

Allgemeine Einleitung und Zielsetzung

Fossile Rohstoffe, wie Öl, Gas oder Kohle, die als Energieträger und Ausgangsstoffe in der chemischen Industrie eingesetzt werden, sind nur in begrenzten Mengen verfügbar. Die Entwicklung nachhaltiger, biotechnologischer Prozesse zur großtechnischen Produktion von Chemikalien und Biokraftstoffen, ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen, gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung [1, 2]. Die mikrobielle Produktion von Biobutanol durch Aceton-Butanol-Ethanol (ABE)-Fermentation ist ein Beispiel für ein Verfahren, das sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie in den letzten Jahren auf vermehrtes Interesse gestoßen ist [3, 4]. Das Molekül *n*-Butanol wird einerseits in der Lackindustrie als Lösemittel genutzt und beispielsweise als Syntheschemikalie für Acrylate eingesetzt. Andererseits gilt es als vielversprechender Biokraftstoff [5]. Butanol besitzt vergleichbare Eigenschaften wie Benzin bezüglich seiner Energiedichte, der Verdampfungsenthalpie, der Research-Oktanzahl¹ und des benötigten Luft-Kraftstoffverhältnisses und könnte damit das bisher eingesetzte Ethanol als Kraftstoffadditiv/-substituenten ersetzen [7]. Für den Biobutanolmarkt ist eine jährliche Wachstumsrate von 9,25 % für die Jahre 2018 bis 2023 vorhergesagt worden [8].

Die ABE-Fermentation ist im 20. Jahrhundert bereits in verschiedenen Ländern der Welt industriell durchgeführt worden, wurde im weiteren Verlauf des Jahrhunderts allerdings durch die petrochemische Synthese abgelöst [9–12]. In den letzten Jahren wurden jedoch wieder neue Anlagen von verschiedenen Unternehmen gebaut oder geplant [12–14]. Die Herausforderung bei der Etablierung eines nachhaltigen, biotechnologischen Butanolproduktionsprozesses liegt vor allem darin nachwachsende, kostengünstige Substrate einzusetzen, die Produktivitäten zu steigern, sowie in der Produktabtrennung [15]. Letzteres könnte durch einen möglichen Einsatz von ABE-Mischungen in Verbrennungsmotoren zukünftig erleichtert werden [16]. Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe, wie Holzabfällen, Weizen- und Gerstenstroh, Rutenhirse oder Energiemais als Kohlenstoff- und Energiequellen ist bereits für verschiedene Substrate erfolgreich gezeigt worden [3, 17–20]. Im Zuge dieser Arbeit soll die Möglichkeit einer Steigerung der Butanolproduktion durch die Kombination der konventionellen ABE-Fermentation mit einem elektrochemischen Elektronentransfer untersucht werden. Dafür wird der grampositive, strikt anaerobe Modellstamm *Clostridium acetobutylicum* eingesetzt.

Die Verbindung biologischer Prozesse mit elektrochemischen Reaktionen ist für verschiedene mikrobielle und enzymatische Systeme im Labormaßstab durchgeführt worden [21–25]. Der Begriff Elektrofermentation beschreibt dabei bioelektrochemische Systeme, bei denen eine mikrobielle Kultivierung mit einer Elektrode als Elektronendonator und/oder -akzeptor für die Zellen durchgeführt wird [22, 26]. In der vorliegenden Untersuchung wird eine Kathode als zusätzliche Elektronenquelle neben dem Substrat Glucose in unterschiedlichen Reaktorsystemen eingesetzt. Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses eines angelegten kathodischen Potentials auf die Zellen von *C. acetobutylicum* und deren Butanolbildung während der Elektrofermentation. Die vorliegende Ausarbeitung fokussiert sich auf drei Unterziele (Teile I - III), die nachfolgend kurz vorgestellt werden.

¹Maß für die Klopfestigkeit (Widerstand gegen Selbstzündung) eines Kraftstoffs bei Beschleunigung und geringer Motorbelastung [6].



In Teil I wird zunächst der Aufbau eines geeigneten Versuchsstands zur Durchführung erster Elektrofermentationen mit *C. acetobutylicum* realisiert. Danach werden Versuchsparameter, wie das anzulegende Potential, die Anforderungen an das Reaktionssystem und -medium oder die nötige Zugabe von Mediatormolekülen² untersucht. Die Ergebnisse davon stellen die Grundlage für ein optimiertes Versuchsdesign dar, das den Vergleich der konventionellen Kultivierung mit der Elektrofermentation auf Produktbildungsebene erlaubt.

Der darauffolgende Teil II beschäftigt sich mit der Fragestellung eines geeigneten Reaktorsystems für die Biobutanolgewinnung mittels Elektrofermentation. Dabei werden positive und negative Einflüsse von getrennten und einzelligen bioelektrochemischen Systemen gegenübergestellt und die Übertragung des Prozesses in einen konventionellen Bioreaktor realisiert. Abschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse dieses Teils eingesetzt, um einen neuen Reaktortypen zu entwickeln, dessen Design sich am klassischen Rührkesselreaktor für Bioprozesse orientiert, der aber die Integration großflächiger Elektroden erlaubt.

In Teil III der Arbeit werden mögliche Elektronentransfermechanismen und weitere metabolische Veränderungen während der Elektrofermentation genauer betrachtet. Der Schwerpunkt wird hierbei auf die Untersuchung der Flavinbildung gelegt, da Flavine als Mediatoren in bioelektrochemischen Systemen bekannt sind. Andererseits können sie auch in Folge einer Eisenlimitierung gebildet werden [27, 28]. Um eine Flavinsekretion aufgrund von Eisenlimitierung auszuschließen, wird genauer betrachtet, ob und in welcher Form die Eisenverfügbarkeit bei Elektrofermentationen beeinträchtigt ist und welche Auswirkungen dies auf die Produktbildung hat. Der Einfluss von Eisenlimitierungen auf die Flavinbildung bei *C. acetobutylicum* ist bisher nicht im Detail untersucht worden und stellt deshalb einen zusätzlichen Beitrag zur Erforschung des Metabolismus des Bakteriums dar. Neben der Betrachtung der Flavine als potentielle Mediatoren wird außerdem eine mögliche Bildung leitfähiger Zellappendizes zur Realisierung eines direkten extrazellulären Elektronentransfers zwischen Elektrode und Bakterienzellen geprüft. Dafür werden die Appendizes am Rasterelektronenmikroskop visualisiert und mittels leitfähiger Atomkraftmikroskopie auf ihre Leitfähigkeit untersucht werden.

Alle drei Hauptteile der Ausarbeitung geben nach einer kurzen Einleitung zunächst eine Übersicht über theoretische Aspekte und die verwendeten Materialien und Methoden, bevor die Ergebnisse vorgestellt und diskutiert werden. Zum Abschluss der einzelnen Bereiche folgt eine kurze Zusammenfassung mit einem Ausblick.

²Substanzen, die den Transport von Elektronen von der bzw. zur Elektrode übernehmen.



Teil I

Grundlegende Untersuchungen zur Elektrofermentation mit *Clostridium* *acetobutylicum*



1 Einleitung

Verschiedene mikrobielle elektrochemische Systeme sind in den letzten Jahren für unterschiedliche Anwendungen, wie beispielsweise die Bereitstellung elektrischer Energie in Form von mikrobiellen Brennstoffzellen, zur Abwasseraufbereitung oder zur Produktion von Chemikalien beschrieben worden [29–31]. Die elektrochemische Beeinflussung der Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* zur Steigerung der Butanolbildung ist in der Literatur bisher nur unter Einsatz von exogenen Mediatorsubstanzen mit oder ohne zusätzlichem Anlegen eines elektrischen Potentials betrachtet worden [32–35]. Untersuchungen in mediatorfreien bioelektrochemischen Systemen sind bisher für diesen Stamm nicht erfolgt. Aus diesem Grund wird im ersten Teil dieser Arbeit die Butanolbildung durch Elektrofermentation ohne exogene Mediatorzugabe mit *C. acetobutylicum* betrachtet und mit den Ergebnissen des bereits in der Literatur beschriebenen Einsatzes des Mediators Neutralrot verglichen. Ziel ist dabei eine Steigerung der Butanolproduktion gegenüber Kontrollkultivierungen ohne angelegtes elektrisches Potential zu erreichen. Dabei wird zunächst in Kapitel 2 ein Überblick über mikrobielle und elektrochemische Grundlagen gegeben und anschließend die verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt (Kapitel 3). In Kapitel 4 folgt eine Beschreibung der experimentellen Etablierung und Optimierung der Elektrofermentation mit *C. acetobutylicum*, bevor genauer auf die Produktbildung im mediatorfreien System eingegangen wird.



2 Theoretische Grundlagen

Im vorliegenden Kapitel werden theoretische Grundkenntnisse zu dem in dieser Arbeit eingesetzten Bakterium *Clostridium acetobutylicum* (Abschnitt 2.1), den mikrobiellen elektrochemischen Technologien (Abschnitt 2.2) sowie dem Stand bisheriger Untersuchungen zur Elektrofermentation für die Butanolgewinnung mit Clostridien (Abschnitt 2.3) dargelegt.

2.1 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum ist ein strikt anaerobes, grampositives, Endosporen bildendes Bakterium mit einer Größe von $0,5-0,9\ \mu\text{m} \times 1,6-1,9\ \mu\text{m}$ [36, 37]. Es wird seit seiner Isolierung von Weizmann [38] im Jahr 1915 als Modellstamm für die in dieser Arbeit näher betrachtete Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation (ABE-Fermentation) eingesetzt (s. Abschnitt 2.1.1). Trotz der Sequenzierung des Genoms im Jahr 2011 [39] sowie neuer Modell-basierter Analysen des Stoffwechsels [40, 41] ist der Metabolismus des Bakteriums noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies stellt eine Herausforderung für die industrielle ABE-Fermentation dar. Im vorliegenden Kapitel wird der zentrale Kohlenstoffmetabolismus als Übersicht (Abschnitt 2.1.2) sowie der Säure-Lösemittelübergang (Abschnitt 2.1.3) beschrieben. In Teil III dieser Arbeit wird auf einzelne Aspekte des Stoffwechsels im Detail eingegangen.

2.1.1 Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation

Zur Zeit des ersten Weltkriegs wurde die ABE-Fermentation in verschiedenen Ländern etabliert und anschließend industriell durchgeführt [9–11]. Bis ca. 1950 wurden so 66 % des weltweit eingesetzten Butanols biotechnologisch, zumeist mit Melasse als Ausgangssubstrat, hergestellt [42]. Während in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Fermentation durch steigende Rohstoff- und sinkende Rohölpreise fast weltweit durch die petrochemische Synthese ausgehend von Propylen ersetzt wurde, ist in China die ABE-Fermentation noch bis 2004 mit Kapazitäten von bis zu 170 000 t pro Jahr eingesetzt worden [12].

Aufgrund der zukünftig vorhergesagten Limitierungen fossiler Rohstoffe sind große Unternehmen wie BP, DuPont und Chevron Oronite Company bestrebt, eine Wiederbelebung der industriellen ABE-Fermentation weltweit zu erreichen [12–14]. Das Interesse am Hauptprodukt Butanol ist dabei sowohl aufgrund seiner Bedeutung als Plattformchemikalie als auch aufgrund einer möglichen Nutzung als Biokraftstoff groß. Butanol besitzt mit $29,2\ \text{MJ}\cdot\text{l}^{-1}$ eine vergleichbare Energiedichte wie Benzin mit $32,5\ \text{MJ}\cdot\text{l}^{-1}$. Es ist darüber hinaus auch in seinen weiteren Eigenschaften (Verdampfungsenthalpie, Research-Oktanzahl, Luft-Kraftstoffverhältnis) mit Benzin als Treibstoff vergleichbar [7]. Neben dem Einsatz von reinem Butanol als Kraftstoff (additiv), stellen erste Untersuchungen mit ABE-Mischungen die Nutzung dieser drei Lösemittel gemeinsam als Biokraftstoff in Perspektive. Zhang et al. [16] zeigten, dass eine ABE-Mischung (volumetrisches Verhältnis 3:6:1¹) sehr ähnliche Verbrennungseigenschaften wie reines Butanol aufweist.

¹Fermentativ wird typischerweise ein Massenverhältnis der ABE-Produkte von 3:6:1 erreicht [9, 43].

2.1.2 Zentraler Kohlenstoffmetabolismus

Abb. 1 zeigt den zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *C. acetobutylicum* mit Glucose als Ausgangssubstrat. Der Abbau des C₆-Zuckers und die daraus resultierende Produktbildung erfolgen in zwei Phasen. In der Acidogenese, die der exponentiellen Wachstumsphase entspricht, werden hauptsächlich Acetat und Butyrat gebildet. Des Weiteren kommt es zu einer Entwicklung von CO₂ und H₂ [44]. Außerdem kann Lactat produziert werden [43]. In der gegen Ende der exponentiellen Phase einsetzenden Solventogenese werden Acetat und Butyrat reassimiliert und parallel zur Glucose zu den Lösemitteln Aceton, Butanol und Ethanol verstoffwechselt [43]. Des Weiteren ist die Sekretion des in der Lebensmittelindustrie als Aromastoff eingesetzten Moleküls Acetoin (3-Hydroxy-2-butanon) in geringen Konzentrationen ($c_{\text{Acetoin}} < 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) in der frühen Solventogenese beschrieben worden [42, 45, 46]. Acetoin wird aktuell großtechnisch über chemische Synthesewege ausgehend von fossilen Rohstoffen hergestellt [47]. Es wächst allerdings zunehmend das Interesse an der biotechnologischen Gewinnung von Acetoin als natürlichen Aromastoff [46, 47].

Wie Abb. 1 zu entnehmen ist, sind die Kofaktoren Nikotin-Adenin-Dinukleotid (NAD) und Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) in ihrer oxidierten (NAD(P)⁺) und reduzierten Form (NAD(P)H) an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt. In der Glycolyse werden pro Mol Glucose zwei Mol reduzierte Kofaktoren gebildet. Zwei weitere Mol NAD(P)H können zusätzlich durch die Oxidation von Ferredoxin (Fd) über die Ferredoxin:NAD(P) Oxidoreduktase (FNOR) gewonnen werden [48]. Diese Reaktion steht allerdings in Konkurrenz zur Regeneration des oxidierten Fds über die Bildung von H₂ (s. Abb. 1). In entgegengesetzter Richtung wäre eine enzymatische Bildung von NAD(P)⁺ über die FNOR ebenfalls möglich, jedoch aufgrund des höheren Redoxpotentials von Fd mit -629 mV im Vergleich zu $E_{\text{NAD}^+/\text{NADH}} = -519 \text{ mV}$ bei physiologischen pH-Werten aus thermodynamischer Sicht ungünstig [49–51]. Laut Jungermann et al. [52] gibt es allerdings Hinweise darauf, dass diese Reaktion in der exponentiellen Wachstumsphase in Richtung der Oxidation von NADH stattfindet, wohingegen in der Solventogenese NADPH über Fd produziert wird.

Die benötigte Anzahl reduzierter Kofaktoren für die Bildung von jeweils einem Mol der verschiedenen Hauptprodukte der ABE-Fermentation ist in Tab. 1 zusammengefasst. Butanol ist dabei mit vier Mol reduzierten Kofaktoren pro Mol Lösemittel das Produkt, welches am meisten reduzierte Pyridinnukleotide benötigt und dessen Synthese als Einziges eine negative NAD(P)H-Nettobilanz besitzt (unter Annahme der Oxidation von Fd über eine H₂-Bildung). Damit muss zunächst durch die Bildung von Acetat während der Acidogenese ein Überschuss an reduzierten Kofaktoren entstehen, bevor Butanol produziert werden kann [53]. Bei der Synthese der Säuren wird außerdem Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, das in der Solventogenese für die Reassimilation benötigt wird [54]. Der Übergang zwischen Acido- und Solventogenese wird im Abschnitt 2.1.3 genauer beschrieben.

Tab. 1: Anzahl benötigter Mol NAD(P)H für die Synthese von jeweils einem Mol der Hauptprodukte der ABE-Fermentation bei Glucose als Kohlenstoff- und Elektronenquelle (nach [54, 55]).

Produkt	Acetat	Butyrat	Lactat	Aceton	Butanol	Ethanol	Acetoin
NAD(P)H / mol	0	2	1	0	4	2	0

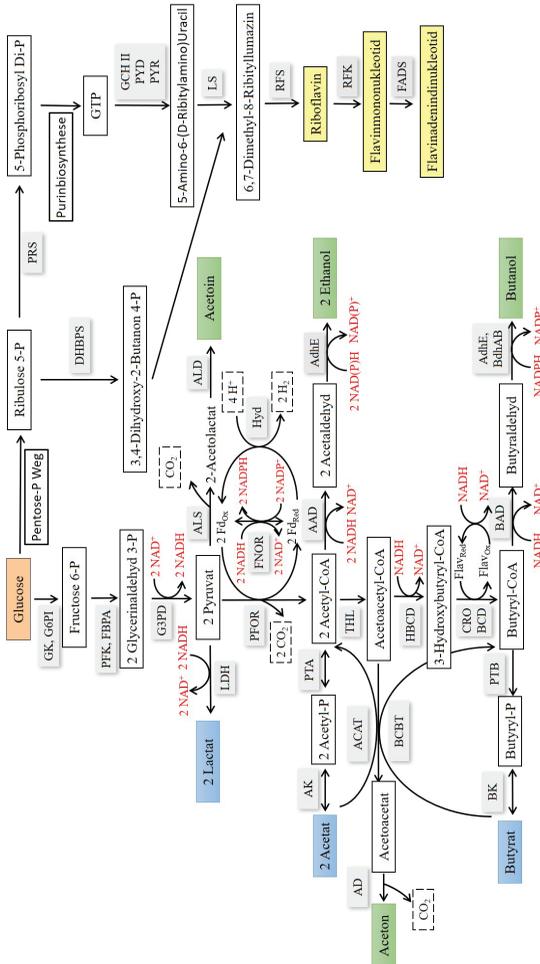


Abb. 1: Zentraler Kohlenstoffmetabolismus und Flavinsynthesewege von *C. acetobutylicum* (nach [39, 40, 48, 56]).

Orange: Substrat, blau: acidogene Produkte, grün: solventogene Produkte, gelb: Flavine, dunkelgrün: Gene, hellgrün: Enzyme, CoA: Coenzym A, GTP: Guanosintriphosphat, Fd: Ferredoxin, NAD(P): Nikotin-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat), ox/red: oxidiert/reduziert, P: Phosphat, GK: Glukosinase, G6PI: Glucose-6-P-Isomerase, PFK: Phosphofruktokinase-1, FBPA: Fructose-Bisphosphat Aldolase II, G3PD: Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase, LDH: Lactat-Dehydrogenase, ALS: Acetolactat-Synthase, PFOR: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, FNOR: Ferredoxin:NAD(P)-Oxidoreduktase, Hyd: Hydrogenase, PTA: Phosphotransacetylase, AK: Acetylkinase, AAD: Acetaldehyd-Dehydrogenase, AdhE: Alkohol-Dehydrogenase, THL: Thiolase, ACAT: Acetoacetyl-CoA:Acetat Transferase, BCBT: Butyryl-CoA:Butyrat Transferase, AD: Acetoacetyl-CoA:Acetat Transferase, HBCD: 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, CRO: Crotonase, BCD: Butyryl-CoA Dehydrogenase, PTB: Phosphotransbutyrylase, BK: Butyrylkinase, BAD: Butyraldehyd-Dehydrogenase, BdhA und BdhB: Butanol-Dehydrogenase Isoenzyme A und B, PRS: Phosphoribosylpyro-P, DFHBS: 3,4-Dihydroxy-2-Butanon 4-P Synthase, GCH II: GTP Cyclohydrolase, PYD: Pyrimidindeaminase, PYR: Pyrimidinreduktase, LS: Lumazinsynthase, RFS: Riboflavinsynthase, RFK: Riboflavinkinase, FADS: Flavinadenindimukleotidsynthase.

2.1.3 Säure-Lösemittelübergang in Satzkultivierungen

C. acetobutylicum ist nicht in der Lage, einen konstanten intrazellulären pH-Wert aufrechtzuerhalten. Stattdessen sind die Zellen laut Huang et al. [57] bestrebt, die protonenmotorische Kraft (PMF), die sich aus dem pH- (und damit H^+ -) Gradienten über die Membran sowie dem elektrochemischen Potential zusammensetzt, konstant zu halten [58]. Durch die Bildung der Säurekomponenten sinkt während der Acidogenese der extrazelluläre pH-Wert. Sekretiertes Acetat und Butyrat liegen zunehmend als undissoziierte Säuren in Form von Butter- und Essigsäure vor ($pK_{s, \text{Buttersäure}} = 4,82$ und $pK_{s, \text{Essigsäure}} = 4,76$). Die undissoziierten Säuren können über die Cytoplasmamembran in die Zelle diffundieren [45]. Dort ist der pH-Wert um ca. 0,9 bis 1,3 alkalischer als der extrazelluläre pH-Wert, wodurch die Säuren intrazellulär erneut zu Acetat bzw. Butyrat sowie H^+ dissoziieren [43, 59]. Die nun intrazellulär vorliegenden Protonen verringern den Protonengradienten über die Zellmembran [43]. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wechselt *C. acetobutylicum* in die Solventogenese.

Während der solventogenen Phase werden die Säureprodukte teilweise reassimiliert und die pH-neutralen ABE-Lösemittel gebildet [36, 43, 48]. Dadurch wird der transmembrane pH-Gradient verringert und die Akkumulation intrazellulärer Protonen begrenzt. Gelingt der Übergang in die Solventogenese nicht, kommt es zum sogenannten Säuresturz, bei dem die Zellen nach der Acidogenese ihr Wachstum und ihre Produktbildung einstellen [60].

Wodurch genau der Wechsel von der Säure- zur Lösemittelbildung initiiert wird und wie dieser Übergang stattfindet, ist weiterhin unklar. Als Auslöser wird unter anderem eine hohe extrazelluläre Butyratkonzentration genannt [45]. Diese führt zu einer erhöhten Aufnahme von Butyrat und folglich zu einem Anstieg der Butyryl-Coenzym A (Butyryl-CoA) Verfügbarkeit. Butyryl-CoA wiederum wird über die Butanolsynthese abgebaut [42, 45, 61]. Es wird zudem angenommen, dass Hydrogenasen und andere Enzyme eine pH-Wert abhängige Aktivität aufweisen und es dadurch beispielsweise zu einem Sinken der H_2 -Produktion bei niedrigen pH-Werten kommt [57]. Als weitere Auslöser werden eine hohe Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle, Nährstofflimitierung, besonders Phosphat oder Sulfat, sowie ein geringer extrazellulärer pH-Wert oder auch ein hoher H_2 -Partialdruck genannt [42, 62, 63]. Neuere Arbeiten zeigen außerdem, dass externer Stress durch die Zufuhr von pH-Korrekturmitteln oder exogener Butyratzugabe während der Fermentation zu einem Übergang in die Solventogenese bzw. zu einem parallelen Durchlaufen beider Produktbildungsphasen führt [40, 64, 65]. Inwiefern elektrochemisch induzierter Stress den Wechsel von der Acido- in die Solventogenese beeinflusst, ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden (vgl. Abschnitt 2.3).

2.2 Mikrobielle elektrochemische Technologien

Im Jahr 1910 entdeckte Potter, dass der mikrobielle Abbau organischer Substanzen mit der Freisetzung elektrischer Energie einhergeht [66]. Ausgehend von dieser Arbeit wurde in den 1950er und 1960er Jahre an der Entwicklung der mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC) vor allem für den Einsatz im Luftfahrtbereich geforscht [67]. Bei der MFC fungiert eine Anode als finaler Elektronenakzeptor für die Mikroorganismen. Der inverse Prozess, bei dem die Kathode als Elektronendonator für die Mikroorganismen genutzt wird, wurde 1979 zuerst von Hongo und Iwahara [68] für *Brevibacterium flavum* unter Verwendung