermentationsproben wurden in den getrockneten Eppendorf-Gefäßen mit 14000 x g acht Minuten lang bei Raumtemperatur in einer MiniSpin®-Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand wurde entnommen und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde nach der Abnahme des Überstands im Trockenschrank bei 80 °C 24 Stunden lang getrocknet und danach für zwölf Stunden in den Exsikkator gestellt. Die Eppendorf-Gefäße mit getrockneten Pellets wurden gewogen, das Gewicht wurde notiert und die Zelltrockenmasse bestimmt als Gewichtsdifferenz der Eppendorf-Gefäße vor und nach der Probenahme.

4.7.2 Glukosebestimmung

Die Glukosebestimmung erfolgte reflektometrisch mit dem RQflex®-10-Reflektquant®-Messgerät (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und MQuant™-Teststäbchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der Messbereich der Teststäbchen liegt zwischen 1 und 100 mgL⁻¹ Glukose. Der Überstand der Proben wurde für die Glukosebestimmung entsprechend mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

4.7.3 Bestimmung der Metaboliten

Der bei der Bestimmung der Trockenbiomasse entnommene Überstand wurde aufgetaut, erneut für fünf Minuten bei 14000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die restliche Biomasse zu entfernen, und in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

200 µL des Überstands wurden zusammen mit 200 µL 1-Propanol (0,5 gL⁻¹) als interner Standard mit Mikroeinsätzen in braune 1,5-mL-Rotilabo®-Gewindefläschchen pipettiert und die Gewindefläschchen wurden mit Deckeln, versehen mit Septum und mit Bohrungen für die Spritzennadel, geschlossen. Die Proben wurden mit GC-FID analysiert.

Es wurden mindestens drei Probenahmen pro stationären Zustand durchgeführt. Berechnete Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen sind in den Tabellen des Abschnittes ‚5.2 Kontinuierliche Fermentation‘ zusammengetragen. Konzentrationen organischer Säuren und Lösungsmittel schwankten in stationären Phasen um ihre Mittelwerte. Aufgrund dieser Konzentrationsschwankungen ergaben sich zum Teil große Standardabweichungen der berechneten Mittelwerte der gemessenen Komponenten.

4.7.4 Gaschromatographie

Die Metaboliten der mikrobiologischen Aktivität der Bakterienzellen wurden im Gaschromatograph GC-14B (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) detektiert und quantitativ bestimmt. Die fünf Komponenten – Aceton, Ethanol, Butanol, Essig-

und Buttersäure – wurden in einer hochpolaren Kapillarsäule Zebron ZB-FFAP (Phenomenex Inc., Torrance, USA) aufgetrennt. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 1 μL . Die Proben wurden mit Split-Injektion (51:1) auf die Kapillarsäule gegeben und die Temperaturen des Injektors und des Detektors auf 240 °C eingestellt. Die Detektion erfolgte im Flammenionisationsdetektor (FID). Das GC-FID Gerät wurde für die optimale Messung eingestellt und die Methode für eine saubere und stabile Analyse der Proben optimiert. Das Gradientenprogramm ist in *Tabelle 4-2* dargestellt. Das Programm wird mit 60 °C gestartet und diese Temperatur wird vier Minuten lang gehalten. Mit 15 °C min^{-1} heizt der Ofen bis auf 220 °C hoch und hält diese Temperatur für drei Minuten konstant. Danach sinkt die Temperatur mit 40 °C min^{-1} bis auf 60 °C. Für die Stabilisierung der Temperatur wird der Ofen fünf Minuten lang bei dieser Temperatur gehalten, bevor die nächste Injektion stattfindet. Temperaturunterschiede des Ofens während der Injektion würden zu Schwankungen der Messwerte und zur Verschiebung der Retentionszeit der Komponentenpeaks führen. Da die Injektion von dem GC-Gerät automatisch mittels Autoinjektor AOC 20i (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) ausgelöst wird, wird der letzte Schritt des Gradientenprogramms ausgeführt, um gleiche Messbedingungen (hier die Ofentemperatur) für jede Probe zu ermöglichen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mithilfe der GCSolution-Software (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan).

Tabelle 4-2: Temperaturgradientenbasiertes Programm des Ofens des Gaschromatographs

Temperatur [°C]	Rate [°C min^{-1}]	Zeit [min]
60		4
220	15	
220		3
60	40	
60		5

Tabelle 4-3 Parametereinstellung des Gaschromatographs GC-14B

Parameter	Flussrate [mL min^{-1}]	Split Rate	Zeit [min]
Säule	1,44		
Split	74	51:1	
Purge	7,73		
Totzeit			3

4.7.5 Kalibriergerade

Bei der gaschromatographischen Analyse treten gerätespezifische Schwankungen der Peakflächen der Analyten sowie des internen Standards auf. Um diesen Effekt bei der Datenauswertung auszugleichen, wurde eine Kalibriergerade mit dreifacher Bestimmung für jeden einzelnen Messpunkt erstellt. Aus den Peakflächen des internen Standards aller Messpunkte der Kalibriergerade wurde der Mittelwert gebildet, der bei der Bestimmung der tatsächlichen Konzentration der Analyten berücksichtigt wurde. Die Konzentration der Analyten wurde wie folgt berechnet:

$$C_{\text{soll}} = C_{\text{ist}} \cdot \frac{A_{\text{soll}}}{A_{\text{ist}}}$$

wo C_{soll} – die tatsächliche Konzentration eines Analyten

C_{ist} – die gemessene Konzentration eines Analyten

A_{soll} – der Mittelwert der Peakflächen des IS aus der Kalibriergerade

A_{ist} – die gemessene Peakfläche eines Analyten ist

Die Kalibriergerade besteht aus zwölf Messpunkten mit dreifacher Bestimmung. In *Tabelle 4-4* sind die Konzentrationen an den Messpunkten der Kalibriergerade dargelegt.

Tabelle 4-4: Schema der Kalibriergerade für die gaschromatographische Analyse der Fermentationsproben. Konz. – Konzentration der Komponenten an den Messpunkten; Mix – das Komponentengemisch mit 20 gL⁻¹ jeder Komponente; VE – demineralisiertes Wasser

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konz. [gL ⁻¹]	0,25	0,5	1	2	2,98	4	5	8	10	12,5	16	20
Mix [μL]	25	50	100	200	298,5	400	500	800	1000	1250	1600	U.v.
VE [μL]	1975	1950	1900	1800	1701,5	1600	1500	1200	1000	750	400	0

Als interner Standard wurde 1-Propanol aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu den Lösungsmitteln Ethanol und Butanol gewählt.

4.7.6 Gaschromatographie

Da die Kapazität der Kapillarsäulen für Proben niedrig ist, wird das Aufbringen der Probe auf einige Mikroliter reduziert. Aber auch im Mikroliterbereich überladen hochkonzentrierte Proben Kapillarsäulen und die chromatographische Auflösung nimmt ab. Injektionen kleiner Volumina von 0,1–0,2 μL sind nicht reproduzierbar und stellen kein Mittel zur Vermeidung der Überladung der Kapillarsäule dar. Split-Methoden hingegen eignen sich gut für Analysen hochkonzentrierter Proben mit Kapillarsäulen. Bei dieser Methodenart wird der Gasstrom geteilt, sodass nur ein Teil der Probe zur Säule geleitet wird. Der andere Teil wird durch das System abgeführt. Somit sind Injektionen größerer Volumina und gleichzeitig eine optimale chromatographische Auflösung möglich.

Da die Siedetemperaturen der einzelnen Komponenten zum Teil unterschiedlich sind (*Tabelle 4-5*) und ihre Polarität variiert, wurde für eine schnelle Analyse ein auf Temperaturgradienten basierendes Programm etabliert. Ein Gradientenprogramm ermöglicht zum einen eine bessere Auflösung und zum anderen eine verkürzte Analysezeit. Entscheidend für die Desorption der Stoffe von der stationären Phase der Kapillarsäule in der Gaschromatographie sind die Siedetemperatur eines Stoffes und seine Polarität, wobei die Siedetemperatur der Polarität in ihrer Wirkung zuvorkommt. Die Polarität ist entscheidend für die Auftrennung von Stoffen mit gleichen oder ähnlichen Siedetemperaturen, wie Butanol und Essigsäure (118 °C). Polare Stoffe wechselwirken stärker mit polaren stationären Phasen und eluieren später als Stoffe mit gleicher Siedetemperatur, aber mit schwächerer Polarität.

Tabelle 4-5: Siedetemperaturen der analysierten Komponenten

Komponente	Siedetemperatur [°C]
Aceton	56
Ethanol	78,32
Butanol	118
Essigsäure	118
Buttersäure	163

5. Ergebnisse

5.1 Batch-Fermentation

Der Auslegung der Rührkesselkaskade waren Batch-Fermentationen vorausgegangen. Laut Literatur stellt der pH-Wert 5,6 das optimale Milieu für die Lösungsmittelbildung dar (Rios-Esteva, Turner, Lee, Croteau, & Lange, 2008) (L. Huang, Forsberg, & Gibbins, 1986) (Grupe & Gottschalk, 1992). Um Unterschiede in Entwicklungen der Lösungsmittelbildung zwischen pH-geregelten und pH-nichtgeregelten Fermentationen zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Batch-Fermentationen durchgeführt: ohne pH-Regelung bei einem pH-Wert von 5,6 und 60 gL⁻¹ Glukose als Substrat und mit pH-Regelung mit einem anfänglichen pH-Wert von 5,6 und 100 gL⁻¹ Glukose. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über den Aufbau der Kaskade in Hinblick auf pH-Regelung (pH-Regelung nur im ersten Bioreaktor oder in jedem Bioreaktor der Kaskade) geben. Die höhere Substratkonzentration in der Batch-Fermentation mit pH-Regelung kam durch den Versuch einer Fermentationszeitverlängerung zustande.

5.1.1 Batch-Fermentationen ohne pH-Regelung

Die Fermentation ohne pH-Regelung (*Abbildung 5-1 (A)* und *Abbildung 5-2 (A)*) zeigte eine Ausbeute $Y_{g/g}$ von 0,26 g_{LM} (g_{Glc})⁻¹ mit 0,19 g_{But} (g_{Glc})⁻¹. Die volumetrischen Bildungsrate der Lösungsmittel q_{LM} bzw. des Butanols q_{But} betragen entsprechend 0,51 g_{LM} (Lh)⁻¹ und 0,36 g_{But} (Lh)⁻¹ ab der achten Stunde (Anfang der Solventogenese) bis zum Erreichen der maximalen Konzentration. Die erreichten Konzentrationen c_{LM} und c_{But} beliefen sich auf 14,43 g_{LM} L⁻¹ und 10,54 g_{But} L⁻¹ (*Tabelle 5-1*). Die Ausbeuten, Produktivitäten und Konzentrationen der Batch-Fermentation finden sich in der Literatur wieder (J. Li, Baral, & Jha, 2014; Moon et al., 2016; Setlhaku et al., 2013). In der solventogenen Phase wurde die maximale Glukoseaufnahmerate q_{Glc} erreicht, die 2,8 g (Lh)⁻¹ betrug. Die optische Dichte erreichte den Wert OD₆₀₀ 11,9.

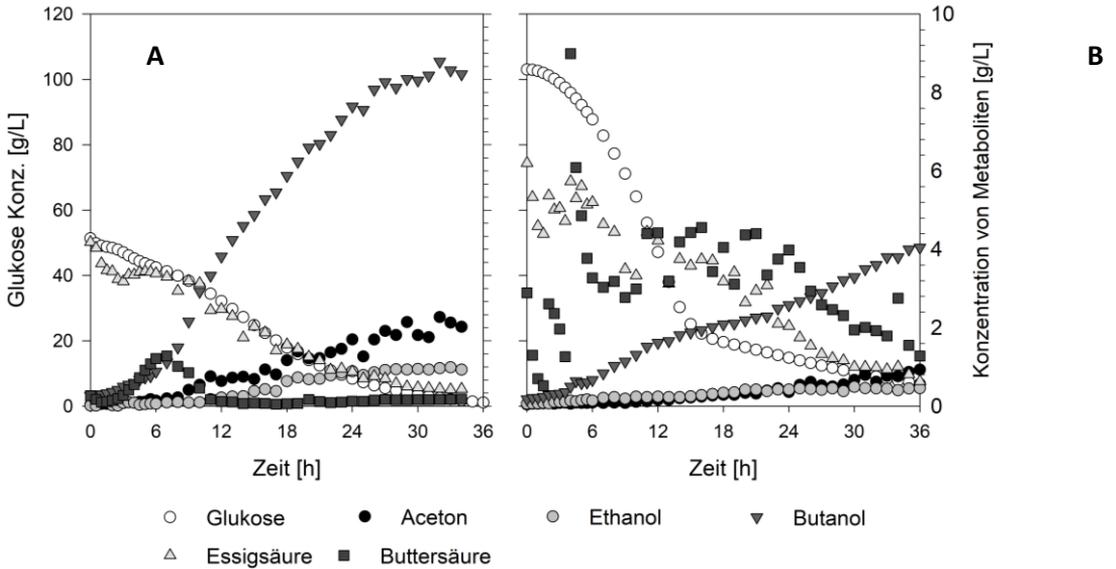


Abbildung 5-1: Konzentrationen der einzelnen Komponenten bei Batch-Fermentationen: A – Batch-Fermentation ohne pH-Regelung; B – Batch-Fermentation mit pH-Regelung

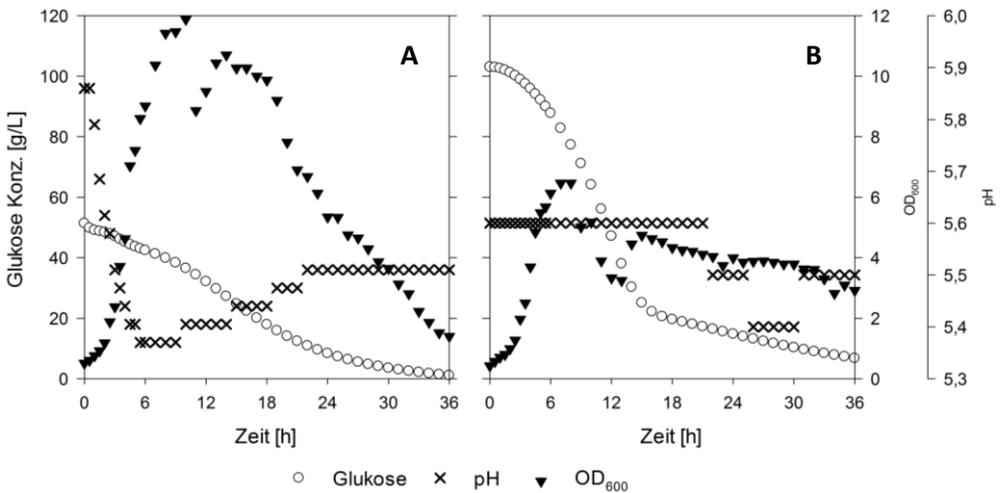


Abbildung 5-2: Vergleich der Entwicklungen der Profile der für die Lösungsmittelbildung relevanten Parameter: pH-Wert, Glukoseaufnahme und Menge der Biomasse. A – Batch-Fermentation ohne pH-Regelung; B – Batch-Fermentation mit pH-Regelung.

Tabelle 5-1: Vergleich von Batch-Fermentationen: A – mit pH-Regelung; B – ohne pH-Regelung

	c_{LM} / c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM}/q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g} [g_{LM}$ (g _{Glc}) ⁻¹]	$Y_{g/g} [g_{But}$ (g _{Glc}) ⁻¹]	q_{Glc} [g(Lh) ⁻¹]	OD ₆₀₀
A	7,48/5,46	0,13/0,09	0,075	0,054	9,6	6,5
B	14,43/10,54	0,51/0,36	0,26	0,19	2,8	11,9

5.1.2 pH-geregelte Batch-Fermentationen

Die Fermentation mit pH-Regelung zeigte niedrigere Ausbeuten $Y_{g/g}$: 0,075 g_{LM} (g_{Glc})⁻¹ bzw. 0,054 g_{But} (g_{Glc})⁻¹. Dabei betragen die volumetrischen Bildungsraten der Lösungsmittel q_{LM} bzw. des Butanols q_{But} bei der pH-regulierten Fermentation entsprechend 0,13 g_{LM} (Lh)⁻¹ und 0,09 g_{But} (Lh)⁻¹ von der siebten Stunde (Anfang der Solventogenese) bis zum Erreichen der maximalen Konzentration. Die Konzentrationen c_{LM} und c_{But} lagen bei 7,48 g_{LM} L⁻¹ bzw. 5,46 g_{But} L⁻¹. Die maximale Glukoseaufnahme q_{Glc} wurde wie bei der Fermentation ohne pH-Regelung in der solventogenen Phase erreicht und betrug 9,6 g(Lh)⁻¹. Außerdem betrug die maximale optische Dichte OD₆₀₀ 6,5 und lag damit unter dem OD₆₀₀-Wert der Fermentation ohne pH-Regelung (Tabelle 5-1). Obwohl die solventogene Phase in der pH-geregelten Fermentation eine Stunde früher begonnen hatte und die Kultivierungszeit länger war als die der nicht pH-geregelten Fermentation, wurden kleinere Mengen von Lösungsmitteln produziert (zur besseren Darstellung der Daten und aufgrund der sich kaum veränderten Messwerte in der letzten Stunde der Fermentation ist der letzte Messwert in *Abbildung 5-1* (B) und *Abbildung 5-2* (B) nicht gezeigt). Die Kenntnisse über die metabolische Aktivität von *C. acetobutylicum* bei den getesteten Bedingungen bestimmten den Aufbau der Rührkesselkaskade als Testsystem der ABE-Fermentation.

Durch den Vergleich der zwei verschiedenen Batch-Fermentationen wird festgestellt, dass der konstante pH-Wert von 5,6 einen negativen Effekt auf die Lösungsmittelbildung hat. Da die Rührkesselkaskade eine räumliche Trennung der zeitabhängigen Ereignisse in Batch ermöglichen soll, wird sie so eingestellt werden müssen, dass der pH-Wert, nach seiner Einstellung und Regelung nur im ersten Bioreaktor, entlang der Rührkesselkaskade eine natürliche, dem Batch-Verlauf ähnliche Dynamik erfahren könnte.

5.2 Kontinuierliche Fermentation

Die kontinuierlichen Fermentationen in der Rührkesselkaskade wurden unter sechs Fermentationseinstellungen untersucht:

1. $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$, pH_1 5,6
2. $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3
3. $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 5,6
4. $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3
5. $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3 mit Rückführung der Brühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor (Verifikation des mathematischen Modells)
6. $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3 mit Acetatzugabe in den zweiten Bioreaktor der Kaskade

Die gewählten Verdünnungsraten D wurden nach Literaturrecherche als optimal für die Stabilität des Prozesses und für die Ermittlung der Änderungen der Prozessparameter angenommen (Afschar et al., 1985; Hubert Bahl et al., 1983; Eckert & Schügerl, 1987; Friedl et al., 1991; Lai & Traxler, 1994; Raganati et al., 2016). Die Beobachtung der Auswirkung der Änderung der Verdünnungsrate D auf das Verhalten der Biomasse und auf die Konzentrationsprofile der Metaboliten ist insofern interessant, als für die immobilisierten *C. acetobutylicum*-Zellen eine Steigung der Butanolkonzentration mit Erhöhung der Verdünnungsrate gezeigt wurde (Raganati et al., 2013).

Der Einfluss des pH-Werts auf die Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* ist bei verschiedenen Prozessführungen gegeben und wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht. Demnach begünstigt eine dynamische Entwicklung des pH-Wertes die Lösungsmittelbildung (Ergebnisse der Batch-Fermentationen) und im Vergleich zu höheren pH-Werten beträgt der für die Lösungsmittelbildung optimale Wert 4,3 (Hubert Bahl et al., 1982, 1983; Grupe & Gottschalk, 1992). Die Ermittlung der Auswirkung unterschiedlicher pH-Werten auf Lösungsmittelbildung im ersten Bioreaktor der Kaskade, bei unterschiedlichen Verdünnungsraten in der Rührkesselkaskade, ist Teil dieser Arbeit.

Beim Programmieren und bei der Optimierung des mathematischen Modells für die Beschreibung der ABE-Fermentationen in der sechstufigen Rührkesselkaskade wurden Fermentationen mit zum Teil großen Unterschieden

der Metabolitkonzentrationen und der Substrataufnahme-, Säuren- und Lösungsmittelbildungsraten berücksichtigt. Dieser Entscheidung liegt zugrunde, dass bei den genannten Parametern bei Reproduzierbarkeitsprüfungen der jeweiligen kontinuierlichen Fermentationen wiederholt Unterschiede auftraten. So wurden bei guter Übereinstimmung der Biomasse- und pH-Werte zwischen einzelnen Versuchen einer Versuchsreihe mit gleicher D und gleichem pH_1 zum Teil 50-prozentige Abweichungen der gemessenen Werte der Glukose und der organischen Säuren berechnet.

Die experimentellen Daten wurden für die Validierung des mathematischen Modells für die jeweiligen Fermentationseinstellungen benutzt, indem sie für die Parameterbestimmung für Gleichungen für die Beschreibung kinetischer Vorgänge verwendet wurden.

Mithilfe des pH-Profiles kann die Entwicklung der metabolischen Prozesse entlang der Rührkesselkaskade nachvollzogen werden (*Abbildung 5-3*). Die Gegenüberstellung des örtlichen pH-Profiles aus der Rührkesselkaskade und der zeitlichen pH-Entwicklung aus der Batch-Fermentation ohne pH-Regelung offenbart einen ähnlichen Verlauf des pH-Werts in beiden Prozessführungen. Die Senkung des pH-Werts in ersten fünf Stunden im Batch geschieht analog dazu in den ersten zwei Bioreaktoren der Rührkesselkaskade und wird als die acidogene Phase des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* bezeichnet. Die spätere Steigung des pH-Werts im Batch ist auch in den folgenden Bioreaktoren der Rührkesselkaskade gegeben und ein Indikator für die zweite, solventogene Phase.

Das pH-Profil und die später beschriebenen morphologischen Unterschiede der Zellen sowie die Konzentrationsprofile der einzelnen Komponente des Stoffwechsels aus der Rührkesselkaskade bestätigen, dass in ihr die kontinuierliche räumliche Trennung beider metabolischer Phasen von *C. acetobutylicum* stattfindet. Nicht die Absolutwerte, sondern das Profil der pH-Entwicklung mit Senkung am Anfang und späterer Steigung ist ausschlaggebend für die Behauptung, dass in der Rührkesselkaskade eine räumliche Trennung der sich im Batch zeitlich entwickelnden Verläufe gegeben ist. Die stärkere Senkung und der schnellere Anstieg der pH-Werte im Batch kommen wegen metabolischer Homogenität der Zellen zustande. Während in jeder Stufe der kontinuierlichen Kaskade eine stabile Verteilung der Zellen mit

unterschiedlichem Metabolom vorliegt, ändern alle Zellen im Batch ihr Metabolom gleichzeitig. Im ideal durchmischten Batch würden alle Zellen zu jeder Zeit in gleicher Morphologie und mit gleichem metabolischem Fluss vorkommen. In der acidogenen Phase würden alle Zellen Säuren produzieren und diese gleichzeitig in der solventogenen Phase in Lösungsmittel umwandeln.

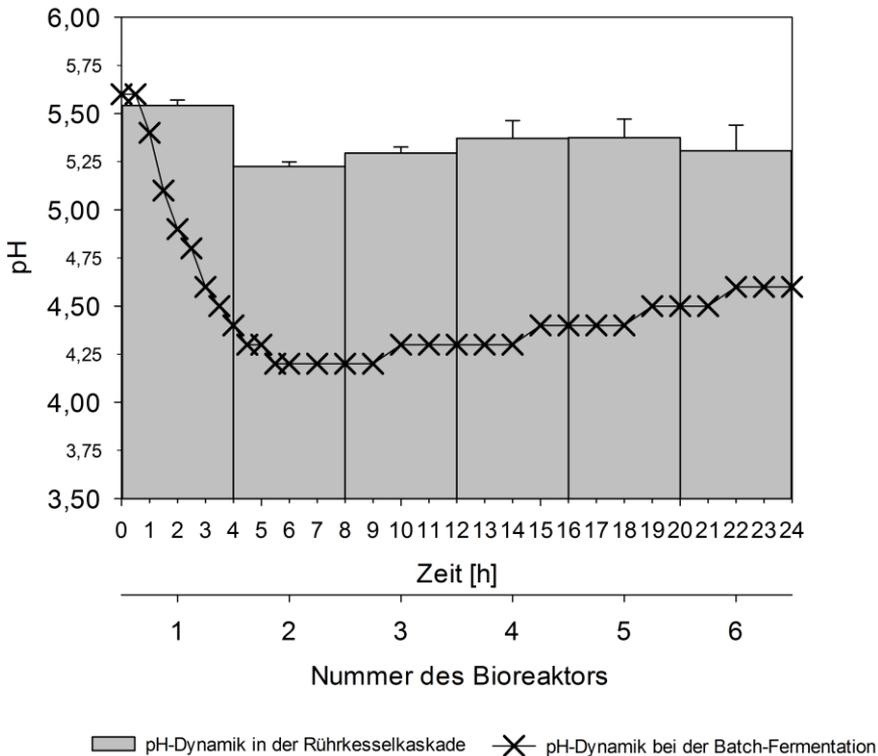


Abbildung 5-3: Gegenüberstellung von pH-Profilen in der Batch-Fermentation und in der Rührkesselskaskade. Die sich zeitlich entwickelnde Dynamik des pH-Profiles im Batch wird in den quasistationären Stufen entlang der Rührkesselskaskade reproduziert.

5.2.1 Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

Die morphologische Untersuchung hat ergeben, dass sich bei den Fermentationen mit Verdünnungsraten $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$ im ersten Bioreaktor neben den am häufigsten vorkommenden vegetativen Zellen auch clostridiale Zellen und Zellen mit Endosporen befanden (die mikroskopische Untersuchung von Proben). Die Präsenz der sich morphologisch unterscheidenden Zellen zeigt den Übergangszustand im ersten Bioreaktor. Die

reaktorbezogene Säurekonzentration $c_{\text{Säure}}^R$ $19,1 \text{ gL}^{-1}$ im ersten Bioreaktor nahm entlang der Rührkesselkaskade bis zum sechsten Bioreaktor kontinuierlich ab bis zu einem Wert von $5,0 \text{ gL}^{-1}$ (Tabelle 5-2 und Abbildung 5-4). Diese Säureabnahme wurde von einem Anstieg der Lösungsmittelkonzentration begleitet, die bei den gegebenen Bedingungen bis zum letzten Bioreaktor der Rührkesselkaskade andauerte: $0,9 \text{ gL}^{-1}$ und $8,9 \text{ gL}^{-1}$ im ersten bzw. im sechsten Bioreaktor. Das Substrat nahm entlang der Rührkesselkaskade von 60 gL^{-1} im Feed auf $2,4 \text{ gL}^{-1}$ im sechsten Bioreaktor ab. Mit der Glukoseaufnahme rate $q_{\text{Glc}} 1,6 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und der Butanolbildungsrate $q_{\text{But}} 0,3 \text{ g(Lh)}^{-1}$ produzierte die Biomasse $6,7 \text{ gL}^{-1}$ Butanol im Auslauf der Rührkesselkaskade. Die maximale Lösungsmittelkonzentration c_{LM} betrug $8,9 \text{ gL}^{-1}$. Detaillierte Zusammenfassungen der Fermentationsparameter und der Konzentrationen der einzelnen Metaboliten sind in der Tabelle 5-2 und Abbildung 5-4 aufgelistet bzw. dargestellt. Der pH-Wert änderte sich schwach bis zum Ende der Rührkesselkaskade und sank von 5,4 im ersten bis auf 5,2 im sechsten Bioreaktor.

Die höchste reaktorbezogene Butanolproduktivität wurde bereits im zweiten Bioreaktor der Rührkesselkaskade registriert ($q_{\text{but}}^R 0,55 \text{ g(Lh)}^{-1}$), wenngleich die Simulation den höchsten Wert der Produktivität im dritten Bioreaktor mit $q_{\text{But}}^{\text{Sim}} 0,64 \text{ g(Lh)}^{-1}$ vorhersagte (Abbildung 5-5).

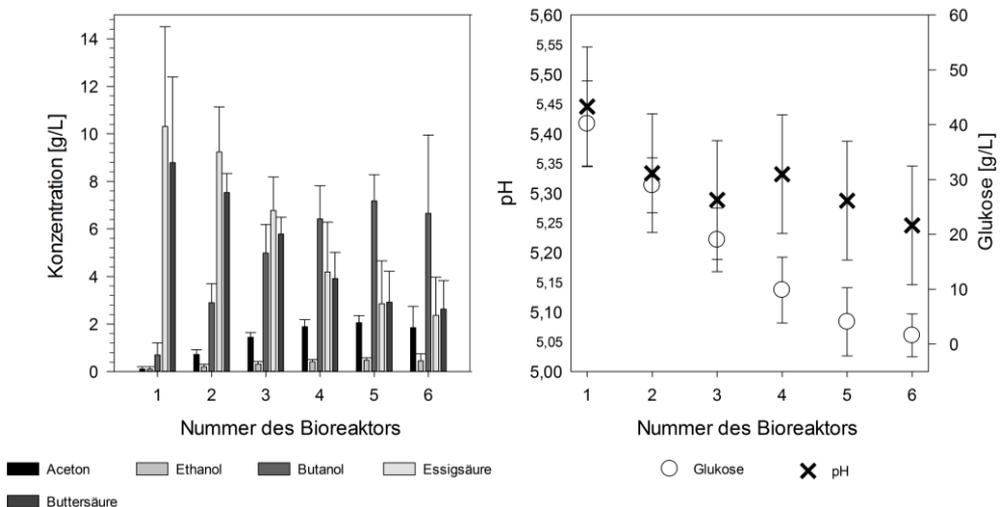


Abbildung 5-4: Konzentrationsverlauf der Metaboliten der ABE-Fermentation in der sechsstufigen Rührkesselkaskade: $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$; $\text{pH}_1 5,6$

Tabelle 5-2: Übersicht der Lösungsmittelbildungs- und Glukoseaufnahmeraten sowie der Metabolitenkonzentrationen der ABE-Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 5,6. Die Parameter c_{LM} , c_{But} , q_{LM} , q_{But} , $Y_{g/g}$ und q_{Glc} beziehen sich auf die ganze Rührkesselkaskade.

c_{LM} / c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM}/q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g}$ [g _{LM} (g _{Glc}) ⁻¹]	$Y_{g/g}$ [g _{But} (g _{Glc}) ⁻¹]	q_{Glc} [g(Lh) ⁻¹]				
8,9/6,7	0,37/0,28	0,15	0,11	2,43				
#Reaktor	c^R_{Glc} [gL ⁻¹]	c^R_{Aceton} [gL ⁻¹]	$c^R_{Ethanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Butanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Essigsäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Buttersäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Säure}$ [gL ⁻¹]	c^R_{LM} [gL ⁻¹]
1	40,2±7,8	0,1±0,1	0,1±0,1	0,7±0,5	10,3±4,2	8,8±3,6	19,1±1,2	0,9±0,3
2	29,0±5,0	0,7±0,2	0,2±0,1	2,9±0,8	9,2±1,9	7,5±0,8	16,8±1,9	3,8±0,1
3	19,0±5,8	1,4±0,2	0,3±0,1	5,0±1,2	6,8±1,4	5,8±0,7	12,6±1,3	6,7±0,5
4	9,9±6,0	1,9±0,3	0,4±0,1	6,4±1,4	4,2±2,1	3,9±1,1	8,1±1,1	8,7±0,6
5	4,1±6,2	2,0±0,3	0,5±0,1	7,2±1,1	2,9±1,8	2,9±1,3	5,8±1,4	9,7±0,6
6	1,6±3,9	1,8±0,9	0,4±0,3	6,7±3,3	2,4±1,6	2,6±1,2	5,0±1,9	8,9±0,1

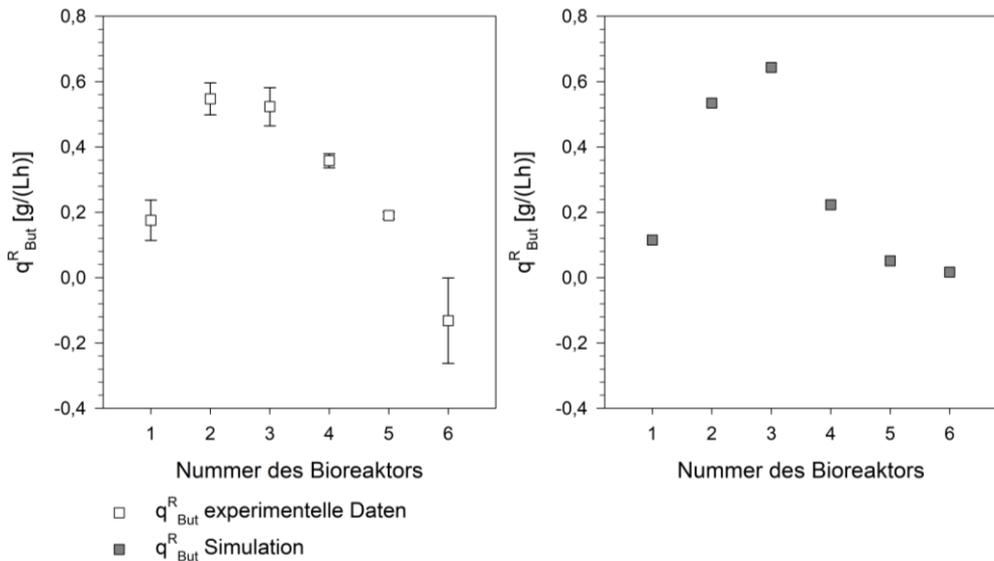


Abbildung 5-5: Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Butanolproduktivitäten für jeden Bioreaktor der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Das Ergebnis der Simulation nach der Parameterschätzung für das mathematische Modell ist *Abbildung 11-1* und *Tabelle 11-1* auf Seite 139 zu entnehmen.

Die Modellvorhersage für die Subpopulationen erscheint sinnvoll und müsste experimentell überprüft werden (*Tabelle 11-2*, Seite 139).

5.2.2 Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Bei den gegebenen Fermentationsparametern lag keine Änderung der Metabolitenkonzentration nach dem dritten Bioreaktor vor. Glukose und die Konzentration der einzelnen Komponenten wiesen keine wesentliche Änderung ab dem dritten Bioreaktor auf (*Abbildung 5-6* und *Tabelle 5-3*). Die Glukosekonzentration fiel von 60 gL^{-1} im Feed auf $2,5 \text{ gL}^{-1}$ im dritten Bioreaktor und lag ab dem vierten Bioreaktor unter der Nachweisgrenze. Die Konzentration des Hauptprodukts Butanol erreichte $9,7 \text{ gL}^{-1}$ im dritten Bioreaktor und zeigte

keinen signifikanten Anstieg in den nachfolgenden Bioreaktoren der Rührkesselkaskade. Die kaskadenbezogene Lösungsmittelbildungsrate q_{LM} ist mit $0,55 \text{ g(Lh)}^{-1}$ höher als die Rate aus den Fermentationen mit pH_1 5,6 (q_{LM} $0,37 \text{ g(Lh)}^{-1}$), *Tabelle 5-3*. Die kaskadenbezogene Butanolbildungsrate q_{But} ist im Vergleich zur Butanolbildungsrate aus den Versuchen mit pH_1 5,6 höher: $0,4 \text{ g(Lh)}^{-1}$ statt $0,3 \text{ g(Lh)}^{-1}$.

Die höchste reaktorbezogene Butanolbildungsrate bei der gegebenen Prozessführung wurde mit q_{But}^R $0,95 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im zweiten Bioreaktor der Rührkesselkaskade erreicht. Ab dem vierten Bioreaktor wurde keine Butanolbildungsrate mehr beobachtet, was auf die fehlende Lösungsmittelbildung aufgrund von fehlendem Substrat zurückzuführen sein könnte (*Abbildung 5-7*). Die Simulation des Prozesses zeigte einen ähnlichen Verlauf der Verteilung der Butanolbildungsraten q_{But}^R durch die Kaskade, wengleich die höchste reaktorbezogene Butanolbildungsrate $q_{But}^{R,Sim}$ mit $1,04 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade berechnet wurde.

Die Parameterschätzung für das mathematische Modell führte zur Übereinstimmung der simulierten Werte mit den experimentellen Daten der Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3 (siehe *Abbildung 11-2* und *Tabelle 11-3* auf Seite 141).

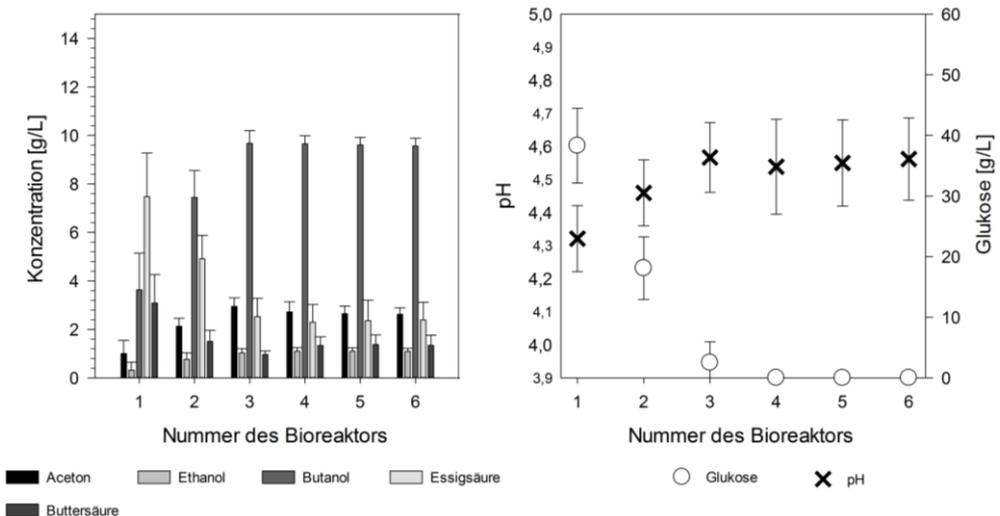


Abbildung 5-6: Konzentrationsverlauf der Metaboliten der ABE-Fermentation in der sechsstufigen Rührkesselkaskade: $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$; pH_1 4,3

Ergebnisse

Tabelle 5-3: Übersicht der Lösungsmittelbildungs- und Glukoseaufnahmeraten sowie der Metabolitenkonzentrationen der ABE-Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$. Die Parameter c_{LM} , c_{But} , q_{LM} , q_{But} , $Y_{g/g}$ und q_{Glc} beziehen sich auf die ganze Rührkesselkaskade.

c_{LM} / c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM} / q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g}$ [g _{LM} (g _{Glc}) ⁻¹]		$Y_{g/g}$ [g _{But} (g _{Glc}) ⁻¹]			q_{Glc} [g(Lh) ⁻¹]	
13,3/9,6	0,55/0,4	0,22		0,16			3,75	
#Reaktor	c^R_{Glc} [gL ⁻¹]	c^R_{Aceton} [gL ⁻¹]	$c^R_{Ethanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Butanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Essigsäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Buttersäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Säure}$ [gL ⁻¹]	c^R_{LM} [gL ⁻¹]
1	38,3±6,2	1,0±0,5	0,3±0,3	3,6±1,5	7,5±1,8	3,1±1,2	10,6±0,4	5,0±0,6
2	18,1±5,2	2,1±0,3	0,8±0,3	7,4±1,1	4,9±1,0	1,5±0,5	6,4±0,2	10,3±0,8
3	2,5±3,4	2,9±0,4	1,0±0,2	9,7±0,5	2,5±0,8	1,0±0,1	3,5±0,3	13,6±0,6
4	0,0±0,1	2,7±0,4	1,1±0,2	9,7±0,3	2,3±0,7	1,3±0,4	3,6±0,9	13,5±0,6
5	0,0±0,1	2,6±0,3	1,1±0,1	9,6±0,3	2,4±0,8	1,4±0,4	3,7±1,0	13,4±0,5
6	0,0±0,1	2,6±0,3	1,1±0,1	9,6±0,3	2,4±0,7	1,3±0,4	3,7±1,0	13,3±0,5

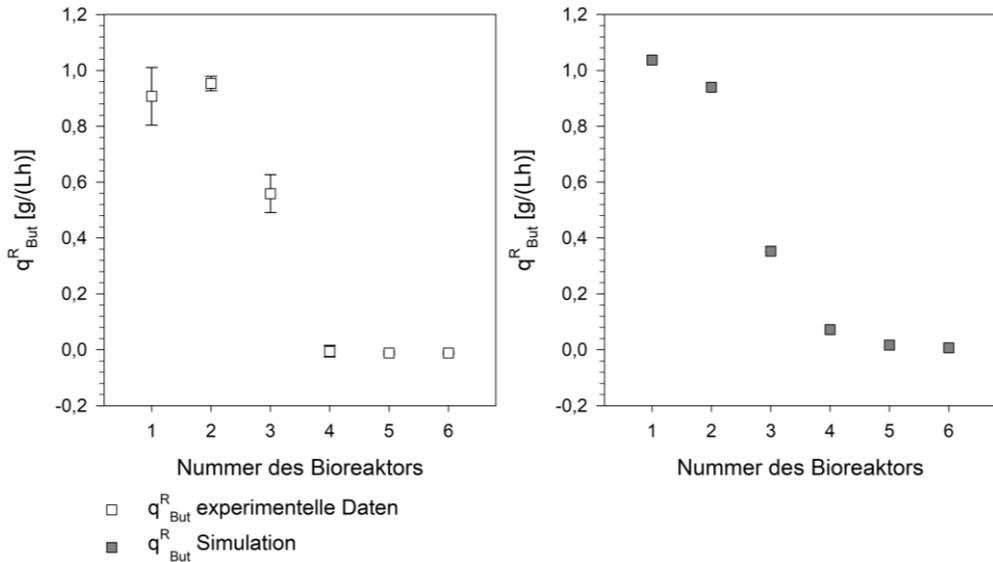


Abbildung 5-7: Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Butanolproduktivität für jeden Bioreaktor der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

5.2.3 Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

Die in *Tabelle 5-4* dargestellten kaskadenbezogenen Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten $q_{\text{But}} 0,44 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bzw. $q_{\text{LM}} 0,62 \text{ g(Lh)}^{-1}$ sowie die Glukoseaufnahme rate $q_{\text{Glc}} 3,13 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bei den Fermentationen mit Verdünnungsrate $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$ sind höher als die der Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ bei gleichem pH_1 -Wert. Die Konzentrationen von Butanol und der Lösungsmittel stiegen vom ersten zum sechsten Bioreaktor an, während die Glukosekonzentration abnahm (*Abbildung 5-8*). Die maximalen Konzentrationen von Butanol und der Lösungsmittel betragen $c_{\text{But}} 4,8 \text{ gL}^{-1}$ bzw. $c_{\text{LM}} 6,7 \text{ gL}^{-1}$. Der Ablauf der Rührkesselkaskade enthielt $25,9 \text{ gL}^{-1}$ Glukose.

Die Säurekonzentration stieg bis zum dritten Bioreaktor an und erfuhr eine leichte Abnahme um 18,8 % der maximalen Säurekonzentration in den letzten Bioreaktoren der Rührkesselkaskade.

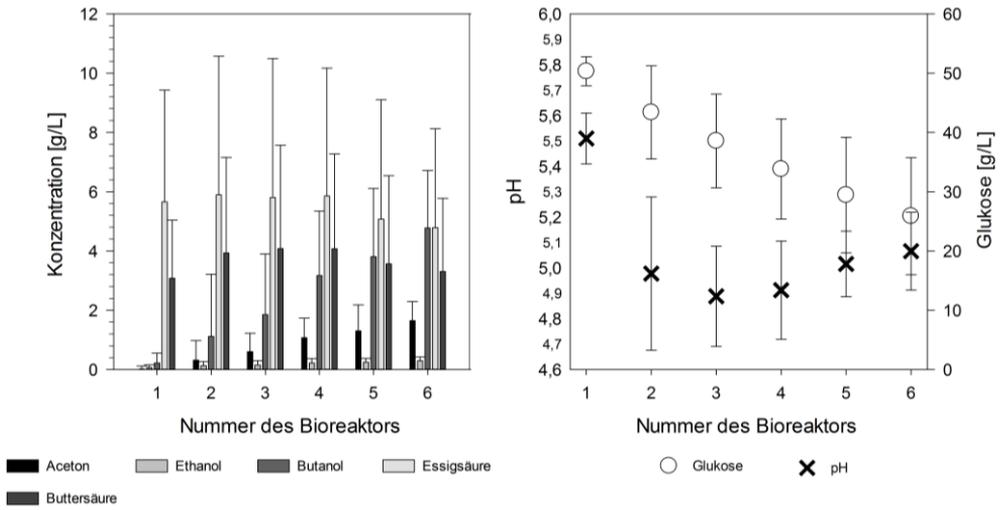


Abbildung 5-8: Konzentrationsverlauf der Metaboliten der ABE-Fermentation in der sechsstufigen Rührkesselkaskade: $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$; $\text{pH}_1 5,6$

Tabelle 5-4: Übersicht der Lösungsmittelbildungs- und Glukoseaufnahmeraten sowie der Metabolitenkonzentrationen der ABE-Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 5,6. Die Parameter c_{LM} , c_{But} , q_{LM} , q_{But} , $Y_{g/g}$ und q_{Glc} beziehen sich auf die ganze Rührkesselkaskade.

c_{LM}/c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM}/q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g}$ [gLM (gGlc) ⁻¹]		$Y_{g/g}$ [gBut (gGlc) ⁻¹]		q_{Glc} [g(Lh) ⁻¹]		
6,7/4,8	0,62/0,44	0,20		0,14		3,13		
#Reaktor	c^R_{Glc} [gL ⁻¹]	c^R_{Aceton} [gL ⁻¹]	$c^R_{Ethanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Butanol}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Essigsäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Buttersäure}$ [gL ⁻¹]	$c^R_{Säure}$ [gL ⁻¹]	c^R_{LM} [gL ⁻¹]
1	50,3±2,4	0,0±0,1	0,1±0,1	0,2±0,3	5,7±3,8	3,1±2,0	8,7±5,0	0,3±0,3
2	43,4±7,9	0,3±0,7	0,1±0,1	1,1±2,1	5,9±4,7	3,9±3,2	9,8±6,8	1,6±1,6
3	38,6±7,9	0,6±0,6	0,2±0,1	1,9±2,0	5,8±4,7	4,1±3,5	9,9±7,1	2,6±1,5
4	33,8±8,4	1,1±0,7	0,2±0,2	3,2±2,2	5,9±4,3	4,1±3,2	9,9±6,5	4,5±1,6
5	29,4±9,7	1,3±0,9	0,2±0,1	3,8±2,3	5,1±4,0	3,6±3,0	8,6±6,1	5,4±1,4
6	25,9±9,9	1,6±0,6	0,3±0,1	4,8±1,9	4,8±3,3	3,3±2,5	8,1±5,0	6,7±1,1

Die reaktorbezogene Butanolbildungsrate schwankte entlang der Rührkesselkaskade und erreichte ihren maximalen Wert $q_{\text{But}}^{\text{R}} 0,72 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im vierten Bioreaktor. Der Simulation nach erreicht die bis dahin stets steigende Butanolbildungsrate ihren maximalen Wert $q_{\text{But}}^{\text{R,Sim}} 1 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im fünften Bioreaktor (Abbildung 5-9). Die Berechnung der Verläufe von einzelnen Metaboliten stimmt mit den experimentellen Daten ausreichend überein (Tabelle 5-4 und Abbildung 11-3 und Tabelle 11-5 auf Seite 142).

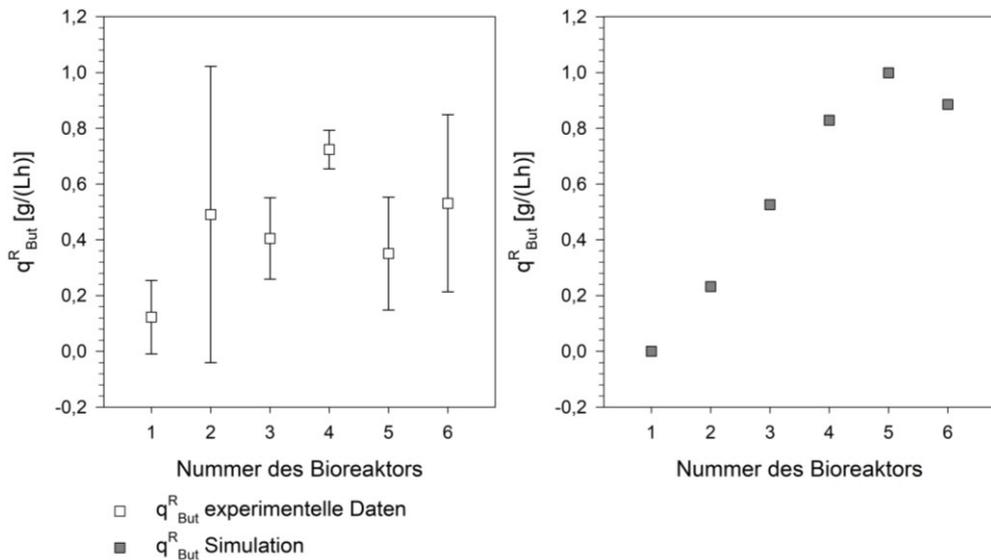


Abbildung 5-9: Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Butanolproduktivität für jeden Bioreaktor der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

5.2.4 Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Bei dem pH_1 -Wert 4,3 und $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ betragen die in Tabelle 5-5 zusammengefassten kaskadenbezogenen Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten $q_{\text{But}} 0,75 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bzw. $q_{\text{LM}} 1,08 \text{ g(Lh)}^{-1}$. Das am Ende der Rührkesselkaskade verbliebene Restsubstrat ist mit $13,9 \text{ gL}^{-1}$ geringer als bei

den Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$ mit Restglukose von $25,9 \text{ gL}^{-1}$ (Tabelle 5-5 bzw. Tabelle 5-4).

Ab dem dritten Bioreaktor werden Säuren wieder aufgenommen und die Lösungsmittelbildung nimmt stark zu. Die Aufnahme der Säuren sorgt für den kontinuierlichen pH-Anstieg ab dem dritten Bioreaktor bis zum Ende der Rührkesselkaskade (Abbildung 5-10).

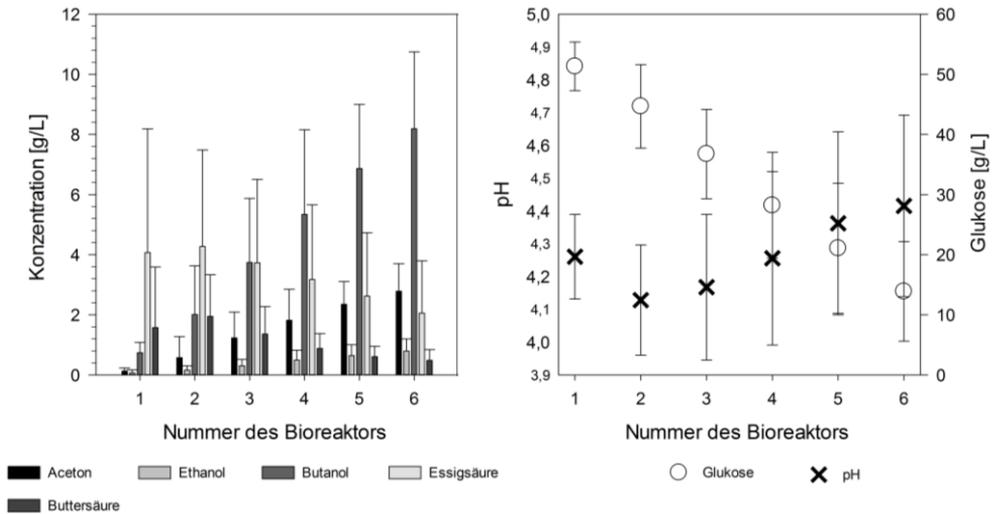


Abbildung 5-10: Konzentrationsverlauf der Metaboliten der ABE-Fermentation in der sechsstufigen Rührkesselkaskade: $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$; $\text{pH}_1 4,3$

Ergebnisse

Tabelle 5-5: Übersicht der Lösungsmittelbildungs- und Glukoseaufnahmeraten sowie der Metabolitenkonzentrationen der ABE-Fermentationen mit $D=0,092 \text{ h}^{-1}$ und $pH_1 4,3$. Die Parameter c_{LM} , c_{But} , q_{LM} , q_{But} , $Y_{g/g}$ und q_{Glc} beziehen sich auf die ganze Rührkesselkaskade.

c_{LM} / c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM} / q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g} \text{ [g}_{LM} \text{ (g}_{Glc})^{-1}]$		$Y_{g/g} \text{ [g}_{But} \text{ (g}_{Glc})^{-1}]$		$q_{Glc} \text{ [g(Lh)}^{-1}]$		
11,8/8,2	1,08/0,75	0,26		0,18		4,23		
#Reaktor	$c^R_{Glc} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Aceton} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Ethanol} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Butanol} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Essigsäure} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Buttersäure} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{Säure} \text{ [gL}^{-1}]$	$c^R_{LM} \text{ [gL}^{-1}]$
1	51,3±4,0	0,1±0,1	0,1±0,1	0,7±0,3	4,1±4,1	1,6±2,0	5,6±3,6	0,9±0,4
2	44,7±6,9	0,6±0,7	0,2±0,1	2,0±1,6	4,3±3,2	1,9±1,4	6,2±4,1	2,7±1,3
3	36,7±7,4	1,2±0,9	0,3±0,2	3,7±2,1	3,7±2,8	1,4±0,9	5,1±3,1	5,3±2,1
4	28,2±8,8	1,8±1,0	0,5±0,3	5,3±2,8	3,2±2,5	0,9±0,5	4,1±2,6	7,7±2,6
5	21,1±10,8	2,3±0,8	0,6±0,4	6,9±2,1	2,6±2,1	0,6±0,3	3,2±2,2	9,9±2,4
6	13,9±8,3	2,8±0,9	0,8±0,4	8,2±2,6	2,1±1,7	0,5±0,4	2,5±1,9	11,8±2,4

Die Simulation erzeugte einen den experimentellen Daten ähnlichen Verlauf der reaktorspezifischen Butanolbildungsrate über die einzelnen Bioreaktoren der Rührkesselkaskade (*Abbildung 5-11*). Die maximale Butanolbildungsrate $q_{\text{But}}^{\text{R}}$ $0,95 \text{ g(Lh)}^{-1}$ wurde im dritten Bioreaktor erreicht, während die $q_{\text{But}}^{\text{R Sim}} 1,13 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im vierten Bioreaktor berechnet wurde. Der simulierte Verlauf der Konzentration der einzelnen Metabolite durch die Rührkesselkaskade stimmt im angemessenen Maße mit dem Verlauf der Metaboliten aus dem Versuch überein (*Abbildung 11-4* und *Tabelle 11-7* auf Seite 144). Die geringe Diskrepanz zwischen der Simulation und den experimentellen Daten unter Betrachtung der Schwankungen der Daten der Reproduzierbarkeitsversuche ist akzeptabel.

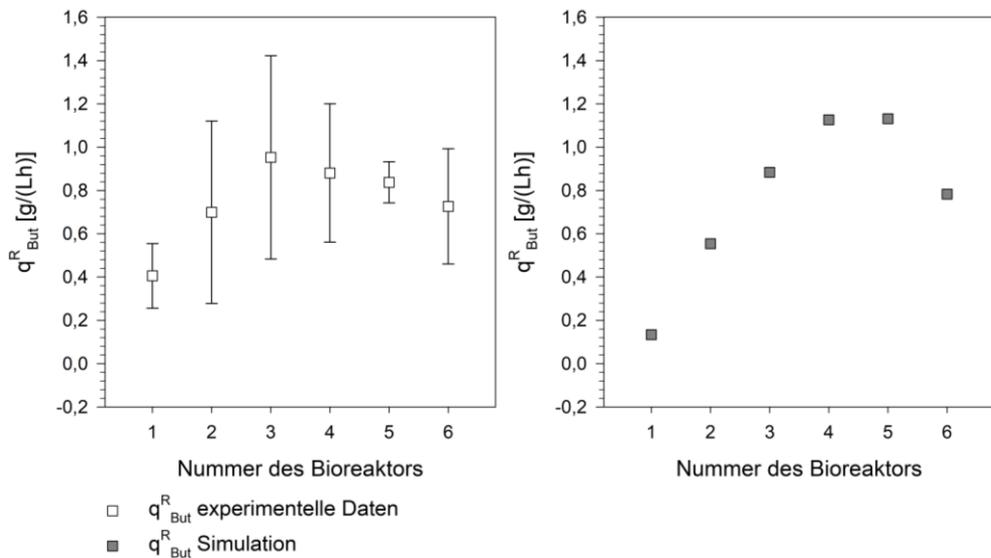


Abbildung 5-11: Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Butanolproduktivität für jeden Bioreaktor der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

5.2.5 Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung

Zwei Hypothesen leiteten zur Prozessführung der ABE-Fermentation mit der Rückführung der Brühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor:

1. Die Butanolzugabe in der acidogenen Phase des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* induziert Butanolbildung (Stefan Junne, 2010)
2. Die Rückführung solventogener Zellen aus dem vierten Bioreaktor der Kaskade erhöht die Butanolbildung im zweiten Bioreaktor

Der Rückführungsstrom aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor betrug $0,051 \text{ Lh}^{-1}$. Die Bakterien verweilten dabei zwölf Minuten lang im Rückführungsschlauch. Im vierten Bioreaktor waren Metabolite wie Butanol mit $5,7 \text{ gL}^{-1}$, $1,1 \text{ gL}^{-1}$ Essigsäure und $0,3 \text{ gL}^{-1}$ Buttersäure vorhanden, die in den zweiten Bioreaktor geleitet wurden. Durch die Zugabe des Butanols und solventogener Zellen aus dem vierten Bioreaktor sollten die Lösungsmittel- und Butanolbildungsraten im zweiten Bioreaktor gesteigert werden. Das zugefügte Butanol erreichte mit der daraus resultierenden Verdünnung im zweiten Bioreaktor keine hemmende Konzentration.

Wie in Fermentationen ohne Rückführung, stieg die Konzentration der Lösungsmittel bis zum Ende der Rührkesselkaskade an (*Abbildung 5-12*). Das pH-Profil zeigt einen Verlauf, der im Vergleich zur Fermentation mit $D = 0,55 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ ohne Rückführung ähnlich ist: der pH-Wert sank vom ersten zum zweiten Bioreaktor und stieg ab dem dritten Bioreaktor bis zum Ende der Rührkesselkaskade wieder an. Die Konzentration des Restsubstrats bei den Fermentationen mit Rückführung ist die niedrigste aus allen Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und beträgt $13,7 \text{ gL}^{-1}$ (*Tabelle 5-6*).

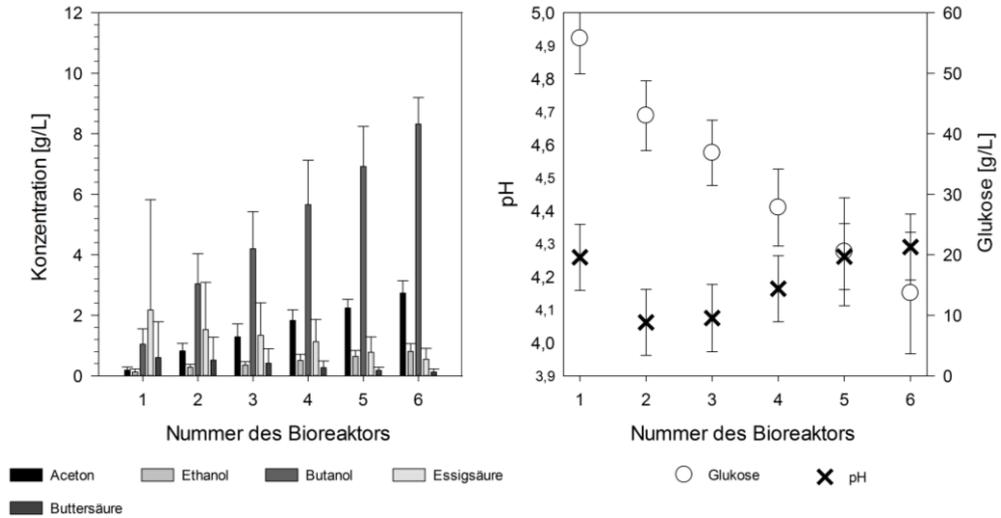


Abbildung 5-12: Konzentrationsverlauf der Metaboliten der ABE-Fermentation in der sechsstufigen Rührkesselkaskade: $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$; $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung

Die experimentellen Daten ergaben kaskadenbezogenen Steigerungen der Lösungsmittelbildungsrate q_{LM} um 0,9 % und der Butanolbildungsrate q_{But} um 1,3 %. Aufgrund der Zufuhr des Butanols aus dem vierten Bioreaktor war im zweiten Bioreaktor eine Konzentrationssteigerung gegeben, die in den nachfolgenden Stufen der Rührkesselkaskade immer geringer wurde, sodass im letzten Bioreaktor die Konzentrationen des Butanols aus den Versuchen mit und ohne Rückführung ungefähr gleich waren. Die Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten $q_{But} 0,76 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und $q_{LM} 1,09 \text{ g(Lh)}^{-1}$ sind kaum größer als die der Fermentationen mit den gleichen Fermentationsparametern, aber ohne Rückführung (Tabelle 5-5 und Tabelle 5-6).

Ergebnisse

Tabelle 5-6: Übersicht der Lösungsmittelbildungs- und Glukoseaufnahmeraten sowie der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung. Die Parameter c_{LM} , c_{But} , q_{LM} , q_{But} , $Y_{g/g}$ und q_{Glc} beziehen sich auf die ganze Rührkesselkaskade.

c_{LM} / c_{But} [gL ⁻¹]	q_{LM} / q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{g/g} [g_{LM} (g_{Glc})^{-1}]$		$Y_{g/g} [g_{But} (g_{Glc})^{-1}]$		$q_{Glc} [g(Lh)^{-1}]$		
11,9/8,3	1,09/0,76	0,26		0,18		4,25		
#Reaktor	$c^R_{Glc} [gL^{-1}]$	$c^R_{Aceton} [gL^{-1}]$	$c^R_{Ethanol} [gL^{-1}]$	$c^R_{Butanol} [gL^{-1}]$	$c^R_{Essigsäure} [gL^{-1}]$	$c^R_{Buttersäure} [gL^{-1}]$	$c^R_{Säure} [gL^{-1}]$	$c^R_{LM} [gL^{-1}]$
1	55,8±5,9	0,2±0,1	0,1±0,1	1,0±0,5	2,2±3,7	0,6±1,2	2,8±1,2	1,3±0,7
2	43,0±5,8	0,8±0,3	0,3±0,1	3,0±1,0	1,5±1,6	0,5±0,8	2,0±0,6	4,1±0,1
3	36,9±5,4	1,3±0,4	0,4±0,1	4,2±1,2	1,3±1,1	0,4±0,5	1,8±0,6	5,8±0,1
4	27,8±6,4	1,8±0,4	0,5±0,2	5,7±1,5	1,1±0,7	0,3±0,2	1,4±0,5	8,0±0,3
5	20,5±8,9	2,2±0,3	0,6±0,2	6,9±1,3	0,8±0,5	0,2±0,1	1,0±0,2	9,8±0,1
6	13,7±10	2,7±0,4	0,8±0,3	8,3±0,9	0,5±0,4	0,1±0,1	0,7±0,0	11,9±0,3

Der simulierte Verlauf der Fermentation gab den nach den experimentellen Daten ermittelten Verlauf ähnlich wieder. Die berechnete höchste reaktorspezifische Butanolbildungsrate $q_{\text{But}}^{\text{R Sim}} 1,16 \text{ g(Lh)}^{-1}$ im zweiten Bioreaktor wurde in den Experimenten bestätigt und betrug $q_{\text{But}} 1,10 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Abbildung 5-13). Der Konzentrationsverlauf der einzelnen Metaboliten wurde mit hoher Übereinstimmung zu experimentellen Daten simuliert (Abbildung 11-5 auf Seite 145).

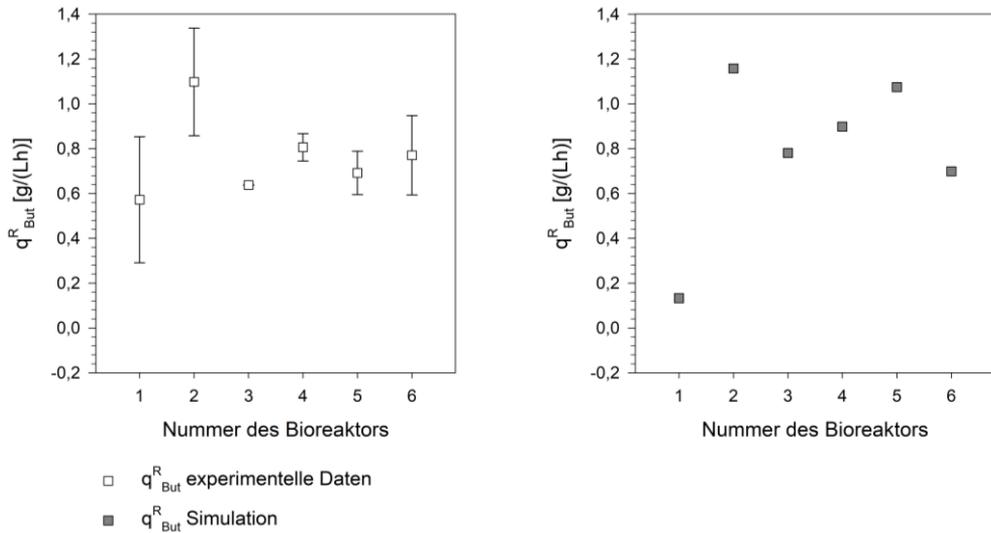


Abbildung 5-13: Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Butanolproduktivität für jeden Bioreaktor der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ und Rückführung der Brühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

5.2.6 Kontinuierliche Fermentation bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Zugabe des Acetats in den ersten Bioreaktor der Kaskade

Zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Acetatzugabe auf *C. acetobutylicum* wurden in die Rührkesselkaskade mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ bei $\text{pH}_1 4,3$ das Medium mit Glukose und $2,5 \text{ gL}^{-1}$ Acetat gepumpt (Abbildung 5-14). Die Lösungsmittelkonzentration stieg um 63,5 %, wenn Bakterien mit dem Glukose-Acetat-Gemisch versorgt wurden. Infolge der mathematischen Berechnung des Prozesses ergab sich eine 19-prozentige Steigerung der Lösungsmittelkonzentration. An diesem Punkt sei erwähnt, dass nicht die kaskadenbezogenen Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten, sondern ihre Steigerungen ab Beginn des Glukose-Acetat-Zulaufs für die Auswertung der Ergebnisse ausschlaggebend sind. Die große Diskrepanz zwischen den experimentellen Daten und der Simulation kann mit der auffallend niedrigen und für die üblichen ABE-Fermentationen in der Rührkesselkaskade nicht typischen Konzentrationen der Metaboliten erklärt werden. Aufgrund technischer Probleme wurden die Versuche nicht wiederholt.

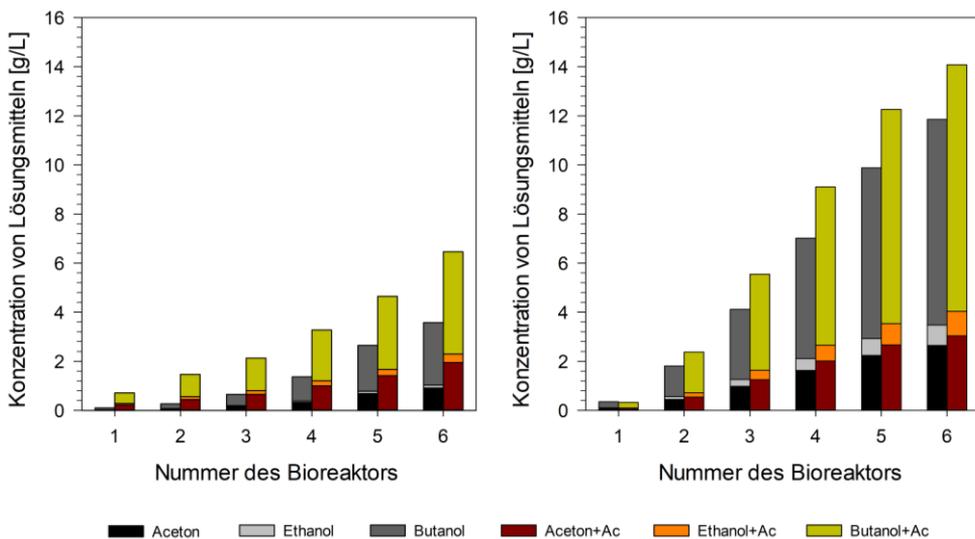


Abbildung 5-14: Auswirkung von Acetatzugabe in den ersten Bioreaktor mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$: Vergleich von experimentellen Daten und Simulation. Links – Experiment; rechts – Simulation

5.2.7 Zusammenfassung des experimentellen Teils

In *Tabelle 5-7* sind Parameter für die Übersicht und den Vergleich der Fermentationen mit verschiedenen getesteten Fermentationsparametern zusammengetragen. Es werden die Mittelwerte der jeweiligen Parameter ohne entsprechende Standardabweichungen zusammengefasst.

Tabelle 5-7: Übersichtstabelle über die Produktivitätsdaten der verschiedenen Fermentationen: 1 – $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$, pH_1 5,6; 2 – $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3; 3 – $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 5,6; 4 – $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3; 5 – $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$, pH_1 4,3 mit Rückführung

Versuch	$c_{\text{LM}} / c_{\text{But}} [\text{g L}^{-1}]$	$q_{\text{LM}} / q_{\text{But}} [\text{g}(\text{Lh})^{-1}]$	$Y_{\text{g/g}} [\text{g}_{\text{LM}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$	$Y_{\text{g/g}} [\text{g}_{\text{But}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$	$q_{\text{Glc}} [\text{g}(\text{Lh})^{-1}]$
1	8,9/6,7	0,37/0,3	0,15	0,11	2,43
2	13,3/9,6	0,55/0,4	0,22	0,16	3,75
3	6,7/4,8	0,62/0,44	0,20	0,14	3,13
4	11,8/8,2	1,08/0,75	0,26	0,18	4,23
5	11,9/8,3	1,09/0,76	0,26	0,18	4,25

Insgesamt kann gesagt werden, dass in den Fermentationsphasen mit pH_1 5,6 – dem säurebildungsfördernden pH-Wert – in der Rührkesselkaskade generell weniger Lösungsmittel gebildet wurden als bei pH_1 4,3 – dem optimalen pH-Wert für die Lösungsmittelbildung. Die höchste Lösungsmittel- und Butanolkonzentration c_{LM} bzw. c_{But} wurden in den Versuchen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und dem pH-Wert pH_1 4,3 generiert. Die höchsten Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{g/g}} [\text{g}_{\text{LM}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$ und $Y_{\text{g/g}} [\text{g}_{\text{But}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$ in der Rührkesselkaskade aus sechs Bioreaktoren ergaben sich bei den Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3 mit und ohne Rückführung. Die höchsten Lösungsmittel- und Butanolbildungsraten q_{LM} und q_{But} und die bessere Glukoseaufnahme q_{Glc} zeichneten die Fermentation mit Rückführung aus.

5.3 Morphologie der Zellen in später solventogenen Phase

Die mikroskopische Analyse der Fermentationsproben offenbarte einen in der Literatur wenig beschriebenen Subtyp der Zellen. In den ersten Stunden der kontinuierlichen Fermentationen nahm der Anteil der vegetativen Zellen in der Brühe in der Kaskade vom ersten Bioreaktor bis zum sechsten Bioreaktor hin um 88 % ab, während der Anteil der clostridialen Zellen zunahm. Im späteren, stationären Verlauf der Fermentation machten die vegetativ aussehenden Zellen in jedem Bioreaktor der Rührkesselkaskade mit 90 % den größten Anteil der Zellen aus. Dabei blieb die Endkonzentration der Lösungsmittel im Vergleich zu den ersten Stunden unverändert. Diese lösungsmittelbildenden vegetativen Zellen formierten sich in langen Ketten und wiesen keine oder eine schwache Beweglichkeit auf (*Abbildung 5-15*). Ein ähnlicher, aber nicht identischer Subtyp der Clostridium-Zellen wurde in der späten solventogenen Phase der Batch-Fermentationen beschrieben (S. W. Jones et al., 2008). Diese beweglichen Zellen synthetisierten eine geringe Menge von Säuren und wiesen im Vergleich zu den vegetativen Zellen aus der acidogenen Phase eine veränderte Zellmembran-Komposition und ein verändertes Transkriptomuster auf. Es wurden keine Hinweise auf die Lösungsmittelbildung dieser Zellen gegeben. Diese Beobachtungen und der zuvor beschriebene Subtyp von *C. acetobutylicum* lassen schlussfolgern, dass die Zellen bei optimalen Bedingungen die Fähigkeit besitzen, sich an das butanolhaltige Milieu ohne Verlust ihrer lösungsmittelbildenden Fähigkeit anzupassen.

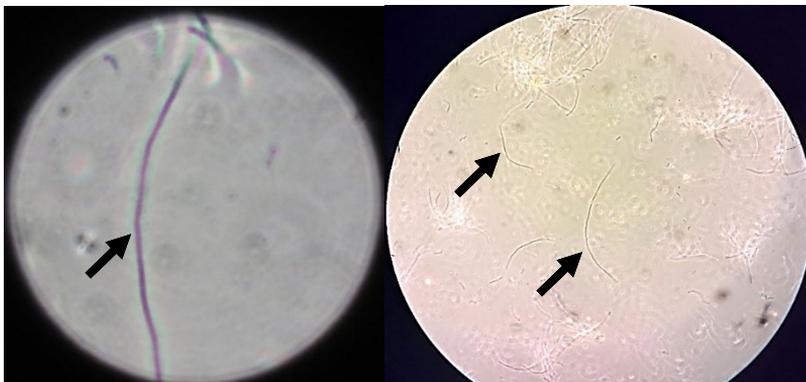


Abbildung 5-15: Die Pfeile zeigen auf lange Ketten aus nicht beweglichen, lösungsmittelbildenden Clostridium-Zellen mit morphologischen Merkmalen vegetativer Zellen.

6. Diskussion

In Fermentationen mit den unterschiedlichen Verdünnungsraten $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ wurden bei pH_1 4,3 höhere Lösungsmittel- und Butanolkonzentrationen erreicht als bei pH_1 5,6.

Die Lösungsmittel- und Butanolbildungsrate waren bei der Verdünnungsrate $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ stets höher als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$.

Außerdem ergaben sich die höchsten kaskadenbezogenen Konzentrationen und Bildungsrate bei Betrachtung nur der ersten drei Bioreaktoren bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3.

Die Rückführung der Fermentationsbrühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3 ergab keine signifikante Wirkung weder auf Konzentrationen noch auf Bildungsrate von Lösungsmitteln und Butanol.

Die 63,5-prozentige Steigerung der kaskadenbezogenen Lösungsmittelkonzentration resultierte aus einer kontinuierlichen Zugabe von $2,5 \text{ gL}^{-1}$ Acetat zum Zufütterungsmedium bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3.

In weiteren Teilen der Diskussion wird auf die Verteilungen hypothetischer Subpopulationen in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade eingegangen. Experimentelle Beweise über diese Subpopulationen liegen nicht vor. Analyseverfahren, wie Durchflusszytometrie oder DNA-Sequenzierung, die Aufschluss über das Vorkommen der Unterschiede der Zellen geben könnten, waren nicht Teil der angewandten Analyseverfahren.

6.1 Kontinuierliche Fermentationen bei pH_1 5,6

Kontinuierliche Fermentationen in der Kaskade bei pH_1 5,6 zeichneten sich bei beiden Verdünnungsraten D durch geringe Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen und durch ein geringes Restsubstrat im Ablauf aus. Die Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ ergaben eine höhere finale Butanolkonzentration c_{But} von $6,7 \text{ gL}^{-1}$ als Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ mit c_{But} $4,8 \text{ gL}^{-1}$. Die finale Lösungsmittelkonzentration c_{LM} in Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ war mit $8,9 \text{ gL}^{-1}$ ebenfalls höher als bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ mit c_{LM} von

6,7 gL⁻¹. Das Restsubstrat war mit $1,6 \pm 3,9$ gL⁻¹ in Fermentationen mit $D = 0,042$ h⁻¹ deutlich niedriger als in Fermentationen mit $D = 0,092$ h⁻¹ bei $25,9 \pm 9,9$ gL⁻¹.

Die maximale Säurekonzentration in Fermentationen mit $D = 0,042$ h⁻¹ im ersten Bioreaktor wurde entlang der Rührkesselkaskade zu 73,8 % von den Bakterien wieder aufgenommen. Ab dem vierten Bioreaktor erfolgte die Abnahme der Säurekonzentration in Fermentationen mit $D = 0,092$ h⁻¹ um 18,8 % der maximalen Säurekonzentration. Die pH-Verläufe der Fermentationen mit beiden D unterschieden sich in ihrer Entwicklung entlang der Rührkesselkaskade, die reaktorbezogenen pH-Werte sanken jedoch in keiner Fermentation unter den Wert 5,0.

Aufgrund der Auswertung der Daten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass sich bei Fermentationen mit $D = 0,042$ h⁻¹ in den ersten Bioreaktoren der Kaskade mehr Säuren akkumulieren und diese simultan zur Glukoseaufnahme effizient wieder aufgenommen werden. Laut der modellgestützten Hypothese soll bei dieser Verdünnungsrate ein Übergang der acidogenen Bakterienzellen in lösungsmittelbildende, intermediäre und solventogene Bakterienzellen schon im ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade erfolgen. Nach dem mathematischen Modell für die Simulation von Prozessen in der Rührkesselkaskade steigt der Anteil solventogener Zellen von 2 % im ersten Bioreaktor auf 42 % im sechsten Bioreaktor. Der Anteil der intermediären Zellen variiert in den einzelnen Reaktoren der Rührkesselkaskade und beträgt 3 % im ersten Bioreaktor und 29 % im sechsten. Somit werden Säuren bereits im ersten Bioreaktor wieder aufgenommen und zu den entsprechenden Lösungsmitteln mit einer maximalen reaktorbezogenen Butanolbildungsrate $q_{\text{But}}^{\text{R}}$ im zweiten Bioreaktor reduziert.

Bei den Fermentationen mit $D = 0,092$ h⁻¹ ist laut dem Modell der Anteil der solventogenen Zellen stets kleiner als bei $D = 0,042$ h⁻¹, wobei er von 0 % im ersten auf 26 % im sechsten Bioreaktor ansteigt. Der Anteil der intermediären Zellen soll durch die Rührkesselkaskade variieren und 0 % im ersten und 33 % im sechsten Bioreaktor betragen. Die maximale reaktorbezogene Butanolbildungsrate $q_{\text{But}}^{\text{R}}$ soll im vierten Bioreaktor erreicht werden.

Die totalen Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten der Kaskade sind mit q_{But} 0,44 g(Lh)⁻¹ und q_{LM} 0,62 g(Lh)⁻¹ in den Fermentationen mit $D = 0,092$ h⁻¹ höher als die Bildungsraten in den Fermentationen mit $D = 0,042$ h⁻¹ mit q_{But} 0,3 g(Lh)⁻¹ und q_{LM} 0,37 g(Lh)⁻¹. Insgesamt sind die reaktorbezogenen Butanolbildungsraten

$q_{\text{But}}^{\text{R}}$ in Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ ebenfalls höher als in Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$.

Aus den experimentellen Daten und den Ergebnissen des mathematischen Modells kann geschlussfolgert werden, dass bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ ein wegen der doppelten Fließrate zeitlich verschobener, aber intensiverer Übergang von solventogenen Bakterienzellen in die intermediären Bakterienzellen erfolgt als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$.

6.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ bei $\text{pH}_1 4,3$

Die kontinuierlichen Fermentationen in der Kaskade mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ zeichneten sich durch einen vollständigen Substratverbrauch aus und die Glukoseaufnahme erfolgte simultan mit der Wiederaufnahme von Säuren. Nach einer vollständigen Verwertung der Glukose im dritten Bioreaktor betrug die Säurekonzentration in den folgenden Bioreaktoren noch $3,6 \text{ gL}^{-1}$. Das Ende der Lösungsmittelbildung im dritten Bioreaktor und die danach konstant gebliebene Säurekonzentration können bedeuten, dass Säuren nur bei vorhandener Glukose aufgenommen und zu Lösungsmitteln reduziert werden können und dass sie für die metabolische Aktivität von *C. acetobutylicum* kein ausreichendes Substrat darstellen. Für die Wiederaufnahme von Säuren wird ATP benötigt, das durch Verstoffwechslung von Zuckern gebildet wird (Zheng et al., 2015). Die Reduktion organischer Säuren zu Alkoholen erfolgt in *C. acetobutylicum* in den NADH-abhängigen Dehydrogenase-Reaktionen. Für die Wiederreduktion der oxidierten NAD^+ -Moleküle bedarf es der Glykolyse und der Oxidierung von Ferredoxin (Vasconcelos et al., 1994a; Zheng et al., 2015).

Im Vergleich zu Fermentationen mit $\text{pH}_1 5,6$ gingen laut der Simulationsergebnisse bei $\text{pH}_1 4,3$ die acidogenen Bakterienzellen früher in die intermediären und solventogenen Bakterienzellen über. Ihre Anteile betragen im ersten Bioreaktor 18 % für die intermediären und 19 % für die solventogenen Zellen. Entlang der Rührkesselkaskade nahm der Anteil der intermediären Zellen ab und betrug im sechsten Bioreaktor 10 % der Gesamtzahl der Zellen im Reaktor. Die Anteile der solventogenen Zellen nahmen zum Ende der Rührkesselkaskade zu und machten im sechsten Bioreaktor 36 % aus.

Wie in den Fermentationen mit pH_1 5,6 war bei pH_1 4,3 ein Einfluss der Änderung der Verdünnungsrate D festzustellen. Die finalen Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen im Ablauf der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ betragen $c_{\text{But}} 9,6 \pm 0,3 \text{ gL}^{-1}$ bzw. $c_{\text{LM}} 13,3 \pm 0,5 \text{ gL}^{-1}$ und waren damit höher als $c_{\text{But}} 8,2 \pm 2,6 \text{ gL}^{-1}$ und $c_{\text{LM}} 11,8 \pm 2,4 \text{ gL}^{-1}$ bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$. Ähnlich zu den Fermentationen mit pH_1 5,6 sind die Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ mit $q_{\text{But}} 0,4 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und $q_{\text{LM}} 0,55 \text{ g(Lh)}^{-1}$ kleiner als $q_{\text{But}} 0,75 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und $q_{\text{LM}} 1,08 \text{ g(Lh)}^{-1}$ bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$.

Die simulierte Verteilung der Anteile der drei metabolisch verschiedenen Zellgruppen ähnelte der Verteilung aus den Fermentationen mit pH_1 5,6. Die reaktorbezogenen Anteile der solventogenen Bakterienzellen waren bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ kleiner als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und stiegen von 4 % im ersten Bioreaktor auf 31 % im sechsten Bioreaktor an. Die intermediären Zellen waren stärker vertreten als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und variierten entlang der Rührkesselkaskade zwischen 10 % im ersten und 30 % im sechsten Bioreaktor.

Die oben genannten Beobachtungen führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Organische Säuren können von *C. acetobutylicum* nur parallel zur Glykolyse aufgenommen werden.
2. Bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ wird aufgrund längerer Verweilzeit eine höhere Lösungsmittelkonzentration erreicht als bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$.
3. Laut Modell liegen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ im ersten Bioreaktor acidogene Bakterienzellen in der Überzahl vor. In den weiteren Bioreaktoren der Rührkesselkaskade erfolgt ein intensiverer Übergang von den acidogenen in die intermediären Bakterienzellen als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$.
4. Die kaskadenbezogenen Butanol- und Lösungsbildungsraten q_{But} und q_{LM} sind bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ höher als bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$.
5. Wegen der höheren kaskadenbezogenen Bildungsraten q_{But} und q_{LM} und der höheren Produktkonzentrationen c_{But} und c_{LM} ist der pH_1 -Wert 4,3 optimal für die Lösungsmittelproduktion von *C. acetobutylicum* in der Rührkesselkaskade.

Das Ergebnis der Optimierung von ABE-Fermentationen mit suspendierten Clostridium-Zellen in der Rührkesselkaskade im Hinblick auf den pH_1 -Wert und auf die Verdünnungsrate D ist die Erkenntnis, dass die Erhöhung der Verdünnungsrate D auf $0,092 \text{ h}^{-1}$ eine Steigerung der Lösungsmittelproduktivität in der Rührkesselkaskade mit sechs Bioreaktoren bewirkt. Die Senkung des pH_1 -Wertes auf $4,3$ führt zusätzlich zu einer Erhöhung der Lösungsmittelkonzentrationen. Auf der anderen Seite werden bei den für die Lösungsmittelbildung optimalen Prozessparametern im Auslauf der Rührkesselkaskade $13,9 \pm 8,3 \text{ gL}^{-1}$ Restsubstrat verbleiben. Dieser Fakt spricht für die Notwendigkeit weiterer Optimierungsmaßnahmen des Fermentationsprozesses oder wird bei der Analyse der ökonomischen Effizienz des Prozesses analysiert.

6.2.1 Verringerung der Zahl der Bioreaktoren in der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Werden die Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten q_{But} und q_{LM} über die sechs Bioreaktoren der Rührkesselkaskade betrachtet, wird die höhere $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ ($\tau = 10,9$ Stunden) eine Erhöhung dieser Größen zur Folge haben. Die Auswertung der Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ ($\tau = 24$ Stunden) unter Berücksichtigung der ersten drei Bioreaktoren gibt eine zweite Möglichkeit der Optimierung von ABE-Fermentationen in der Rührkesselkaskade.

Die maximalen Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen c_{But} und c_{LM} bei den Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ wurden im dritten Bioreaktor der Rührkesselkaskade erreicht und betragen $9,7 \pm 0,5 \text{ gL}^{-1}$ bzw. $13,6 \pm 0,6 \text{ gL}^{-1}$. Das Restsubstrat lag in einer Konzentration von $2,5 \pm 3,4 \text{ gL}^{-1}$ vor. Aufgrund der fehlenden Entwicklung der Lösungsmittelproduktion ab dem dritten Bioreaktor bietet sich die Kürzung der Rührkesselkaskade um die drei letzten Bioreaktoren an. Die Verweilzeit τ in der nun aus drei Bioreaktoren bestehenden Rührkesselkaskade würde zwölf Stunden betragen. Dementsprechend zeigt der auf drei Bioreaktoren optimierte Prozess im Vergleich mit allen Versuchen im Rahmen dieser Arbeit die höchsten Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten $q_{\text{But}} 0,81 \text{ g(Lh)}^{-1}$ und $q_{\text{LM}} 1,14 \text{ g(Lh)}^{-1}$.

Der Vergleich der Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten kontinuierlicher Fermentationen in der Kaskade bei unterschiedlichen Fermentationsparametern ist *Tabelle 6-1* zu entnehmen.

Tabelle 6-1: Vergleich der Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten von kontinuierlichen Fermentationen in der Kaskade bei unterschiedlichen Fermentationsparametern

	D = 0,042 h⁻¹, pH₁ 4,3	D = 0,042 h⁻¹, pH₁ 4,3	D = 0,092 h⁻¹, pH₁ 4,3
Zahl der Reaktoren	6	3	6
τ [h]	24	12	10,9
q_{But} [g(Lh) ⁻¹]	0,4	0,81	0,75
q_{LM} [g(Lh) ⁻¹]	0,55	1,14	1,08

6.3 Rückführung der Fermentationsbrühe bei D = 0,092 h⁻¹ und pH₁ 4,3

Die Rückführung der Fermentationsbrühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor bewirkte im Vergleich zu den Ergebnissen der Fermentationen mit gleichen Prozessparametern und ohne Rückführung eine geringe Steigerung der Bildungsraten q_{LM} und q_{But} : q_{LM} stieg um 0,9 % und q_{But} um 1,3 %. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Simulation baut sich der Überschuss von Butanol im experimentellen Teil ab dem vierten Bioreaktor bis zum sechsten Bioreaktor ab. Der Butanolüberschuss im zweiten bis vierten Bioreaktor kann mit der Zugabe des Butanols in den zweiten Bioreaktor durch die Rückführung der butanolhaltigen Fermentationsbrühe aus dem vierten Bioreaktor erklärt werden. Nach der Simulation betrüge der Überschuss von Butanol im zweiten, vierten und sechsten Bioreaktor entsprechend 87,8 %, 10,1 % und 2,9 %. Im experimentellen Teil lag der Überschuss von Butanol bei 6 % im vierten und 1,6 % in sechsten Bioreaktor. Die Steigerung der kaskadenbezogenen Bildungsraten q_{LM} und q_{But} können auf die Induktion der Butanolbildung durch die Butanolzugabe in die acidogene Phase hindeuten.

Die Butanolzugabe bewirkte eine Steigerung der Lösungsmittelbildung im zweiten Bioreaktor. Unter Phosphatlimitation und in Präsenz ausreichender Mengen an Glukose und organischen Säuren begünstigt Butanol die Lösungsmittelbildung. Ohne Phosphatlimitierung würde Butanol unter diesen Bedingungen die Sporulation auslösen, da Zellen genug Phosphat zum Einleiten dieses Prozesses hätten. Das bestätigt die Hypothese der Butanolzugabe in die solventogene Phase (Stefan Junne, 2010) für die Anwendung in einstufigen kontinuierlichen Systemen unter den genannten Bedingungen.

Aus Sicht der Optimierungsmaßnahme des Prozesses führte die Rückführung der Biomasse in der Rührkesselkaskade zur Erhöhung der Produktivität und der Ausbeute der Lösungsmittel. Dagegen muss, bei Betrachtung der Optimierung der ökonomischen Effizienz des Prozesses, die Wirtschaftlichkeit des geringen Lösungsmittelüberschusses gegenüber dem Investitionsbedarf für die Modifizierung der Anlage und gegenüber den dadurch steigenden Betriebskosten überprüft werden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der Produktionsprozess durch die Nutzung der Variationsmöglichkeiten der Rührkesselkaskade mit wenig apparativem Aufwand optimiert werden kann.

6.4 Acetatzugabe in den ersten Bioreaktor der Kaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Die Acetatzugabe zur ABE-Fermentation in den ersten Bioreaktor der Rührkesselkaskade bewirkte eine Steigerung der Lösungsmittelkonzentration. Im Vergleich mit einer Fermentation ohne Acetatzugabe stieg die Lösungsmittelkonzentration ab dem Beginn der Zuführung von $2,5 \text{ gL}^{-1}$ Acetat um 63,5 %. Bedingt durch die technischen Probleme bei der Bedienung der Rührkesselkaskade, wie Verschleiß der maßangefertigten Elemente, wurden die Experimente mit der Acetatzugabe nicht wiederholt, sodass eine Reproduzierbarkeit nicht gezeigt werden konnte. Auch die im Vergleich zum typischen Lösungsmittelkonzentrationsbereich der Fermentation mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ niedrigen Komponentenkonzentrationen konnten nicht erklärt werden. An diesen verhältnismäßig geringen Konzentrationen können die

großen Unterschiede zwischen den experimentellen und den simulierten Daten bezüglich der Erhöhung der Lösungsmittelkonzentration während der Acetatzugabe liegen. Trotz dieser Abweichungen zeigen die Ergebnisse des Versuchs deutlich, dass das geringfügig überschüssige Acetat in der acidogenen Phase die Lösungsmittelproduktivität von *C. acetobutylicum* fördert. Die bioverfahrenstechnischen Vorteile der Acetatzugabe sind demzufolge offensichtlich, das fundamentale Verständnis der ablaufenden biochemischen Prozesse kann jedoch aus den experimentellen Daten nicht hergeleitet werden. In dieser Hinsicht eignet sich ein möglicher Einsatz der Rührkesselkaskade für die Erforschung des Metaboloms unterschiedlicher Mikroorganismen unter verschiedenen Bedingungen.

6.5 Gegenüberstellung der Immobilisierung und der Suspension der Mikroorganismen

In Bioprozessen werden zwei Arten des Biomasseeinsatzes verwendet: die Immobilisierung oder die Suspension der Mikroorganismen. Die Gegenüberstellung dieser zwei Arten ist insofern relevant, als sich die Behandlung der Biomasse, der Beginn der Fermentationsprozesse und ihre Durchführung voneinander unterscheiden.

Wie aus der Literatur über die immobilisierte Biomasse (Raganati et al., 2016) und den Ergebnissen dieser Arbeit für die suspendierten Zellen hervorgeht, wächst die Lösungsmittelproduktivität der Anlage mit steigender Verdünnungsrate D an. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Ausführungen liegt in der maximalen Verdünnungsrate, bei der die Lösungsmittelbildung noch erfolgen kann. Während es sich bei den suspendierten Zellen von *C. acetobutylicum* in einem Fermenter um die Korrelation $D < \mu_{\max}$ handelt, bei der μ_{\max} maximal $0,7 \text{ h}^{-1}$ erreichen kann, um das Auswaschen der Zellen aus dem Fermenter zu vermeiden, werden Systeme mit immobilisierten Zellen mit Verdünnungsraten größer als $3,6 \text{ h}^{-1}$ betrieben. Je nach Zielsetzung können Fermentationsprozesse entweder langsamer oder schneller verlaufen, was wiederum die Nutzung der immobilisierten Biomasse vorteilhafter macht. Die Verdünnungsraten $D = 3,2 \text{ h}^{-1}$ und $D = 3,4 \text{ h}^{-1}$ erwiesen sich bei der Verwertung von Laktose durch die auf den Tygon-Ringen immobilisierten *C.-acetobutylicum*-Bakterienzellen als optimale Parameter für

die maximale Butanolkonzentration bzw. Butanolbildungsrate mit $q_{\text{But}} 9,2 \text{ g(Lh)}^{-1}$ (Raganati et al., 2016).

Der Nachteil des Immobilisierungsverfahrens liegt unter anderem in der Zeit, die für den Aufbau der Biomasse auf den Träger gebraucht wird. In einigen Fällen kann der Biomasseaufbauprozess mehr als sieben Tage andauern. Wie jeder kontinuierliche Fermentationsprozess sind auch Fermentationen auf Basis von immobilisierten Bakterienzellen kontaminationsanfällig, was im schlimmsten Fall zu ihrem Abbruch führen kann. Aus dieser Perspektive bieten die ABE-Fermentationen mit suspendierten Zellen eine ausgewogene Alternative aus optimaler Lösungsmittelproduktivität und vergleichsweise kurzer Anlaufphase für die Produktherstellung.

Nach Einschätzung von (Setlhaku et al., 2013) sind solche kontinuierliche ABE-Prozesse effizient, die mehr als 36 gL^{-1} Butanol produzieren und damit den Bedarf für die wertsteigernde Destillation des Butanols decken. Weder die Nutzung der suspendierten noch der immobilisierten Zellen kann bisher diesen Anforderungen gerecht werden. Demzufolge wird jeder ABE-Fermentationsprozess über eine Produktaufbereitung *in situ* oder einer anderen Art verfügen müssen, um die Prozesskosten zu decken und die weitere ökonomische Effizienz der Produktion zu steigern. Nicht zuletzt könnten Zellrückhaltungsverfahren in Kombination mit der Lösungsmittelentfernung aus der Fermentationsbrühe einen Beitrag zur Steigerung der Effizienz der Bioraffinerien leisten.

7. Schlussfolgerung

Kontinuierliche ABE-Fermentationen mit *C. acetobutylicum* in Rührkesselkaskaden zeichnen sich durch stabile Prozessführungen im Labormaßstab mit einer maximalen Dauer von mehr als 1000 Stunden aus. Eine optimale Verteilung metabolischer Phasen des zweiphasigen Stoffwechsels führt zum vollständigen Substratverbrauch durch das Bakterium im Fermentationssystem und ermöglicht eine konstante Lösungsmittelbildung. Die kontinuierliche Zunahme der Lösungsmittelkonzentration entlang der Kaskade bei optimalen Durchflussraten D und pH_1 hat den Vorteil, dass die inhibierende Lösungsmittelkonzentration erst im letzten Bioreaktor der Kaskade auftritt. Durch den Effekt der Verteilung metabolischer Phasen bilden sich in den Bioreaktoren der Kaskade günstige konstante Zusammensetzungen der hypothetischen Subpopulationen von *C. acetobutylicum*, die je nach Bioreaktor entweder Säuren bilden oder die Säuren zu Lösungsmitteln reduzieren.

Bei einem niedrigerem pH_1 -Wert von 4,3 werden höhere kaskadenbezogene Lösungsmittelbildungsraten und -konzentrationen erreicht als bei einem höheren pH_1 -Wert von 5,6. Eine schnellere kaskadenbezogene Durchflussrate $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ zeichnet sich durch niedrigere kaskadenbezogenen Lösungsmittelkonzentrationen aus, wohingegen die kaskadenbezogenen Lösungsmittelbildungsraten steigen.

Die Butanolzuführung in den zweiten Bioreaktor der Kaskade bewirkte eine Erhöhung der Lösungsmittelbildung im zweiten Bioreaktor, hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Lösungsmittelbildungsrate und -konzentration gezeigt. Diese Parameter waren mit den Parametern der Referenzfermentation ohne Rückführung der butanolhaltigen Brühe aus dem vierten Bioreaktor in den zweiten Bioreaktor der Kaskade nahezu identisch. Im Gegensatz dazu hat die Zugabe von $2,5 \text{ gL}^{-1}$ Acetat in den ersten Bioreaktor eine Steigerung der Lösungsmittelkonzentration um 63,5 % bewirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden zusammen mit dem programmierten mathematischen Modell für kontinuierliche ABE-Fermentationen mit suspendierten Zellen von *C. acetobutylicum* eine wissenschaftliche Basis für die Planung und Auslegung der Scale-up-Versuche derartiger Fermentationen.

Das Auftreten der vegetativen, butanolbildenden Zellen ist insofern interessant, als dieser Zustand von *C. acetobutylicum* in der Literatur wenig beschrieben ist. Eine gezielte Forschung dieser Subpopulation könnte neue Kenntnisse über das Bakterium liefern und zur Optimierung der Prozesse kontinuierlicher ABE-Fermentationen beitragen.

8. Ausblick

8.1 Erforschung der Auswirkungen definierter Substratgemische und der Buttersäurezugabe

8.1.1 Auswirkung der Zugabe von Buttersäure auf die ABE-Produktivität

Die Zugabe von Buttersäure kann bei ABE-Fermentationen eine Erhöhung der Butanolproduktivität hervorrufen (Al-Shorgani, Kalil, Ali, Yusofl, & Hamid, 2012). Am Beispiel von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 im Batch-Verfahren wurde gezeigt, dass 4 gL⁻¹ Buttersäure und 30 gL⁻¹ Glukose im Medium keine Wachstumsinhibierung verursachen, sondern sich positiv auf die ABE-Produktivität auswirken. Eine ähnliche Situation war im Versuch 5.2.3 *Kontinuierliche Fermentationen bei D = 0,092 h⁻¹ und pH1 5,6* aufgetreten, wo im vierten Bioreaktor mit 33,8 gL⁻¹ Glukose und 4,1 gL⁻¹ Buttersäure die höchste Butanolproduktivität $q_{\text{But}}^{\text{R}}$ von 0,72 g(Lh)⁻¹ beobachtet wurde.

Das Überführen der Brühe mit höherer Buttersäurekonzentration aus einem Bioreaktor der Rührkesselkaskade in einen nachstehenden Bioreaktor mit optimaler Glukosekonzentration könnte die Lösungsmittelproduktivität bei geeigneter Optimierung des Fermentationsprozesses bzw. der Rührkesselkaskade bei hohen Verdünnungsraten D verbessern.

Alternativ könnte die Buttersäure an verschiedenen Stufen der Rührkesselkaskade dem Fermentationsprozess zugegeben werden. Das Nährmedium könnte mit zusätzlicher Buttersäure vervollständigt und die gesamte Rührkesselkaskade damit versorgt werden. Mit dieser Ausführung wäre es möglich, die ersten Bioreaktoren der Rührkesselkaskade mit einer für das

ideale Wachstum optimalen Verdünnungsrate zu betreiben und gleichzeitig durch den zusätzlichen Strom die nachstehenden Bioreaktoren mit Buttersäure zu versorgen sowie durch die Einstellung der Flussgeschwindigkeit eine für die Lösungsmittelbildung optimale Verdünnungsrate einzustellen.

8.1.2 Fermentation mit Glycerol-Glukose-Gemisch als Substrat

Eine positive Auswirkung eines Glycerol-Glukose-Gemisches als Substrat auf die Bildung von Butanol und Ethanol im neutralen pH-Milieu im Chemostat wurde bereits demonstriert (Vasconcelos et al., 1994a). Bei pH 6,5 und einem Glycerol-Glukose-Verhältnis von 1,96 wurden weniger Wasserstoff und Säuren gebildet als in Fermentationen, in denen nur Glukose als Substrat verwendet wurde. Die reduzierte Wasserstoffbildungsrate ist nicht auf den reduzierten Hydrogenase-Pool, sondern auf den reduzierten NADH-Ferredoxin-Reduktase- und den gestiegenen Ferredoxin-NAD-Reduktase-Pool zurückzuführen. Das bei dem Katabolismus von Glycerol zu Pyruvat gebildete überschüssige Redoxäquivalent muss in den NADH-abhängigen Stoffwechselwegen wieder zu NAD^+ oxidiert werden. Statt molekularen Wasserstoff zu bilden, wurde das reduzierte Ferredoxin nach der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion zur Reduktion von NAD^+ benutzt.

Die Verwendung von Glycerol-Glukose-Gemischen für die ABE-Fermentationen in Rührkesselkaskade könnte nach der Optimierung des Fermentationsprozesses eine höhere Lösungsmittelausbeute ermöglichen als Fermentationen, bei denen nur Glukose als Substrat verwendet wird.

8.2 Versuche mit Erweiterung/Optimierung der Rührkesselkaskade

8.2.1 Fermentation mit einem kombinierten Bioreaktortypensystem

Die kontinuierliche Kultivierung von suspendierten *C.-acetobutylicum*-Zellen bei den acidogenen Bedingungen im Chemostat sorgt für das kontinuierliche vegetative Wachstum und eine konstante Menge von Bakterien im Reaktor. Eine Immobilisierung von Bakterien führt hingegen zur Akkumulierung der Biomasse im Reaktor, erlaubt höhere Ströme durch den Reaktor und sorgt für die

Steigerung der Produktivität. Bedingt durch die Konzentrationsgradienten im Festbettreaktor einerseits und durch das Altern der Biomasse andererseits, ist die immobilisierte Biomasse in ihrem Zustand und ihrer Menge nicht klar definierbar. Um die Ansiedelung der Biomasse zu beschleunigen, können die zwei Kultivierungsarten – suspendierte und immobilisierte Bakterienzellen – gekoppelt werden. So könnte eine Reaktorkaskade konstruiert werden, bei der der erste Reaktor als ein Saatgutreaktor fungieren könnte, der frische Biomasse in die nachgeschalteten Festbettreaktoren liefert. Um die im Zusammenhang mit der Verdünnungsrate stehende Produktivität zu erhöhen, könnte ein zusätzlicher Substratfluss den Festbettreaktorblock speisen und damit den Durchstrom in diesem vergrößern. Durch die Erweiterung des mathematischen Modells soll folglich die Konfiguration der Kaskade optimiert werden.

8.2.2 Versuche mit in situ oder integrierten Aufbereitungsmethoden

Aufgrund der geringen Lösungsmittelkonzentrationen in ABE-Fermentationen, die sie für kommerzielle Nutzung im industriellen Maßstab nicht effizient macht, ist es sinnvoll, schon in den frühen Phasen der Prozessauslegung im Labormaßstab verschiedene Kombinationen der fermentativen und Aufbereitungsmodule zu testen. Eine *in-situ*- oder integrierte Produktaufbereitungsmethode, wie das Gas-Stripping, die Pervaporation, die Adsorption oder andere, erhöht nachweislich die im Laufe einer Fermentation erreichbare Konzentration von Produkten um das zehnfache bis hundertfache. Optimierte kontinuierliche Fermentationsverfahren und die vergleichsweise günstigen Aufbereitungsmethoden werden die Produktivität von ABE-Fermentationen gegenüber chemischer Synthese steigern. Es liegt auf der Hand, dass die zukünftige Erforschung von ABE-Produktionen in Richtung der Nutzung von biogenen nachhaltigen Rohstoffen für die Produktion ausgelegt wird. Gerade bei der Verwertung biogener Rohstoffe wird der Bedarf an günstigen und effektiven Aufbereitungsmethoden steigen, da der Aufschluss der Rohstoffe und die Hydrolyse von Lignocellulose nach aktuellem Stand einiger Investitionen bedürfen. Um die Produktionskosten zu senken und die Konkurrenzfähigkeit der biologischen Lösungsmittelproduktion und von Bioraffinerien insgesamt zu steigern, werden Kopplungen von Fermentationen und entweder die *in-situ*- oder die integrierte Produktaufbereitung und -trennung an Bedeutung gewinnen.

Es sollen zukünftig weitere Studien über den Lebenszyklus von ABE-Produktionen aus biogenen nachhaltigen Rohstoffen durchgeführt werden. Nähere Kenntnisse über nachhaltig produzierte Rohstoffe aus dem Agrarsektor, Indirect Land Use, Abfällen und anderen Ressourcen, die nicht in der Lebensmittel- und Nahrungswirtschaft Verwendung finden, werden neue Fragen und Anforderungen an die modernen Bioraffinerien stellen und die Produktion von biologischen Gütern fördern.

9. Literaturverzeichnis

- Afschar, A. S., Biebl, H., Schaller, K., & Schiigerl, K. (1985). Production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture with cell recycle, *824*, 394–398.
- Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S., Ali, E., Yusofl, W. M. W., & Hamid, A. A. (2012). Enhancement of Biobutanol production by butyric acid addition using *Clostridium saccharoperbutyacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Biotechnology*, *11*(6), 326–332.
- Alsaker, K. V, & Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum* Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum* †. *Journal of Bacteriology*, *187*(20), 7103–7118. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.7103>
- Alsaker, K. V, Spitzer, T. R., Eleftherios, T., & Papoutsakis, E. T. (2004). Transcriptional Analysis of *spo0A* Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and Its Effect on the Cell ' s Response to Butanol Stress Transcriptional Analysis of *spo0A* Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and Its Effect on the Cell ' s Response. *Journal of Bacteriology*, *186*(7), 1959–1971. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.1959>
- Alsaygh, A. A., Jennings, P. A., & Bader, M. S. H. (1993). Separation of Organic Solutes from Water by Low-Pressure Reverse-Osmosis. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*, *28*(8), 1669–1687.
- Andersch, W., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *18*(6), 327–332. <https://doi.org/10.1007/BF00504740>
- Andrade, J. C., & Vasconcelos, I. (2003). Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: Culture stability and low-grade glycerol utilisation. *Biotechnology Letters*, *25*(2), 121–125. <https://doi.org/10.1023/A:1021911217270>
- Bahl, H, & Gottschalk, G. (1984). Parameters affecting solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. United States. Retrieved from <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/6457390>

- Bahl, H, Gottwald, M., Kuhn, A., Rale, V., Andersch, W., & Gottschalk, G. (1986). Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*, *52*(1), 169–172.
- Bahl, Hubert, Andersch, W., Braun, K., & Gottschalk, G. (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *14*, 17–20. <https://doi.org/10.1007/BF00507998>
- Bahl, Hubert, Andersch, W., & Gotschalk, G. (1983). Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *17*(1), 73. <https://doi.org/10.1007/BF00510576>
- BASF SE. (2008). *Technisches Merkblatt n-Butanol*. Ludwigshafen. Retrieved from https://www.borealis-lat.com/fileadmin/media/ntech/Produkt/Downloads/Deutsch/Urea_SR_TDS-AT_DE.pdf
- Bowles, L. K., & Ellefson, W. L. (1985). Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*(5), 1165–1170.
- Brehmer, B., Boom, R. M., & Sanders, J. (2009). Maximum fossil fuel feedstock replacement potential of petrochemicals via biorefineries. *Chemical Engineering Research and Design*. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.07.010>
- Cavalleri, B., Pagani, H., Volpe, G., Selva, E., & Parenti, F. (1984). A-16686, a new antibiotic from Actinoplanes. I. Fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics. *J Antibiot (Tokyo)*, *37*(4), 309–317. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.309>
- Ceresana. (2014). Marktstudie Butanol. Retrieved May 23, 2017, from <http://www.ceresana.com/de/marktstudien/chemikalien/butanol/>
- Chang, S. H., Choi, Y., Park, J. A., Jung, D. S., Shin, J., Yang, J. H., ... Kim, J. K. (2007). Anti-inflammatory effects of BT-201, an n-butanol extract of *Panax notoginseng*, observed in vitro and in a collagen-induced arthritis model. *Clinical Nutrition*, *26*(6), 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.07.008>
- Cornillot, E., Nair, R. V., Papoutsakis, E. T., & Soucaille, P. (1997). The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

- reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5442–5447.
- Daza Montaño, C. . (2009). Process design and evaluation of butanol production from lignocellulosic biomass. *Bioenergy 2009, 4th International Bioenergy Conference and Exhibition*, (September). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.031>
- Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (1999). Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, 1(3), 206–213. <https://doi.org/10.1006/mben.1999.0118>
- Desai, R. P., Nielsen, L. K., & Papoutsakis, E. T. (1999). Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology*, 71(1–3), 191–205. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00022-X)
- Diltz, R. A., Marolla, T. V., Henley, M. V., & Li, L. (2007). Reverse osmosis processing of organic model compounds and fermentation broths. *Bioresource Technology*, 98(3), 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.022>
- Dolejš, I., Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2014). Butanol production by immobilised *Clostridium acetobutylicum* in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation. *Bioresource Technology*, 169, 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.039>
- Dzięgielewski, W., Gawron, B., Kaźmierczak, U., & Kulczycki, A. (2014). BUTANOL/BIOBUTANOL AS A COMPONENT OF AN AVIATION AND DIESEL FUEL. *Journal of KONES. Powertrain and Transport*, 21(2), 69–75. <https://doi.org/10.5604/12314005.1133869>
- Eckert, G., & Schügerl, K. (1987). Continuous acetone-butanol production with direct product removal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 221–228. <https://doi.org/10.1007/BF00252922>
- Ennis, B. M., Qureshi, N., & Maddox, I. S. (1987). In-line toxic product removal during solvent production by continuous fermentation using immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(11), 672–675. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90126-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90126-8)
- Ezeji, T. C., Karcher, P. M., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2005). Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystems*

- Engineering*, 27(3), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0403-7>
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(12), 771–777. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0253-1>
- Fond, O., Petitdemange, E., Petitdemange, H., & Gay, R. (1984). Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnology Letters*, 6(1), 13–18. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00128223>
- Friedl, A., Qureshi, N., & Maddox, I. S. (1991). Continuous Acetone-Butanol-Ethanol (Abe) Fermentation Using Immobilized Cells of *Clostridium-Acetobutylicum* in a Packed-Bed Reactor and Integration with Product Removal by Pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(5), 518–527. <https://doi.org/DOI 10.1002/bit.260380510>
- Gabriel, C. L., & Crawford, F. M. (1930). Development of the Butyl-Acetic Fermentation Industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, 22(11), 1163–1165. <https://doi.org/10.1021/ie50251a014>
- Gao, M., Tashiro, Y., Wang, Q., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2016). High acetone-butanol-ethanol production in pH-stat co-feeding of acetate and glucose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.01.013>
- Garcia, A., Iannotti, E. L., & Fischer, J. L. (1986). Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(6), 785–791. <https://doi.org/10.1002/bit.260280603>
- Goerlitz, R., Weisleder, L., Wuttig, S., Trippel, S., Karstens, K., Goetz, P., & Niebelschuetz, H. (2018). Bio-butanol downstream processing: regeneration of adsorbents and selective exclusion of fermentation by-products. *Adsorption*, 24(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/s10450-017-9918-x>
- González-Fernández, M. J., Muñoz, N., Alaoui, F. A. F. and E. M. E. (2014). Review of Thermodynamic and Transport Properties of 1-Butanol As Renewable Component of New Biofuels . Retrieved from <http://hdl.handle.net/2263/44713>
- Gottschal, J. C., & Morris, J. G. (1981). The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated

- concentrations of acetate and butyrate. *FEMS Microbiology Letters*, 12(4), 385–389. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1981.tb07679.x>
- Gottwald, M., & Gottschalk, G. (1985). The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology*, 143(1), 42–46. <https://doi.org/10.1007/BF00414766>
- Green, E. M. (2011). Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>
- Grobben, N. G., Eggink, G., Petrus Cuperus, F., & Huizing, H. J. (1993). Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF00205039>
- Groot, W. J., & Luyben, K. C. A. M. (1986). In situ product recovery by adsorption in the butanol/isopropanol batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 29–31. <https://doi.org/10.1007/BF00252508>
- Grupe, H., & Gottschalk, G. (1992). Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3896–3902.
- Hägström, L., & Enfors, S. O. (1982). Continuous production of butanol with immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 7(1–2), 35–37. <https://doi.org/10.1007/BF02798617>
- Harris, L. M., Desai, R. P., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2000). Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 1–11. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000105\)67:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000105)67:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-G)
- Harris, L. M., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2002). Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3586–3597. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3586-3597.2002>
- Herrero, A. A. (1983). End-product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends in Biotechnology*, 1(2), 49–53. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(83\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(83)90069-0)

- Higashide, W., Li, Y., Yang, Y., & Liao, J. C. (2011). Metabolic Engineering of *Clostridium Cellulolyticum* for Isobutanol Production From Cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02454-10>
- Holt, R. A., Stephens, G. M., & Morris, J. G. (1984). Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(6), 1166–1170.
- Honda, H., Toyama, Y., Takahashi, H., Nakazeko, T., & Kobayashi, T. (1995). Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *79*(6), 589–593. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94753-E](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94753-E)
- Huang, J., & Meagher, M. M. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. *Journal of Membrane Science*, *192*(1–2), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00507-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00507-5)
- Huang, L., Forsberg, C. W., & Gibbins, L. N. (1986). Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(6), 1230–1234.
- Huffman, D. H., Benjamin, R. S., & Bachur, N. R. (1972). Daunorubicin metabolism in acute nonlymphocytic leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *13*(6), 895–905. <https://doi.org/10.1002/cpt1972136895>
- Husemann, M. H., & Papoutsakis, E. T. (1990). Effects of propionate and acetate additions on solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, *56*(5), 1497–1500. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2339898
- Hüsemann, M. H., & Papoutsakis, E. T. (1988). Solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* fermentations related to carboxylic acid and proton concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, *32*(7), 843–852. <https://doi.org/10.1002/bit.260320702>
- Jiang, Y., Xu, C., Dong, F., Yang, Y., Jiang, W., & Yang, S. (2009). Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic Engineering*, *11*(4–5), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.06.002>
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C. F. F., & Ji, J. (2011). Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy*

- Reviews*, 15(8), 4080–4106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.06.001>
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524. <https://doi.org/3540574>
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biology*, 9(7), R114. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-r114>
- Jouzani, G. S., & Taherzadeh, M. J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 5, 152–195. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.4>
- Kang, I. J., Jeon, Y. E., Yin, X. F., Nam, J. S., You, S. G., Hong, M. S., ... Kim, M. J. (2011). Butanol extract of *Ecklonia cava* prevents production and aggregation of beta-amyloid, and reduces beta-amyloid mediated neuronal death. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2252–2259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.023>
- Karstens K., Trippel S., Gorlitz R., Niebelschutz H., Marzocchella A., Goetz P., 2016, Modeling Physiological Differences in Cell Populations: Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation in a Cascade of Continuous Stirred Tank Reactors, *Chemical Engineering Transactions*, 49, 271-276. <https://doi.org/10.3303/CET1649046>
- Karstens, Katja, Trippel, S., & Götz, P. (2021). Process Engineering of the Acetone-Ethanol-Butanol (ABE) Fermentation in a Linear and Feedback Loop Cascade of Continuous Stirred Tank Reactors: Experiments, Modeling and Optimization. *Fuels*, 2(2), 108–129. <https://doi.org/10.3390/fuels2020007>
- Kazi, F. K., Fortman, J. A., Anex, R. P., Hsu, D. D., Aden, A., Dutta, A., & Kothandaraman, G. (2010). Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*, 89(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.01.001>
- Kell, D. B., Peck, M. W., Rodger, G., & Morris, J. G. (1981). On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91715-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91715-0)
- KENIG, M., & READING, C. (1979). Holomycin and an antibiotic(MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *The Journal of Antibiotics*, 32(6), 549–554.

<https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.549>

- Kim, S., Jang, Y.-S., Ha, S.-C., Ahn, J.-W., Kim, E.-J., Hong Lim, J., ... Kim, K.-J. (2015). Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. *Nature Communications*, 6, 8410. <https://doi.org/10.1038/ncomms9410>
- Kujawska, A., Kujawski, J., Bryjak, M., & Kujawski, W. (2015). ABE fermentation products recovery methods - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 48(August 2015), 648–661. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.028>
- Lai, M. C., & Traxler, R. W. (1994). A coupled two-stage continuous fermentation for solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(12), 1021–1025. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90136-8)
- Largier, S. T., Long, S., & Santangelo, J. D. (1985, August 1). Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P262 mutants for solvent production. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346864>
- Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H. B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K., & Jana, M. (2001). Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 15(3), 250–252. <https://doi.org/10.1002/ptr.815>
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209–228. <https://doi.org/10.1002/bit.22003>
- Leimgruber, W., Stefanović, V., Schenker, F., Karr, A., & Berger, J. (1965). Isolation and Characterization of Anthramycin, a New Antitumor Antibiotic. *Journal of the American Chemical Society*, 87(24), 5791–5793. <https://doi.org/10.1021/ja00952a050>
- Li, J., Baral, N. R., & Jha, A. K. (2014). Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover by *Clostridium* species: present status and future perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1145–1157. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1542-7>
- Li, Y., Xu, T., Tschaplinski, T. J., Engle, N. L., Yang, Y., Graham, D. E., ... Zhou, J. (2014). Improvement of cellulose catabolism in *Clostridium cellulolyticum* by sporulation abolishment and carbon alleviation. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-25>

- Liao, Y. C., Lu, K. M., & Li, S. Y. (2014). Process parameters for operating 1-butanol gas stripping in a fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *118*(5), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.04.020>
- Lin, X., Wu, J., Fan, J., Qian, W., Zhou, X., Qian, C., ... Ying, H. (2012). Adsorption of butanol from aqueous solution onto a new type of macroporous adsorption resin: Studies of adsorption isotherms and kinetics simulation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *87*(7), 924–931. <https://doi.org/10.1002/jctb.3701>
- Liu, D., Chen, Y., Ding, F.-Y., Zhao, T., Wu, J.-L., Guo, T., ... Ying, H.-J. (2014). Biobutanol production in a *Clostridium acetobutylicum* biofilm reactor integrated with simultaneous product recovery by adsorption. *Biotechnology for Biofuels*, *7*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-5>
- Llc, A. B. (n.d.). *Butamax™ Advanced Biofuels LLC fact sheet* .
- López-Contreras, A. M., Smidt, H., Van der Oost, J., Claassen, P. A. M., Mooibroek, H., & De Vos, W. M. (2001). *Clostridium beijerinckii* Cells Expressing Neocallimastix patridarum Glycoside Hydrolases Show Enhanced Lichenan Utilization and Solvent Production. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5127-5133.2001>
- Luo, H., Ge, L., Zhang, J., Ding, J., Chen, R., & Shi, Z. (2016). Enhancing acetone biosynthesis and acetone-butanol-ethanol fermentation performance by co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous acetate addition. *Bioresource Technology*, *200*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.116>
- Maddox, I. S., Qureshi, N., & Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using *clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*, *30*(3), 209–215. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)85001-5](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)85001-5)
- Malek, I. (1964). Continuous cultivation of microorganisms : Proceedings of the second symposium held in Prague, June 18-23, 1962. New York: Academic Press.
- Málek, I. (1958). Continuous cultivation of microorganisms : a symposium. In *Formation of neutral solvents in continuous fermentation by means of Clostridium acetobutylicum* (pp. 210–226). Prague: Pub. House of the Czechoslovak Academy of Sciences.
- Mariano, A., & Filho, R. (2012). Improvements in Biobutanol Fermentation and

- Their Impacts on Distillation Energy Consumption and Wastewater Generation. *BioEnergy Research*, 5. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9172-0>
- Marlatt, J. A., & Datta, R. (1986). Acetone-butanol fermentation process development and economic evaluation. *Biotechnology Progress*, 2(1), 23–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.5420020106>
- Matsumura, M., & Kataoka, H. (1987). Separation of dilute aqueous butanol and acetone solutions by pervaporation through liquid membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(7), 887–895. <https://doi.org/10.1002/bit.260300712>
- Mollah, A. H., & Stuckey, D. C. (1993). Feasibility of in situ gas stripping for continuous acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(3), 200–207. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90138-R](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90138-R)
- Monot, F., Engasser, J.-M., & Petitdemange, H. (1984). Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 422–426. <https://doi.org/10.1007/BF00454381>
- Moon, H. G., Jang, Y.-S., Cho, C., Lee, J., Binkley, R., & Lee, S. Y. (2016). One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw001>
- Mutschlechner, O., Swoboda, H., & Gapes, J. R. (2000). Continuous two-stage ABE-fermentation using *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 operating with a growth rate in the first stage vessel close to its maximal value. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 101–105.
- Nakayama, S., Bando, Y., Ohnishi, A., Kadokura, T., & Nakazato, A. (2013). Decreased hydrogen production leads to selective butanol production in co-cultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.020>
- Nakayama, S., Kiyoshi, K., Kadokura, T., & Nakazato, A. (2011). Butanol production from crystalline cellulose by Cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00706-11>
- Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2014). Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion.

Energy Science & Engineering. <https://doi.org/10.1002/ese3.41>

Nguyen, N. P. T., Linder, S., Flitsch, S. K., Schiel-Bengelsdorf, B., D??rre, P., & Soucaille, P. (2016). Cap0037, a novel global regulator of *Clostridium acetobutylicum* metabolism. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01218-16>.

Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Kira, S., Zeng, Q., Gibson, R., ... Smith, D. R. (2001). Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum* Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(16), a823–4838. <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4823>

Oudshoorn, A., van der Wielen, L. A. M., & Straathof, A. J. J. (2009). Adsorption equilibria of bio-based butanol solutions using zeolite. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.08.014>

Oyedapo, O. O., & Araba, B. G. (2001). Antiinflammatory and antioxidant property of saponins of tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] root extract. *Phytotherapy Research*, 15(2), 174–176. <https://doi.org/10.1002/ptr.696>

Park, C. ???H, Okos, M. R., & Wankat, P. C. (1991). Acetone???Butanol???Ethanol (ABE) Fermentation and Simultaneous Separation in a Trickle Bed Reactor. *Biotechnology Progress*, 7(2), 185–194. <https://doi.org/10.1021/bp00008a014>

Pereira, L. G., Dias, M. O. S., Mariano, A. P., Maciel Filho, R., & Bonomi, A. (2015). Economic and environmental assessment of n-butanol production in an integrated first and second generation sugarcane biorefinery: Fermentative versus catalytic routes. *Applied Energy*, 160(September), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.09.063>

Pereira, Lucas G., Chagas, M. F., Dias, M. O. S., Cavalett, O., & Bonomi, A. (2015). Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 96(January), 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.059>

Prüß, B. M., & Wolfe, A. J. (1994). Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12(6), 973–984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01085.x>

Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (1999). Butanol recovery from model

- solution/fermentation broth by pervaporation: Evaluation of membrane performance. *Biomass and Bioenergy*, 17(2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00030-6)
- Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2000). Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy*. [https://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00108-7)
- Qureshi, N., Hughes, S., Maddox, I. S., & Cotta, M. a. (2005). Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27(4), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0402-8>
- Qureshi, N., Liu, S., & Ezeji, T. C. (2012). Cellulosic butanol production from agricultural biomass and residues: Recent advances in technology. In *Advanced Biofuels and Bioproducts*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_15
- Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2000). Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86(4), 225–235. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:225>
- Qureshi, Nasib, & Ezeji, T. C. (2008). Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb.85>
- Qureshi, Nasib, Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., & Blaschek, H. P. (2008). Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.087>
- Qureshi, Nasib, Li, X. L., Hughes, S., Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2006). Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1021/bp050360w>
- Qureshi, Nasib, & Maddox, I. S. (2005). Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction. *Food and Bioproducts Processing*, 83(1), 43–52. <https://doi.org/10.1205/fbp.04163>
- Qureshi, Nasib, Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., ... Cotta, M. A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.12.023>

- Qureshi, Nasib, Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S. R., & Cotta, M. A. (2008). Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.07.004>
- Qureshi, Nasibuddin, & Maddox, I. S. (1995). Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(2), 185–189. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93217-8](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93217-8)
- Qureshi, Nasibuddin, Maddox, I. S., & Friedl, A. (1992). Application of Continuous Substrate Feeding to the ABE Fermentation: Relief of Product Inhibition Using Extraction, Perstraction, Stripping, and Pervaporation. *Biotechnology Progress*, 8(5), 382–390. <https://doi.org/10.1021/bp00017a002>
- Raganati, F., Olivieri, G., Procentese, a., Russo, M. E., Salatino, P., & Marzocchella, a. (2013). Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresource Technology*, 138, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.180>
- Raganati, F., Procentese, A., Olivieri, G., Russo, M. E., Gotz, P., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2016). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a series of packed bed biofilm reactors. *Chemical Engineering Science*, 152, 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.06.059>
- Remi, J. C. Saint, Baron, G., & Denayer, J. (2012). Adsorptive separations for the recovery and purification of biobutanol. In *Adsorption* (Vol. 18, pp. 367–373). <https://doi.org/10.1007/s10450-012-9415-1>
- Rios-Esteva, R., Turner, G. W., Lee, J. M., Croteau, R. B., & Lange, B. M. (2008). A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpenoid essential oil composition in peppermint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2818–2823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712314105>
- Roffler, S. R., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1987). In-situ recovery of butanol during fermentation - Part 2: Fed-batch extractive fermentation. *Bioprocess Engineering*, 2(4), 181–190. <https://doi.org/10.1007/BF00387326>
- Salimi, F., & Mahadevan, R. (2013). Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-95>
- Schügerl, K. (2000). Integrated processing of biotechnology products.

- Biotechnology Advances*. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00051-3)
- Setlhaku, M., Heitmann, S., Górak, A., & Wichmann, R. (2013). Investigation of gas stripping and pervaporation for improved feasibility of two-stage butanol production process. *Bioresource Technology*, *136*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.046>
- Sharma, P., & Chung, W. J. (2011). Synthesis of MEL type zeolite with different kinds of morphology for the recovery of 1-butanol from aqueous solution. *Desalination*, *275*(1–3), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.02.049>
- Shore, P. A., Burkhalter, A., & Cohn, V. H. (1959). A METHOD FOR THE FLUOROMETRIC ASSAY OF HISTAMINE IN TISSUES. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *127*(3), 182 LP – 186. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/127/3/182.abstract>
- Sillers, R., Chow, A., Tracy, B., & Papoutsakis, E. T. (2008). Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance. *Metabolic Engineering*, *10*(6), 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.07.005>
- Stefan Junne. (2010). *Stimulus response experiments for modelling product formation in Clostridium acetobutylicum fermentations*. Technical University of Berlin.
- Takeuchi, Y., Lwamoto, H., Miyata, N., Asano, S., & Harada, M. (1995). Adsorption of 1-butanol and p-xylene vapor and their mixtures with high silica zeolites. *Separations Technology*, *5*(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0956-9618\(94\)00101-W](https://doi.org/10.1016/0956-9618(94)00101-W)
- Tao, L., He, X., Tan, E. C. D., Zhang, M., & Aden, A. (2014). Comparative techno-economic analysis and reviews of n-butanol production from corn grain and corn stover. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *8*(3), 342–361. <https://doi.org/10.1002/bbb.1462>
- Terracciano, J. S., & Kashket, E. R. (1986). Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *52*(1), 86–91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thompson, P. B. (2008). The agricultural ethics of biofuels: A first look. *Journal of*

- Agricultural and Environmental Ethics*, 21(2), 183–198.
<https://doi.org/10.1007/s10806-007-9073-6>
- Thongsukmak, A., & Sirkar, K. K. (2007). Pervaporation membranes highly selective for solvents present in fermentation broths. *Journal of Membrane Science*, 302(1–2), 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.06.013>
- Tomas, C. A., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4951–4965. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4951-4965.2003>
- Vasconcelos, I., Girbal, L., & Soucaille, P. (1994a). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1443–1450. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8113186
- Vasconcelos, I., Girbal, L., & Soucaille, P. (1994b). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Gluco, 176(3), 1443–1450.
- Vrana, D. L., Meagher, M. M., Robert, W., & Duffield, B. (1993). Pervaporation of Model Fermentation Product Solutions Using Polytetrafluoroethylene Membranes. *Separation Science and Technology*, 28(August), 2167–2178. <https://doi.org/10.1080/01496399308016741>
- Weilhammer, C., & Blass, E. (1994). Continuous fermentation with product recovery by in situ extraction. *Chemical Engineering & Technology*, 17(6), 365–373. <https://doi.org/10.1002/ceat.270170602>
- Wen, Z., Wu, M., Lin, Y., Yang, L., Lin, J., & Cen, P. (2014). Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium cellulovorans*. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0092-5>
- Wiehn, M., Staggs, K., Wang, Y., & Nielsen, D. R. (2014). In situ butanol recovery

- from *Clostridium acetobutylicum* fermentations by expanded bed adsorption. *Biotechnology Progress*, 30(1), 68–78. <https://doi.org/10.1002/btpr.1841>
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., & Papoutsakis, E. T. (1988). Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl Environ Microbiol*, 54(11), 2717–2722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347774>
- Xin, F., & He, J. (2013). Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.002>
- Yalkowsky, S. H., He, Y., & Jain, P. (2010). *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press.
- Yang, X., Tsai, G. J., & Tsao, G. T. (1994). Enhancement of in situ adsorption on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Separations Technology*, 4(2), 81–92. [https://doi.org/10.1016/0956-9618\(94\)80009-X](https://doi.org/10.1016/0956-9618(94)80009-X)
- Yang, X., & Tsao, G. T. (1995). Enhanced acetone-butanol fermentation using repeated fed-batch operation coupled with cell recycle by membrane and simultaneous removal of inhibitory products by adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(4), 444–450. <https://doi.org/10.1002/bit.260470405>
- Yoo, M., Bestel-Corre, G., Croux, C., Riviere, A., Meynial-Salles, I., & Soucaille, P. (2015). A quantitative system-scale characterization of the metabolism of *clostridium acetobutylicum*. *MBio*, 6(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01808-15>
- Zhao, Y., Tomas, C. a., Rudolph, F. B., Papoutsakis, E. T., & Bennett, G. N. (2005). Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 530–537. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.530-537.2005>
- Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., & Sonomoto, K. (2015). Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.05.023>
- Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2006). Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the

Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 587–597.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0445-z>

10. Thesen

1. In einem mehrstufigen Bioreaktorsystem (Rührkesselkaskade) kann im Labormaßstab ein stabiler, mehr als 1000 Stunden andauernder Fermentationsprozess mit konstanter Lösungsmittelproduktion durchgeführt werden.
2. In einer mehrstufigen Rührkesselkaskade werden acidogene und solventogene Phasen des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* räumlich voneinander getrennt.
3. Im Vergleich zu Fermentationen mit pH_1 5,6 werden bei pH_1 4,3 höhere Butanol- und Lösungsmittelkonzentrationen c_{But} bzw. c_{LM} erreicht.
4. Die Erhöhung der Verdünnungsrate D führt zur konsequenten Steigerung der Butanol- und Lösungsmittelbildungsraten q_{But} bzw. q_{LM} .
5. Die Zugabe von Acetat in das Medium bewirkt einen positiven Effekt auf die Lösungsmittelbildung.
6. Die Rückführung der butanolhaltigen Fermentationsbrühe mit Zellen in die acidogene Phase hat keine Vorteile hinsichtlich der Lösungsmittelbildung.
7. Die höchsten Lösungsmittelkonzentrationen und -bildungsraten in der Rührkesselkaskade werden bei pH_1 4,3 und $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ in den ersten drei Bioreaktoren erreicht.
8. Die Parametrisierung des mathematischen Modells für die Simulationen von Fermentationsprozessen in der Rührkesselkaskade ermöglicht diese mit hoher Übereinstimmung mit den experimentellen Daten.

11. Appendix

i. Medien

a. Minimalmedium (MS-Medium) für Sporulation

Chemikalie	Konzentration [gL ⁻¹]
Glukose	60
K ₂ HPO ₄	0,55
KH ₂ PO ₄	0,55
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,22
Essigsäure	2,3 mL
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,011
NaCl	1
p-Aminobenzoessäure	0,008
Biotin	80 µg
CaCO ₃	2
H ₂ O	auf 1000 mL
pH (NH ₄)	pH 6,5

b. Clostridium Growth Medium (CGM), (Wiesenborn et al., 1988)

Chemikalie	Konzentration [gL^{-1}]
Glukose	50
K_2HPO_4	0,75
KH_2PO_4	0,75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,71
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
NaCl	1
L-Asparagin	2
Hefeextrakt	5
H_2O	auf 1000 mL
pH (HCl)	pH 6,9

c. Komplexes Medium für die Adaptierung der *C.-acetobutylicum*-Zellen

Chemikalie	Konzentration [gL ⁻¹]
Glukose	50
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ x H ₂ O	0,01
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Hefeextrakt	5
pH (HCl)	pH 6,9

d. Komplexes Medium für die kontinuierliche Fermentation der *C.-acetobutylicum*-Zellen

Chemikalie	Konzentration [gL ⁻¹]
Glukose	60
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ x H ₂ O	0,01
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Hefeextrakt	5

ii. Parameter und Quellcode des mathematischen Modells

a. In der Simulation verwendete Variablen

Variable		Einheit	Standardwert
m.t0	Startzeit der Simulation	h	0 h
m.tEND	Maximale Simulationsdauer	h	72 h
m.dt	Zeitinkrement der Simulation	h	0.05 h
i.nb	Zahl der Bioreaktorstufen		6
i.ns	Zahl der Differenzierungszustände der Zellen		4
i.V_seg	Volumen pro Bioreaktorstufe	L	0.4 L
i.D	Verdünnungsrate in einer Bioreaktorstufe	h ⁻¹	-
i.F_in	Zufütterungsrate	L h ⁻¹	-
i.c_feed	Vektor mit den Metabolitenkonzentrationen im Zufütterungsmedium	g L ⁻¹	-
i.c_seg (c_initial)	Matrix mit Anfangskonzentrationen in den Bioreaktorstufen	g L ⁻¹	-

**b. Programmcode 1 -
model8_16011_MATLAB\kinetic_models\biological_model7_ki
netics**

```
%{
Kinetic modell VII 2015/11
%}

%{
  Biomass production depends on glucose and phosphate
  and is
  inhibited by butanol in a stepwise manner.
  // adapted for two substrates from Srivastava
%}
n(1) = m.mu_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU) *
c(9)/(c(9)+m.KsPO4) ...
      * exp(m.n_iB*(m.KiB-
c(5)))/(1+exp(m.n_iB*(m.KiB-c(5)))));
      % - m.Kd*c(5);

%{
  Phosphate uptake depends on brutto growth of the
  cells
%}
n(8) = - (n(1))/m.Y_xp;

%{
  Acetic acid production depends on the growth-dependent
  and
  growth-independent uptake, which maximum is defined by
  the state of the
  cells. Growth-independent acids production depends on
  the availability
  of glucose.
  Acetic acid uptake depends on state-dependent maximal
  rate and the
  availability of acetic acid and the co-substrate
  glucose.
%}
aa_prod = m.Y_aax * n(1) ...
          + m.r_aa_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

aa_up = - m.k_AA_up * c(6)/(c(6)+m.KsAA) *
c(2)/(c(2)+m.KsGLU);
```

b. Programmcode 1 (Übertrag)

```

n(6) = aa_prod+aa_up;

%{
  Butyric acid production depends on the growth-dependent
  and
  growth-independent uptake, which maximum is defined by
  the state of the
  cells. Growth-independent acids production depends on
  the availability
  of glucose.
  Butyric acid uptake depends on state-dependent maximal
  rate and the
  availability of butyric acid and the co-substrate
  glucose.
%}

ba_prod = m.Y_bax * n(1) ...
          + m.r_ba_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

ba_up = - m.k_BA_up * c(7)/(c(7)+m.KsBA) *
c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

n(7) = ba_prod+ba_up;

%{
  Ethanol production is assumed to be growth-independent.
  It depends on
  the state of the cells and the availability of glucose.
%}

n(4) = m.r_eth_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

%{
  Acetone production is assumed to be growth-independent.
  It depends on
  the state of the cells and the availability of glucose.
%}

n(3) = m.r_act_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

%{
  Butanol production is assumed to be growth-independent.
  It depends on
  the state of the cells and the availability of glucose.
%}

n(5) = m.r_but_max * c(2)/(c(2)+m.KsGLU);

%{

```

b. Programmcode 1 (Übertrag)

```

    Glucose uptake depends on uptake for growth, acid and
    solvent

    production and a state-dependent maintenance term
    accounting e.g.
    for CO2 production
    %}
    n(2) = -( n(1)/m.Yxs ...
              + aa_prod/m.Yaas ...
              + ba_prod/m.Ybas ...
              + n(3)/m.Yeths ...
              + n(4)/m.Yacts ...
              + n(5)/m.YbutS) ...
              *(0.8 + m.r_CO2/6) ;

```

**a. Programmcode 2 -
 model8_160111_MATLAB\parameterfiles\biological_model7_parameters.m**

```

%{
Parameters for kinetic modell VI 2015/11
%}

function m = biological_model7_parameters (state)

if state == 'A'
    s=1;
elseif state == 'I'
    s=2;
elseif state == 'S'
    s=3;
else
    s=4;
end

% maximal growth rate [gS gX-1 h-1] //guessed
mu_max = [1.15 0 0 0];
m.mu_max = mu_max(s);

% affinity constant KsGLU, (state independent?) [gS L-1]
//from Srivastava
% model?

    a. Programmcode 2 (Übertrag)
m.KsGLU = 6.5;

```

```
% affinity constant KsPO4, (state independent?) [gKH2PO4
L-1] //guessed
m.KsPO4 = 0.005;

% inhibition constant Ki for butanol, half maximal acidity
[gB L-1] //guessed
m.KiB = 5;

% coefficient for butanol inhibition term //guessed
m.n_iB = 3;
% biomass phosphate conversion yield [gX gKH2PO4-
1]//calculated from
% 151125_SteadyState_meanF14F16_D0025_pH43
m.Y_xp = 29;

% acetic acid growth-dependent yield [gAA gX-1] //guessed
Y_aax = [2 0 0 0];
m.Y_aax = Y_aax(s);

% acetic acid growth-independent yield [gAA gX-1 h-1]
//guessed
r_aa_max = [1.7 0 0 0];
m.r_aa_max = r_aa_max(s);

% acetic acid growth-independent uptake [gAA gX-1 h-1]
//guessed
k_AA_up = [0 0 1.1 0];
m.k_AA_up = k_AA_up(s);

% affinity constant Kaa [gAA L-1] //KAA from Srivastava
m.KsAA = 10*60/1000;

% butyric acid growth-dependent yield [gBA gX-1] //guessed
Y_bax = [0.8 0.1 0 0];
m.Y_bax = Y_bax(s);

% butyric acid growth-independent yield [gBA gX-1 h-1]
//guessed
r_ba_max = [1 0.1 0 0];
m.r_ba_max = r_ba_max(s);

% butyric acid growth-independent uptake [gBA gX-1 h-1]
//guessed
k_BA_up = [0 0 0.9 0];
```

Programmcode 2 (Übertrag)
<pre> m.k_BA_up = k_BA_up(s); % affinity constant Kba [gBA L-1] //KBA from Srivastava m.KsBA = 8.34*88/1000; % ethanol growth-independent yield [gETH gX-1 h-1] //guessed r_eth_max = [0.01 0.03 0.1 0]; m.r_eth_max = r_eth_max(s); % acetone growth-independent yield [gACT gX-1 h-1] //guessed r_act_max = [0 0.2 0.30 0]; m.r_act_max = r_act_max(s); % butanol growth-independent yield [gBUT gX-1 h-1] //guessed r_but_max = [0 0.6 0.8 0]; m.r_but_max = r_but_max(s); % biomass glucose conversion yield [gX gS-1] - state dependent % //F13_S1_150218 m.Yxs = 0.38; m.Yaas = 6*60/(2*198); m.Ybas = 6*88/(4*198); m.Yeths = 6*46/(2*198); m.Yacts = 6*58/(3*198); m.Ybuts = 6*74/(4*198); m.Yco2s = 6*44/198; % carbon lost as CO2 [mol molS-1] r_CO2 = [0.1 0.1 0.9 0]; m.r_CO2 = r_CO2(s); % differentiation constant [h-1] //guessed mu_d = [0.4 0.95 0 0]; m.mu_d=mu_d(s); % amount of undissociated acid that induces differentiation [g L-1] % //Monot_etal_1984 m.K_UDA = 1.5; m.n_iUDA = 3; </pre>

iii. Grafiken der Parameterschätzung des mathematischen Modells

1. Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

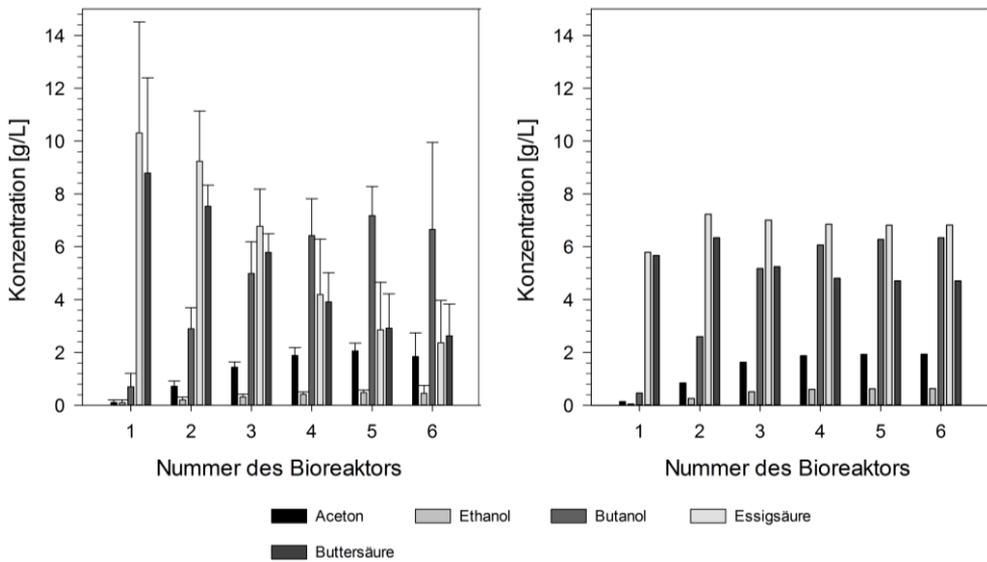


Abbildung 11-1: Vergleich der Konzentrationen der experimentellen kontinuierlichen Fermentation bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$ mit den Konzentrationen der Simulation. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Tabelle 11-1: Übersicht über die Daten der Simulation der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

#Reaktor	$C_{\text{Glc}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Aceton}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Ethanol}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Butanol}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Essigsäure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Buttersäure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{Säure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$C_{\text{LM}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$
1	34,5	0,1	0,0	0,5	5,8	5,7	11,45	0,6
2	17,9	0,8	0,3	2,6	7,2	6,3	13,57	3,7
3	5,0	1,6	0,5	5,2	7,0	5,2	12,25	7,3

Tabelle 11-1 (Übertrag)

4	1,0	1,9	0,6	6,1	6,9	4,8	11,66	8,5
5	0,2	1,9	0,6	6,3	6,8	4,7	11,52	8,8
6	0,1	1,9	0,6	6,3	6,8	4,7	11,53	8,9

Tabelle 11-2: Verteilung der Subpopulationen von *C. acetobutylicum* in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 5,6

Bioreaktor	Acidogene Zellen [%]	Intermediäre Zellen [%]	Solventogene Zellen [%]
1	95	3	2
2	66	24	10
3	48	31	21
4	43	28	28
5	37	28	35
6	29	29	42

2. Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

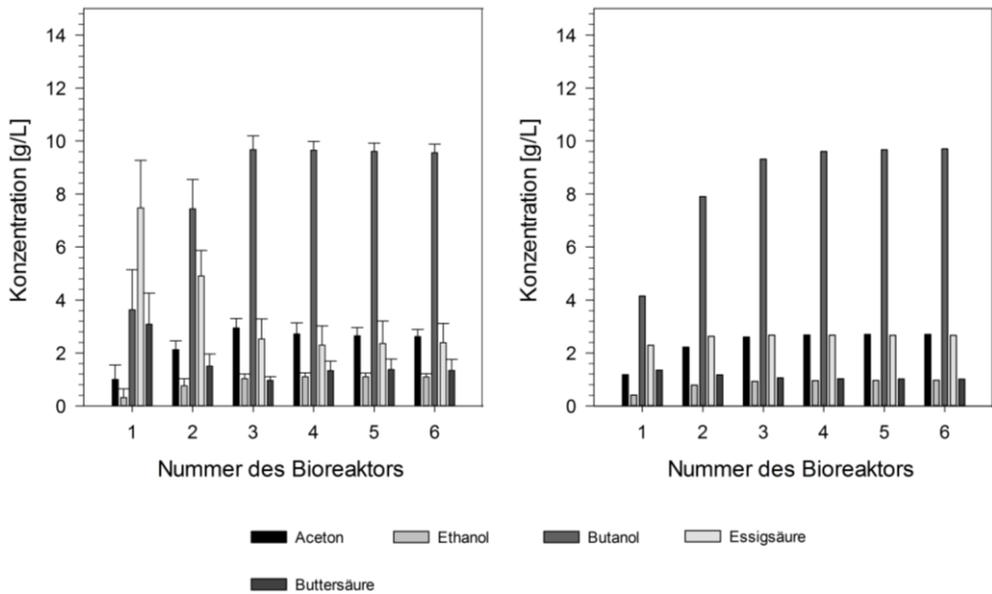


Abbildung 11-2: Vergleich der Konzentrationen der experimentellen kontinuierlichen Fermentation bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit den Konzentrationen der Simulation. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Tabelle 11-3: Übersicht über die Daten der Simulation der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

#Reaktor	$c_{\text{Glc}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Aceton}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Ethanol}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Butanol}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Essigsäure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Buttersäure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Säure}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{LM}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$
1	27,2	1,2	0,4	4,1	2,3	1,4	3,6	5,7
2	8,4	2,2	0,8	7,9	2,6	1,2	3,8	10,9
3	1,8	2,6	0,9	9,3	2,7	1,1	3,7	12,8
4	0,4	2,7	1,0	9,6	2,7	1,0	3,7	13,2
5	0,1	2,7	1,0	9,7	2,7	1,0	3,7	13,3
6	0,1	2,7	1,0	9,7	2,7	1,0	3,7	13,4

Tabelle 11-4: Verteilung der Subpopulationen von *C. acetobutylicum* in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade bei $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Bioreaktor	Acidogene Zellen [%]	Intermediäre Zellen [%]	Solventogene Zellen [%]
1	63	18	19
2	58	17	25
3	57	14	29
4	55	13	32
5	54	12	34
6	54	10	36

3. Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

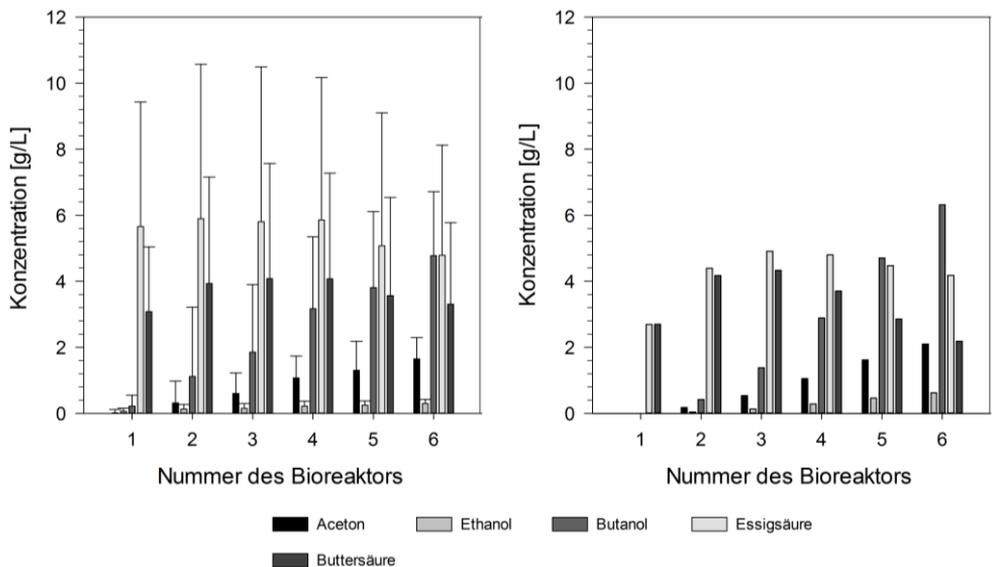


Abbildung 11-3: Vergleich der Konzentrationen der experimentellen kontinuierlichen Fermentation bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$ mit den Konzentrationen der Simulation. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Tabelle 11-5: Übersicht über die Daten der Simulation der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

#Reaktor	$c^{\text{R}}_{\text{Glc}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Aceton}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Ethanol}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Butanol}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Essigsäure}}^{\text{Sim}}$ m [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Buttersäure}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{Säure}}^{\text{Sim}}$ [g/L]	$c^{\text{R}}_{\text{LM}}^{\text{Sim}}$ [g/L]
1	47,6	0,0	0,0	0,0	2,7	2,7	5,4	0,0
2	38,0	0,2	0,0	0,4	4,4	4,2	8,6	0,6
3	30,4	0,5	0,1	1,4	4,9	4,3	9,2	2,1
4	22,1	1,1	0,3	2,9	4,8	3,7	8,5	4,2
5	13,3	1,6	0,5	4,7	4,5	2,9	7,3	6,8
6	6,0	2,1	0,6	6,3	4,2	2,2	6,4	9,0

Tabelle 11-6: Verteilung der Subpopulationen von *C. acetobutylicum* in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 5,6$

Bioreaktor	Acidogene Zellen [%]	Intermediäre Zellen [%]	Solventogene Zellen [%]
1	100	0	0
2	76	20	4
3	59	32	9
4	46	39	15
5	41	38	21
6	41	33	26

4. Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

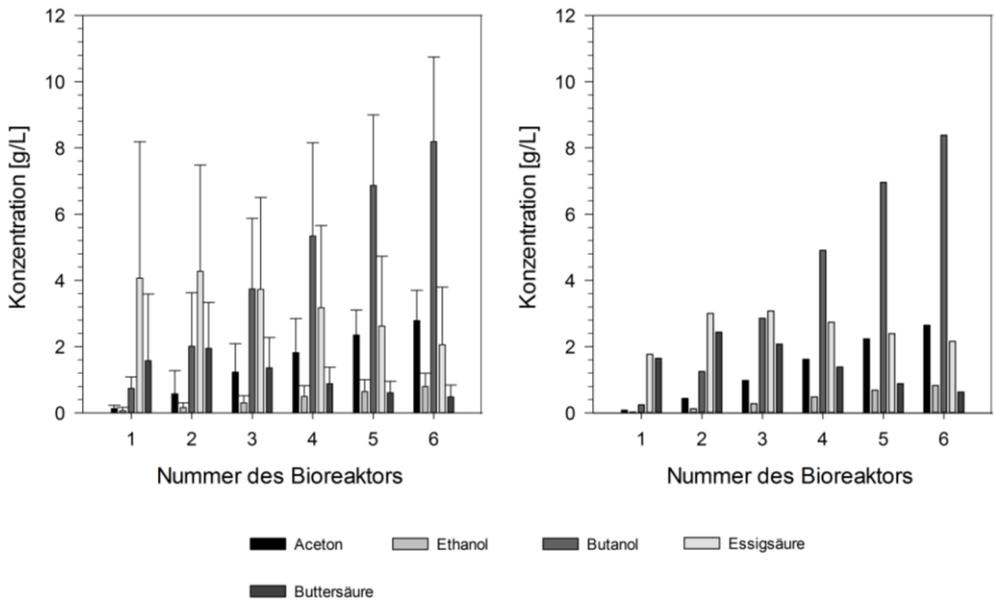


Abbildung 11-4: Vergleich der Konzentrationen der experimentellen kontinuierlichen Fermentation bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit den Konzentrationen der Simulation. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Tabelle 11-7: Übersicht über die Daten der Simulation der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

#Reaktor	$c_{\text{Glc}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Aceton}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Ethanol}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Butanol}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Essigsäure}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Buttersäure}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{Säure}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c_{\text{LM}}^{\text{R, Sim}} [\text{gL}^{-1}]$
1	50,0	0,1	0,0	0,2	1,8	1,6	3,4	0,3
2	38,0	0,4	0,1	1,2	3,0	2,4	5,4	1,8
3	28,7	1,0	0,3	2,9	3,1	2,1	5,1	4,1
4	19,0	1,6	0,5	4,9	2,7	1,4	4,1	7,0
5	9,8	2,2	0,7	7,0	2,4	0,9	3,3	9,9
6	3,6	2,6	0,8	8,4	2,2	0,6	2,8	11,9

Tabelle 11-8: Verteilung der Subpopulationen von *C. acetobutylicum* in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$

Bioreaktor	Acidogene Zellen	Intermediäre Zellen	Solventogene Zellen
	[%]	[%]	[%]
1	86	10	4
2	62	29	9
3	48	37	15
4	40	39	21
5	39	35	26
6	39	30	31

5. Kontinuierliche Fermentationen bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung

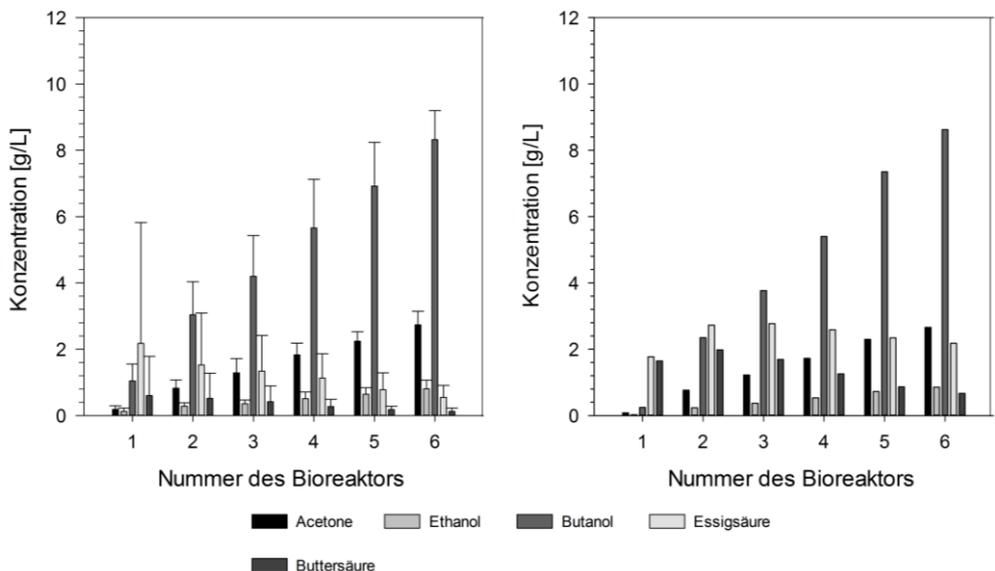


Abbildung 11-5: Vergleich der Konzentrationen der experimentellen kontinuierlichen Fermentation bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_1 4,3$ mit Rückführung der Brühe aus dem vierten in den zweiten Bioreaktor mit den Konzentrationen der Simulation. Links – experimentelle Daten; rechts – Simulation

Tabelle 11-9: Verteilung der Subpopulationen von *C. acetobutylicum* in den Bioreaktoren der Rührkesselkaskade bei $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und $\text{pH}_i 4,3$ mit Rückführung

Bioreaktor	Acidogene Zellen [%]	Intermediäre Zellen [%]	Solventogene Zellen [%]
1	86	10	4
2	58	29	13
3	47	35	17
4	43	36	21
5	42	32	26
6	42	28	30

Tabelle 11-10: Übersicht über die Daten der Simulation der Metabolitenkonzentration der ABE-Fermentationen mit $D = 0,092 \text{ h}^{-1}$ und pH_1 4,3 und Rückführung

$c_{\text{LM}}^{\text{Sim}} / c_{\text{But}}^{\text{Sim}}$ [gL ⁻¹]	$q_{\text{LM}}^{\text{Sim}} / q_{\text{But}}^{\text{Sim}}$ [g(Lh) ⁻¹]	$Y_{\text{g/g}}^{\text{Sim}} [\text{g}_{\text{LM}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$	$Y_{\text{g/g}}^{\text{Sim}} [\text{g}_{\text{But}} (\text{g}_{\text{Glc}})^{-1}]$	$q_{\text{Glc}}^{\text{Sim}} [\text{g(Lh)}^{-1}]$				
12,1/8,6	1,11/0,79	0,21	0,15	5,2				
#Reaktor	$c_{\text{Glc}}^{\text{R Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Aceton Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Ethanol Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Butanol Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Essigsäure Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Buttersäure Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R Säure Sim}} [\text{gL}^{-1}]$	$c^{\text{R LM Sim}} [\text{gL}^{-1}]$
1	50,0	0,1	0,0	0,2	1,8	1,6	3,4	0,3
2	33,4	0,8	0,2	2,3	2,7	2,0	4,7	3,3
3	25,5	1,2	0,4	3,8	2,8	1,7	4,5	5,4
4	17,6	1,7	0,5	5,4	2,6	1,3	3,8	7,7
5	8,7	2,3	0,7	7,4	2,3	0,9	3,2	10,4
6	3,1	2,7	0,9	8,6	2,2	0,7	2,8	12,1

iv. Veröffentlichung

Der Beitrag des Autors der vorliegenden Dissertation zur Veröffentlichung „Modeling Physiological Differences in Cell Populations: Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation in a Cascade of Continuous Stirred Tank Reactors“ ist wie folgt:

- Praktische Laborarbeit: Etablierung von Analysemethoden für GC-FID, Fermentieren, Probenanalyseanalyse, Datenauswertung
- Grafische Darstellung von Versuchsergebnissen (Figure 1, Figure 2 a, b, e, f in der Publikation)
- Verfassen von Texten für 2. Methods, 3. Results

Modeling Physiological Differences in Cell Populations: Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation in a Cascade of Continuous Stirred Tank Reactors

Katja Karstens^{*a}, Sergej Trippel^a, Richard Görlitz^b, Horst Niebelschütz^b, Peter Götz^a

^a Beuth University of Applied Sciences, Bioprocess Engineering, Seestrasse 64, 13347 Berlin, Germany

^b ARGUS Umweltbiotechnologie GmbH, Kitzingstraße 11-13, 12277 Berlin, Germany
katja.karstens@beuth-hochschule.de

Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)-fermentation with *Clostridium acetobutylicum* is a biphasic fermentation process. The formation of organic acids in the so called acidogenesis has to precede the economically interesting phase of solvent formation called solventogenesis. A separation of these metabolic phases in two or more stages of continuously run bioreactors has been successfully applied earlier (Bahl et al., 1982). However no comprehensive mathematical modeling was performed for these multi-stage processes. We now established a new experimental model system, consisting of a cascade of continuous-stirred tank reactors (CCSTR). This arrangement enables us to gain insight into metabolic phases of the ABE-fermentation with an unprecedented resolution. Experimental data collected at two dilution rates are used here to verify a

mathematical model of the continuous ABE-fermentation process. This model takes into account subpopulation dynamics, meaning that a differentiation between cells with enzyme equipments adapted to acidogenic, transition and solventogenic metabolism, respectively, is made. We found that with our applied model the differentiation from acidogenic cells to solventogenic cells takes places in the first bioreactor stage at a dilution rate of 0.042 h^{-1} , while this process is shifted to the second and third bioreactor at a dilution rate of 0.092 h^{-1} . Thus we conclude that the pH alone is not sufficient to trigger the metabolic switch between acidogenesis and solventogenesis.

1. Introduction

The production of acetone, butanol and ethanol with *Clostridium acetobutylicum* is known as ABE-fermentation. Driven by the economic interest in these solvents, intensive research on the biphasic fermentation process and its regulation has been carried out in the past decades. Most of the efforts were focused on batch processes in which the two metabolic phases, acidogenesis and solventogenesis, follow each other in time. During acidogenesis, cells take up substrate sugar and convert it to organic acids, *i.e.* acetic acid and butyric acid, CO_2 and new biomass. During solventogenesis, acetic and butyric acid are taken up by the cells, which then produce butanol, acetone and ethanol. To fuel the solventogenic metabolism, sugar uptake is required as well. Different mathematical models, applying various types of kinetic models, relating the switch of the metabolism to accumulating acids and/or variation of the pH, have been proposed and fit to experimental data (*e.g.* Papoutsakis, et al. 1984; Srivastava and Volesky, 1990; Liao et al., 2015). However in batch fermentation the metabolic switch between acidogenesis and solventogenesis is overlaid by the on-set of spore formation, which makes a mathematical description challenging. The co-occurrence of solvent formation and sporulation can be avoided in continuous processes as described by Grimmmler et al., 2011. Furthermore a spatial separation of the then simultaneously appearing metabolic phases can be achieved in a multi-stage continuous ABE-fermentation process (Bahl et al., 1984). However, to our knowledge no mathematical model of such a system is available so far. We therefore established a new bioreactor system, consisting of a series of six continuous-stirred tank reactors. This set-up enables us to characterize different metabolic phases of the fermentation process. In parallel we set-up a computer simulation with an agent-based modeling principle that takes into account the presence of different types of cell populations in each bioreactor stage. Here we present the first application of this simulator to test a kinetic model based on three subpopulation types: acidogenic cells, intermediate cells and solventogenic cells.

2. Methods

2.1 Experimental Investigations

Continuous fermentations with *C. acetobutylicum* DSM 792 were carried out in a cascade of six linear connected, continuous-stirred tank reactors (total volume 2.4 L) at dilution rates of 0.042 h^{-1} and 0.092 h^{-1} , corresponding to residences times in the cascade of 24 h and 10.8 h respectively. The pH in the first bioreactor tank was controlled to 4.3, while the pH in the other bioreactor tanks was kept unregulated. Further details on the setup of the bioreactor cascade are described in another article of this issue (Trippel et al., 2016).

2.2 Mathematical Modelling

The agent-based model was setup with object-orientated programming (OOP) in MATLAB R2011b. The classes `bioreactor_stage` and `subpopulation` deliver blueprints for the objects (agents) of these types by defining the properties (e.g. position in the cascade, fill volume, dilution rate and further more for the `bioreactor_stage`) and methods (e.g. recalculated current concentration, updating concentration in the influx and others for `bioreactor_stage`) that each object of this class can dispose of. Corresponding to the experimental set-up, the simulator was initialized with six bioreactor stages and three subpopulations per bioreactor stage – acidogenic, intermediate, solventogenic (*Figure.1*). However, these parameters could be adapted easily for a more detailed representation of metabolic states. Concentrations and pH from an experimental steady state were taken as starting point and simulation, consisting of an iterated calculation of the current chemical concentration in each bioreactor stage and the biological rates of the biomass in each bioreactor, was run for a time span of 72 h with a time increment of 0.05 h. This period corresponding to at least three residence times of the cascade was enough to reach new steady state metabolite concentrations in each bioreactor. This new steady state was dependent on the kinetic model and the respective parameter set applied (*Table.1*). Estimated parameters were adjusted manually to fit the experimental data. During simulation, the pH values in the bioreactor stages were kept constant on the values from the experimental data set. According to the kinetic model, subpopulation sizes were modulated by simulating growth, differentiation and transport.

bioreactor_simulator

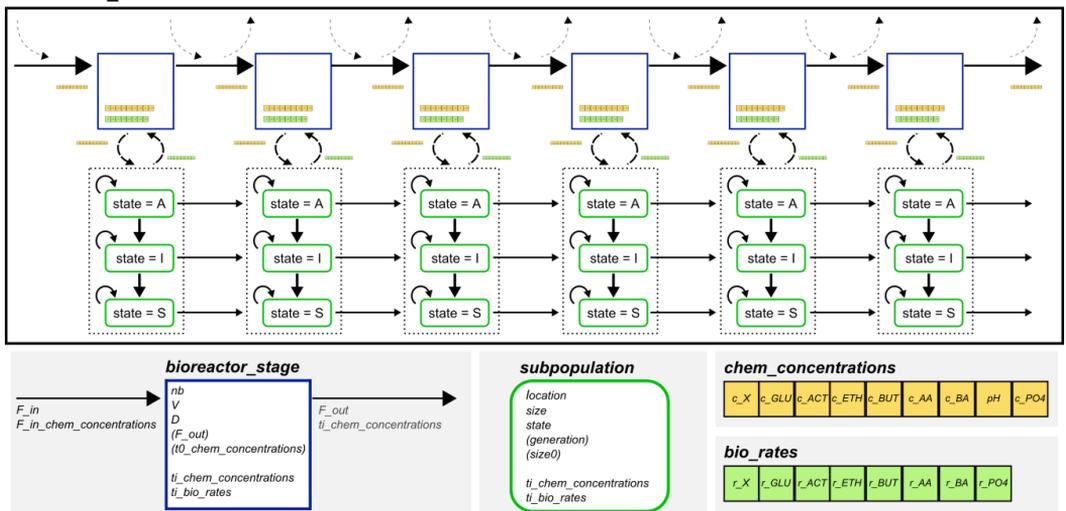


Figure 1: Architecture of the continuous, multi-stage bioreactor simulator. Chemical concentrations (8 metabolites and pH) in each bioreactor stage are changed by composition of the influx and catalytic activity of the biomass. Biomass in each reactor stage is composed of three subpopulation that show different biological rates according to their state (acidogenic (A), intermediate (I) or solventogenic (S)) and their chemical environment. Simulation includes the evolution of the biomass subpopulations, those sizes are modulated by growth, differentiation and transport.

Table 1: Model equations and parameters used for simulation. Highlighted parameters are state depended, thus three values are given for acidogenic^A, intermediate^I and solventogenic^S subpopulations, respectively.

General balance valid for all metabolites (M) and bioreactors (k):

$$\frac{dc_{M,k}}{dt} = \frac{F_{in}}{V} \cdot c_{M,k-1} - \frac{F_{out}}{V} \cdot c_{M,k} + r_{M,k} \cdot c_{x,k} \quad (1)$$

Kinetic equations for:
biomass formation

$$r_{x,k} = \mu_{max} \cdot \frac{c_{PO4,k}}{c_{PO4,k} + K_{SPO4}} \cdot \frac{c_{glu,k}}{c_{glu,k} + K_{Sglu}} \cdot \frac{e^{ni_{but} \cdot (K_{i_{but}} - c_{but,k})}}{1 + e^{ni_{but} \cdot (K_{i_{but}} - c_{but,k})}} \quad (2)$$

acid and solvent production/uptake

$$r_{M,k} = r_{x,k} \cdot Y_{M/x} + r_{M_prod_max} \cdot \frac{c_{glu,k}}{c_{glu,k} + K_{Sglu}} - r_{M_up_max} \cdot \frac{c_{glu,k}}{c_{glu,k} + K_{Sglu}} \cdot \frac{c_{M,k}}{c_{M,k} + K_{SM}} \quad (3)$$

for $M = \{aa; ba; eth; act; but\}$

phosphate and glucose uptake

$$r_{PO4,k} = -r_{x,k} \cdot Y_{PO4/x} \quad (4)$$

$$r_{glu,k} = -(1 + r_{CO2}) \cdot \sum_{M=\{x;aa;ba;eth;act;but\}} \left(\frac{r_{x,k} \cdot Y_{M/x} + r_{M_prod_max} \cdot \frac{c_{glu,k}}{c_{glu,k} + K_{Sglu}}}{Y_{M/glu}} \right) \quad (5)$$

biomass differentiation

$$c_{undiss} = c_{aa,k} \cdot \frac{1 - 10^{-pH}}{10^{-4.78} + 10^{-pH}} + c_{ba,k} \cdot \frac{1 - 10^{-pH}}{10^{-4.86} + 10^{-pH}} \quad (6)$$

$$d_k = d_{max} \cdot \frac{1}{1 + e^{ni_{undiss} \cdot (K_{i_{undiss}} - c_{undiss,k})}} \quad (7)$$

	$r_{M_prod_max}/\mu_{max}$ [h ⁻¹]	$r_{M_up_max}$ [h ⁻¹]	$Y_{M/x}$ [g g ⁻¹]	$Y_{M/glu}$ [g g ⁻¹]	K_{SM} [g L ⁻¹]
metabolites (M)					
biomass (x)	0.95 ^A 0.00 ^I 0.00 ^S	-	-	0.475	-
acetic acid (aa)	1.70 ^A 0.00 ^I 0.00 ^S	0.00 ^A 0.00 ^I 1.20 ^S	1.90 ^A 0.00 ^I 0.00 ^S	1.136	0.600

Appendix

<i>butyric acid (ba)</i>	0.80 ^A 0.30 ^I 0.00 ^S		0.00 ^A 0.00 ^I 1.00 ^S	1.00 ^A 0.30 ^I 0.00 ^S	0.833	0.734
<i>ethanol (eth)</i>	0.01 ^A 0.03 ^I 0.10 ^S		0	0	0.871	-
<i>acetone (act)</i>	0.00 ^A 0.20 ^I 0.30 ^S		0	0	0.732	-
<i>butanol (but)</i>	0.00 ^A 0.60 ^I 0.80 ^S		0	0	0.701	-
<i>phosphate (PO4)</i>	-		-	0.0345	-	0.005
<i>glucose (glu)</i>	-		-	-	-	6.500
<i>further parameters</i>	K_ibut [g L ⁻¹]	n_ibut [-]	r_{CO2} [h ⁻¹]	d_{max} [h ⁻¹]	K_iundiss [g L ⁻¹]	n_iundiss [-]
	5	3	0.02 ^A 0.02 ^I 0.20 ^S	0.40 ^A 0.95 ^I 0.00 ^S	1.5	3

3. Results

A cascade of continuous, stirred-tank reactors (CCSTR) operated in steady state allows separating the acidogenic and the solventogenic phase of the ABE-fermentation in different bioreactor tanks (Trippel et al., 2016). By augmenting the number of bioreactor stages in the cascade, the resolution of the separation can be increased. However, describing the multi-stage ABE-fermentation with a mathematical model based on ordinary differential equations (ODE) then becomes a tough task, as one needs at least $8 \times$ (number of bioreactor stages) ODEs to define the variations of the metabolite concentrations - biomass, acetic acid, butyric acid, ethanol, acetone, butanol, glucose and a growth-limiting nutrient - in all bioreactor tanks. Furthermore, we assume that the biomass is not homogeneous throughout the CCSTR, but rather consists of cells with different expression levels of enzymes for organic acid production or organic acid uptake and solvent production. The consideration of these biomass subpopulations will further increase the number of variables in a mathematical model. Adapting the kinetic equations to test different hypotheses, *e.g.* inhibition of butanol formation by butanol, induction of butanol formation by acetic and butyric acid, inhibition of growth by acetic and butyric acid or by butanol, would be challenging in such complex systems of ODEs. We thus established a simulator for the CCSTR using an agent-based modeling approach. Therefore, we defined prototypes for two types of agents - bioreactor_stages and subpopulations - and equipped them with rules (kinetic laws) on how to react on different input parameters, *i.e.* concentrations of the metabolites for the subpopulation and composition of the influx and biological rates of the containing biomass subpopulations for the bioreactor stage. We then set up the simulator with six copies of the agent type bioreactor_stage as in the experimental setup and three copies of the agent type subpopulation per bioreactor representing the acidogenic, the intermediate and the solventogenic cells, respectively (*Figure.1*). Starting from an initial data set, the system evolves towards a steady state corresponding to the kinetic model and parameters applied by iterative calculations of the autonomous agents. To test the simulator, we applied the kinetic model given in *Table.1*, which was derived based on the works from Horvat et al. (2013) and Monot et al. (1984). Key features of this model are (I) phosphate- (and glucose-) limited growth of only solventogenic subpopulations, inhibited by increasing concentrations of butanol in a stepwise manner, (II) state-dependent organic acid formation with growth-dependent and growth-independent parts, (III) state-dependent organic acid uptake depending on the presence of the respective acid and the co-substrate glucose, (IV) state-dependent solvent formation with only growth-independent terms, (V) growth rate dependent phosphate uptake, (VI) growth rate and product formation rates dependent glucose uptake with a state-dependent maintenance term and (VII) differentiation from acidogenic to intermediate cells and from intermediate to solventogenic cells mediated by the concentrations of undissociated organic acids. Parameters were taken from literature, *e.g.* $K_{i\text{undiss}} = 1.5 \text{ g L}^{-1}$ (Monot et al., 1984) and $K_{S\text{glu}} = 6.5 \text{ g L}^{-1}$ (Srivastava et al., 1990), derived from experimental data, *e.g.* $Y_{\text{PO}_4/\text{x}} = 0.0345 \text{ g g}^{-1}$ and $K_{i\text{but}} = 5 \text{ g L}^{-1}$ or approximated and adapted manually to fit the simulated steady states to the experimental steady states of the CCSTR presented in Trippel et al. (2016). With the parameter set given in *Table.1* a good approximation was achieved for the experimental data recorded at a dilution rate of 0.092 h^{-1} (*see Figure.2*). Both experimental and simulated data show domination of

the metabolite spectra by acetic and butyric acids in the first three bioreactors, which changes to domination by solvents in bioreactor 4 to 6. The glucose concentration decreases stepwise over the complete cascade and reaches a concentration of around 5 g L^{-1} at the outflow of the cascade. While the total biomass concentrations in the simulation equal the measured biomass concentrations, the simulation offers further insights in the composition of the biomass. According to the here applied model, the differentiation from acidogenic to solventogenic cells takes place in the second and third bioreactor of the cascade at a dilution rate of 0.092 h^{-1} . Also for the dilution rate of 0.042 h^{-1} the simulation with the here presented model parameters reflects the experimental data. At this dilution rate the domination of the metabolite spectrum by solvents starts already in the second bioreactor and depletion of glucose happens between the third and fourth bioreactor. However the decrease of total biomass, observed for the third to sixth bioreactor in the experiment, is not reproduced by the simulation as the here presented model does not include cell lysis. This leads to an overestimation of butanol and acetone production and acetic and butyric acid uptake in the later bioreactors of the simulation. Nevertheless one can say that differentiation from acidogenic to finally solventogenic cells already takes place in the first two stages of the CCSTR under this condition.

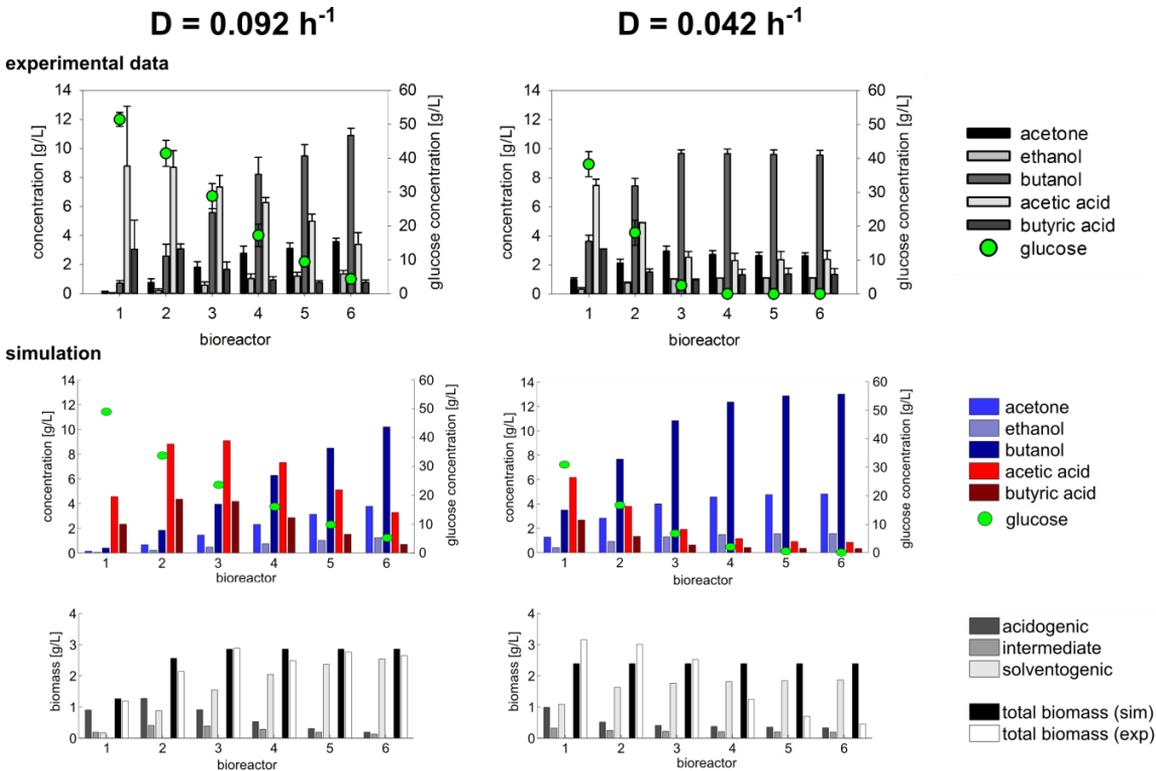


Figure 2: Comparison of metabolite concentrations in experimental (Trippel et al., 2016) and simulated steady states reached at dilution rates of 0.092 h^{-1} and 0.042 h^{-1} , respectively. Simulated steady states include distributions of the three subpopulations (acidogenic, intermediate and solventogenic biomass) in each bioreactor. Sums of

biomasses from all subpopulations in the bioreactor are compared with the biomass concentrations found in the experiment.

4. Discussion

We here present the first application of a new agent-based model for simulation of ABE-fermentation processes in a CCSTR. This type of model offers the advantage to be easily extendable to multiple bioreactor stages and biomass subpopulations and easily adaptable to new kinetic models. However no parameter optimization algorithms are available at this point. Establishing an automated parameter optimization with a reasonable calculation demand will thus be the focus of our future research.

Nevertheless, even in the present state the simulator allowed the verification of a here proposed kinetic model based on the presence of three types of cells characterized by acidogenic metabolism, by metabolism of the transition phase or by solventogenic metabolism. The here presented simulations deliver insight in the possible composition of the biomass in each bioreactor tank. Our model implies that the metabolic switch is already induced in the first bioreactor at $D = 0.042 \text{ h}^{-1}$, while the first bioreactor of the cascade run at $D = 0.092 \text{ h}^{-1}$ is dominated by acidogenic cells, though both bioreactor stages are regulated at pH 4.3. This leads to the hypothesis that the pH alone is not sufficient to trigger the switch from acidogenesis to solventogenesis as assumed in earlier models (Millat et al., 2013). To clarify the regulatory mechanisms behind the switch of clostridial metabolism, the consideration of intracellular fluxes might be important. Due to the flexibility of the simulator we will also be able to test structured kinetic models taking into account selected intracellular metabolites as in the works of Liao, et al. (2015) and Millat et al. (2013) in future studies.

Furthermore, the simulator allows us to analyse the impact of additional feeding points as in Horvat et al. (2013) and recirculation between bioreactor stages. Once validated, such models will enable us to determine optimal feeding and pH control strategies for a continuous butanol production process.

5. Conclusions

This work presents the first step of an agent-based model for a continuous, multi-stage ABE-fermentation process. The here described simulator takes into account the presence of different types of subpopulation in each bioreactor tank, characterized by different catabolic activities. It further enables the conversion of cells from one subpopulation type

to another and thus forms the fundament for testing different hypotheses of what triggers such metabolic switches.

Acknowledgments

This work is part of the OPTISOLV project, supported within the frame of the ERA-Net EuroTransBio-7 initiative by the German ministry „Bundesministerium für Bildung und Forschung“ under reference number 031A231C.

Reference

- Bahl H., Andersch, W. and Gottschalk G., 1982, Continuous Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a Two-Stage Phosphate Limited Chemostat, *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 15, 201-205.
- Grimmler C., Janssen H., Krausse D., Fischer R. J., Bahl H., Dürre P., Liebl W., Ehrenreich A., 2011, Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 20, 1-15.
- Horvat P., Spoljarric I.V., Lopar M., Atlic A., Koller M., Braunnegg G., 2013, Mathematical modelling and process optimization of a continuous 5-stage bioreactor cascade for production of poly[-(R)-3-hydroxybutyrate] by *Cupriavidus necator*, *Bioprocess Biosyst Eng*, 36, 1235-1250.
- Liao c., Seo s., Celik V.,Lui H., Kong W., Wang Y. Blaschek H., Jin Y.-S., Lu T., 2015, Integrated, systems metabolic picture of acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 112,201423143.
- Millat T., Janssen H., Thorn G., King J., Bahl H., Fischer R., Wolkenhauer O., 2013, A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 6451-6466.
- Monot F., Engasser J.-M., Petitdemange H., 1984, Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 19, 422-426.
- Papoutsakis E. T., 1984, Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 174-187.
- Srivastava A., Volesky B., 1990, Updated model of the batch acetone-butanol fermentation, *Biotechnology letters*, 12, 693-698.
- Trippel S., Karstens K., Marzocchella A, Götz P., 2016, Influence of controlled pH on butanol production during ABE-fermentations in a continuous multi-stage bioreactor cascade, *Chemical Engineering Transaction*, *this issue*

List of recent Dissertations at the Chair of Bioprocess Engineering

1. Ángel Córcoles García (2019) Molecular genetic approaches to decrease mis-incorporation of non-canonical branched chain amino acids into a recombinant protein in *Escherichia coli*
2. Moonsung Cho (2019) Suspension of a point-mass-loaded filament in non-uniform flows: the ballooning flight of spiders
3. Sarah Kamel (2019) Enzymatic synthesis of α -D-pentosefuranose-1-phosphate
4. Heba Yehia Mohamed (2019) Chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogs as potential medicinal agents
5. Funda C. Ertem (2019) Life cycle assessment and modeling approaches as a combined evaluation tool for sustainable control strategies at biogas plants
6. Emmanuel Anane (2019) Model based strategies for scale-down studies in fed-batch cultivation of *Escherichia coli* expressing protein
7. Martin Kögler (2018) Advanced Raman spectroscopy for bioprocess monitoring
8. Anna Maria Marbá (2018) Monitoring of the single-cell morphology for the evaluation of microbial eukaryotic bioprocesses
9. Juan Antonio Arzate (2018) Modeling and simulation of biogas production based on anaerobic digestion of energy crops and manure
10. Anika Bockisch (2018) Mobile multi-parameter measurements for the dynamic analysis of gradients in brewing vessels
11. Elvis Legala (2018) Reconstruction of the lanthipeptide ruminococcin-A biosynthesis machinery in *Escherichia coli* and structural characterization
12. Ekaterina Osmekhina (2018) Quantitative approach for detection of RNA and proteins by sandwich hybridization technology
13. Anja Lemoine (2017) Impact of oscillations in substrate and oxygen availability on *Corynebacterium glutamicum* cultivations